



**AKUT İNFLAMASYONUN ANTiOKSiDAN
SiSTEM ÜZERİNE ETKİSiNİN
SiÇAN KARACİÇER DOKUSUNDA
MOLEKÜLER SEViYEDE ARAŞTIRILMASI**

Ashhan BASTEM

**Yüksek Lisans Tezi
Doç. Dr. Harun BUDAK
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı
2017
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKUT İNFLAMASYONUN ANTİOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE
ETKİSİNİN SIÇAN KARACİĞER DOKUSUNDA MOLEKÜLER
SEVİYEDE ARAŞTIRILMASI**

Aslıhan BASTEM

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Genetik Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**AKUT İNFLAMASYONUN ANTİOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE ETKİSİNİN
SIÇAN KARACİĞER DOKUSUNDA MOLEKÜLER SEVİYEDE
ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Harun BUDAK danışmanlığında, Aslıhan BASTEM tarafından hazırlanan bu çalışma 10/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı – Genetik Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği/oy~~ ~~çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Harun BUDAK

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALTAY

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 24.08.2017 tarih ve 34 / 33 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. CAVİT KAZAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan alıntıların, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AKUT İNFLAMASYONUN ANTİOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE ETKİSİNİN SIÇAN KARACİĞER DOKUSUNDA MOLEKÜLER SEVİYEDE ARAŞTIRILMASI

Aslıhan BASTEM

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Genetik Bilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Harun BUDAK

İnflamasyon, hücrede elzem miktarda bulunması gereken ve antioksidan savunma sistemiyle denge halinde olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışını tetikleyerek hücre içi strese sebep olmaktadır. Akut inflamasyon kısa süreli olup konakçı için yararlıdır. İnflamasyon uzun süreli devam ederse kronik inflamasyon meydana gelir. Bu durumda artan ROS miktarı hücreyi yaşlanma, diyabet, karsinogenez, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojik durumları tetikleyen oksidatif strese yönlendirir. Bu tez çalışmasında, inflamasyonun oksidatif stres, hücrel demir metabolizması, karsinogenez ve epigenetik mekanizmalar ile ilişkisinin gen ve protein seviyesinde detaylı bir şekilde incelenmesi amaçlanmıştır. Kontrol ve λ -Carrageenan ile muamele edilen sıçan karaciğer dokularında inflamasyon markeri olarak kabul edilen İnterlökin-6 ve Tümör nekrozis faktör-alfa gibi pro-inflamatör sitokinlerin kantitatif gen ekspresyonlarına qRT-PCR yöntemiyle bakıldı ve modelimizin oluştuğu gösterildi. Oksidatif stres markeri olan indirgenmiş glutatyon, yükseltgenmiş glutatyon, malondialdehit gibi metabolitlerin seviyeleri ve total demir içeriği incelendi. Doku hasarı varlığını belirlemek amacıyla histopatolojik analizler yapıldı. Antioksidan enzimlerin kantitatif gen ekspresyonları qRT-PCR yöntemiyle, kantitatif protein ekspresyonları western blot yöntemiyle ve enzim aktiviteleri spektroskopik tekniklerle ölçüldü. Ayrıca tümörjenezde rol alan çeşitli sinyal yollarını düzenleyen Nükleer faktör kappa B (*Nfkb*) ve bunun aktivasyonu için gerekli olan Metadherin (*Mtdh*), epigenetik mekanizmaların düzenlenmesi ve genom bütünlüğünün sağlanmasında önemli role sahip olan histon deasetilaz aile üyesi Sirtuin (*Sirt*) ve demir metabolizmasını kontrol eden Hepsidin antimikrobiyal peptit (*Hamp*) genlerinin kantitatif ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemiyle hesaplandı.

2017, 119 sayfa

Anahtar Kelimeler: İnflamasyon, Antioksidan Sistem, Gen Ekspresyonu, Enzim Aktivitesi, Protein Ekspresyonu

ABSTRACT

Master Thesis

AN INVESTIGATION OF THE IMPACT OF ACUTE INFLAMMATION ON THE ANTIOXIDANT SYSTEM AT MOLECULAR LEVEL IN RAT LIVER TISSUES

Aslıhan BASTEM

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetic
Department of Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Harun BUDAK

Inflammation induces intracellular stress by triggering an increase in reactive oxygen species (ROS), which must be present in the cell and balance with antioxidant defense system. Acute inflammation is short-term and useful for host organisms. If inflammation continues for a long time, chronic inflammation occurs. In this case, the increased amount of ROS leads the cell into oxidative stress that stimulates many pathological conditions such as senescence, diabetes, carcinogenesis, cardiovascular and neurodegenerative diseases. In this thesis, it was aimed to examine in detail the relationship between inflammation and oxidative stress, cellular iron metabolism, carcinogenesis and epigenetic mechanisms at gene and protein level. Quantitative gene expression of inflammation markers such as Interleukin-6 and Tumor necrosis factor- α pro-inflammatory cytokines, was measured using qRT-PCR in liver tissues obtained from control and λ -Carrageenan induced inflammation. It was shown that our model was formed. Reduced glutathione, oxidized glutathione, malondialdehyde levels and total iron content were investigated as oxidative stress markers. Histopathological analyzes were performed to determine the presence of tissue damage. Quantitative changes in antioxidant enzymes gene expression using qRT-PCR, antioxidant enzymes protein expression using western blot method and antioxidant enzymes activity using spectroscopic techniques were measured. Also, quantitative changes in gene expression of Nuclear factor kappa B (*Nfkb*) and Metadherin (*Mtdh*) (*Mtdh* regulates various signaling networks in tumorigenesis and essential to *Nfkb* activation), Sirtuin (*Sirt* is member of histone deacetylase family that plays major role in maintaining genome integrity through regulation of epigenetic mechanisms) and Hepcidin (*Hamp* controls iron homeostasis) were measured qRT-PCR method.

2017, 119 pages

Keywords: Inflammation, Antioxidant System, Gene Expression, Enzyme Activity, Protein Expression

TEŞEKKÜR

Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Komisyonu tarafından desteklenen 2015/97 nolu ‘İnflamasyonun Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Genomik ve Proteomik Seviyede Sıçan Karaciğer Dokusunda Araştırılması’ konulu proje kapsamında hazırlanan bu tez çalışmasının deneysel kısmı Sayın Doç. Dr. Harun BUDAK yöneticiliğinde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarları ve Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde (DAYTAM) hazırlanmıştır. Bu tez çalışmasına verdikleri destekten dolayı öncelikli olarak Atatürk Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim.

Çalışma sürecinde her türlü yardım ve destekte bulunan, bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Harun BUDAK’a teşekkür ederim.

Çalışmalarımız kapsamında gerekli model organizmaların temini, bakımı ve enjeksiyon aşamasındaki yardımlarından dolayı Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (ATADEM) yöneticileri ve çalışanlarına, Histopatoloji çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü’nden Sayın Yrd. Doç. Dr. Mevlüt ALBAYRAK’a ve histopatolojik deneylerin gerçekleşmesine olanak sağlandıklarından dolayı Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı’na teşekkür ederim.

Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve çalışanlarına, çalışmalarımın çeşitli aşamalarında bana yardımcı olan Muş Alparslan Üniversitesi Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü’nden Sayın Yrd. Doç. Dr. Enver Fehim KOÇPINAR’a, Sayın Nurdan GÖNÜL, Sayın Şeyda Nur ÇAKIR, Sayın Yeliz DEMİR, Sayın Arş. Gör. Sümeyye ARSLAN’a teşekkür ederim.

Ayrıca hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olan babam Sayın Bahattin BASTEM, annem Sayın Hatice BASTEM, kardeşlerim Sayın Buğrahan BASTEM ve Sayın Mehmet Emin BASTEM’e teşekkürü bir borç bilirim.

Aslıhan BASTEM

Ağustos, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. İnflamasyon ve Kaynakları	1
1.1.1. İnflamasyonun sebepleri, patolojik ve fizyolojik sonuçları	2
1.1.2. Sitokinler ve inflammatör yanıt.....	3
1.1.3. İmmün sistem ve inflammatör hücreleri.....	3
1.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres	4
1.2.1. Antioksidan savunma sistemi.....	7
1.3. İnflamasyon, Kanser ve Metabolik Hastalıklar	16
1.3.1. ROS, apoptozis ve nükleer faktör kappa B (NF-κB) sinyal yolağı	18
1.3.2. Karsinogenez ve metadherin aktivasyonu	20
1.3.3. Epigenetik mekanizmalar, ROS ve karsinogenez arasındaki ilişki	20
1.3.4. İnflamasyonun oksijen ve demir metabolizması üzerine etkisi.....	22
2. KAYNAK ÖZETLERİ	26
2.1. Amaç	34
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	37
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	37
3.2. Tez Dahilinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar.....	39
3.3. Tez Dahilindeki Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	40
3.4. Sıçanlarda İnflamasyon Modelinin Oluşturulması.....	44
3.5. Real Time PCR Uygulaması	47
3.5.1. Total RNA izolasyonu.....	47
3.5.2. Total RNA'nın agaroz jel elektroforezinde incelenmesi.....	48
3.5.3. Agaroz jelin hazırlanışı	48

3.5.4. Yürütülecek RNA örneğinin hazırlanışı.....	49
3.5.5. Elektroforez işlemi	49
3.5.6. RNA'nın konsantrasyon ve saflığının belirlenmesi	49
3.5.7. cDNA kütüphanesinin hazırlanması.....	49
3.5.8. Primer ve Prob dizaynı	50
3.5.8.a. Primer ve prob dizaynı için gen sekansına ulaşılması.....	50
3.5.8.b. Kantitatif real time PCR (qRT-PCR) analizi.....	59
3.5.8.c. Real Time PCR sonuçlarının istatistiki analizi.....	60
3.6. Antioksidan Sistem Bağıntılı Bazı Metabolit Seviyelerinin Ölçümü	61
3.6.1. İndirgenmiş-yükeltgenmiş glutatyon (GSH-GSSG) seviyelerinin ölçümü.....	61
3.6.2. Total demir seviyesi ölçümü	63
3.6.3. Lipid peroksidasyon (MDA) ölçümü	64
3.7. Histopatolojik analiz.....	66
3.8. Kantitatif Protein Ekspresyon Analizi.....	67
3.8.1. Western blot	67
3.8.1.a. Sıçan karaciğer dokusundan total protein ekstrakte edilmesi.....	68
3.8.1.b. SDS jelinin hazırlanması ve yüklenmesi.....	69
3.8.1.c. Jeldeki proteinin membrana transferi (blotlama), bloklama ve görüntüleme basamakları	70
3.9. Enzim Aktivite Analizi.....	72
3.9.1. Bradford (Commassie Blue) protein tayini	72
3.9.2. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aktivite ölçümü.....	74
3.9.3. Katalaz (CAT) enzimi aktivite ölçümü	76
3.9.4. Glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi aktivite ölçümü	77
3.9.5. Glutatyon redüktaz (GR) enzimi aktivite ölçümü	78
3.9.6. Glutatyon S transferaz (GST) enzimi aktivite ölçümü.....	80
3.9.7. Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi aktivite ölçümü.....	81
3.9.8. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) enzimi aktivite ölçümü	82
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	84
4.1. Total RNA İzolasyon Sonuçları	84
4.2. Real Time PCR Analiz Sonuçları.....	86

4.2.1. İnflamasyon marker genlerinin (<i>Il-6</i> ve <i>Tnf-α</i>) mRNA ekspresyon seviyeleri	86
4.2.2. Hepsidin antimikrobiyal peptit (<i>Hamp</i>) geninin mRNA ekspresyonu	87
4.2.3. Antioksidan sistem genlerinin (<i>Sod1</i> , <i>Cat</i> , <i>Gpx1</i> , <i>Gr</i> ve <i>Gst</i>) mRNA ekspresyon seviyeleri	87
4.2.4. Pentoz fosfat yolağı genlerinin (<i>G6pd</i> ve <i>6pgd</i>) mRNA ekspresyon seviyeleri	88
4.2.5. Metadherin (<i>Mtdh</i>) geninin mRNA ekspresyonu	89
4.2.6. Nükleer faktör kappa B (<i>Nfkb1</i>) geninin mRNA ekspresyonu	90
4.2.7. Sirtuin 1 (<i>Sirt1</i>) geninin mRNA ekspresyonu	90
4.3. Antioksidan Bağlantılı Bazı Metabolitlerin Ölçüm Sonuçları	91
4.3.1. Total GSH, GSSG seviyeleri ve GSH/GSSG oranı	91
4.3.2. Total demir seviyesi	92
4.3.3. Malondialdehit (MDA) seviyesi	93
4.4. Histopatolojik Analizler	94
4.5. Kantitatif Western Blot Analizi	98
4.5.1. CAT proteininin kantitatif western blot analizi	98
4.5.2. GPx proteininin kantitatif western blot analizi	98
4.5.3. GR proteininin kantitatif western blot analizi	99
4.6. Enzim Aktivitesi Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirme	100
4.6.1. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aktivite sonuçları	100
4.6.2. Katalaz (CAT) enzimi aktivite sonuçları	100
4.6.3. Glutasyon peroksidaz (GPx) enzimi aktivite sonuçları	101
4.6.4. Glutasyon redüktaz (GR) enzimi aktivite sonuçları	102
4.6.5. Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi aktivite sonuçları	102
4.6.6. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi aktivite sonuçları	103
4.6.7. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) enzimi aktivite sonuçları	104
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	105
KAYNAKLAR	114
ÖZGEÇMİŞ	120

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
bç	Baz Çifti
dk	Dakika
Fe ⁺²	Ferröz Demir
Fe ⁺³	Ferrik Demir
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mg/L	Miligram/Litre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
°C	Santigrat Derece
T _m	Erime Sıcaklığı
UV	Ultra Viole
µg/mL	Mikrogram/Mililitre

Kisaltmalar

6PGD	6 Fosfoglukonat Dehidrogenaz
CAT	Katalaz
COX2	Siklooksigenaz 2
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
FPN-1	Ferroportin-1

G6PD	Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş Glutasyon
GST	Glutasyon S Transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HAMP	Hepsidin Antimikrobiyal Peptid
HAT	Histon Asetiltransferaz
HDAC	Histon deasetilaz
HO [•]	Hidroksil Radikali
IL-6	İnterlökin-6
IRE	Demir Yanıt Elementi
IRP	Demir Regülatör Protein
IκB	İnhibitör Kappa B
LPS	Lipopolisakkarit
MDA	Malondialdehit
MTDH	Metadherin
NADPH	Nikotinamid Adenin Di Nükleotit Fosfat
NAFLD	Karaciğer Yağlanması
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
O ₂	Oksijen
O ₂ ^{•-}	Süperoksit Radikali
OD	Optik Dansite
PPP	Pentoz Fosfat Yolağı
RHD	Rel Homoloji Domaini
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SIRT1	Sirtuin 1
SOD	Süperoksit Dismutaz
T2D	Tip 2 Diyabet
TAD	Transkrip Aktivasyon Domaini
TBA	Tiyobarbitürik Asit

TFR-1	Transferrin-1
TGF- β	Transforme Büyüme Faktörü β
TLR	Toll Benzeri Reseptör
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TRİS	Tri Hidroksi Metil Amino Grup Metan
λ -CGN	Lambda Karragenan



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İnflamasyon kaynakları	1
Şekil 1.2. İnflamatör oluşum, fizyolojik amaçları ve patolojik sonuçları.....	2
Şekil 1.3. Oksijen metabolizması ve radikal oluşumu.....	5
Şekil 1.4. Antioksidan savunma sistemi	8
Şekil 1.5. İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon dönüşümü	11
Şekil 1.6. Antioksidan sistem ve oksidatif hasar yolağı	14
Şekil 1.7. NF-κB sinyal yolağı ile ROS arasındaki ilişki	19
Şekil 1.8. Demir metabolizması ve radikal oluşumu	22
Şekil 1.9. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları.....	23
Şekil 1.10. Serumdaki demir seviyesi ve hepsidin ilişkisi	25
Şekil 2.1. Oksidatif stres altında hücrel NADPH homeostazisinde G6PD K403 asetilasyonunun rolü	33
Şekil 3.1. Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK) tarafından onaylanmış etik kurulu belgesi	46
Şekil 3.2. Primer ve prob dizayn etmede kullanılan NCBI anasayfası.....	51
Şekil 3.3. Primer ve prob dizaynı için kullanılan organizma seçim ve ilgili genin temel özelliklerini gösteren NCBI sayfası.....	51
Şekil 3.4. İlgili genin gen ve protein sekansını gösteren NCBI veritabanı.....	52
Şekil 3.5. İlgili genin sekansının bulunduğu internet veri tabanı	53
Şekil 3.6. Sod1 genine ait kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri gösteren veritabanı.....	53
Şekil 3.7. Sod1 genine ait FASTA dizilimi	54
Şekil 3.8. Primer ve prob tasarımında kullanılan veri tabanı.....	54
Şekil 3.9. Primere ait bilgilerin girildiği sayfa.....	55
Şekil 3.10. Proba ait bilgilerin girildiği sayfa.....	55
Şekil 3.11. İlgili gene göre tasarımı yapılan primer ve proba ait bilgilerin bulunduğu sayfa	56
Şekil 3.12. Gen sekansı homolojisinin kontrol edildiği organizmaya özgü blast sayfası.....	57

Şekil 3.13. Tasarlanan primer ve problemlerin homolojilerinin kontrol edilme amacıyla blastlandığı sayfa	57
Şekil 3.14. Dizayn edilen primer ve problemlerin kontrol edildiği blastlama sayfasının aşağısında yer alan, primer ve problemlerin blastlanması sonucunda ortaya çıkan ve ilgili primer ve problemlerle homolojisi olan genler	58
Şekil 3.15. Glutasyon standart grafik eğrisi	63
Şekil 3.16. Total demir içeriği standart grafik eğrisi	64
Şekil 3.17. Lipit peroksidasyon (MDA) standart grafiği eğrisi	66
Şekil 3.18. Western blot tekniğinin şematize edilmesi	71
Şekil 4.1. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularından elde edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü	84
Şekil 4.2. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında <i>Il-6</i> ve <i>Tnf-α</i> genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR yöntemiyle belirlenmesi	86
Şekil 4.3. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında <i>Hamp</i> geninin mRNA ekspresyon seviyesinin Real Time PCR yöntemiyle belirlenmesi	87
Şekil 4.4. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında <i>Sod1</i> , <i>Cat</i> , <i>Gpx1</i> , <i>Gr</i> ve <i>Gst</i> genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR yöntemiyle belirlenmesi	88
Şekil 4.5. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında <i>G6pd</i> ve <i>6pgd</i> genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR yöntemiyle	89
Şekil 4.6. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında <i>Mtdh</i> geninin mRNA ekspresyon seviyesinin Real Time PCR yöntemiyle belirlenmesi	90
Şekil 4.7. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında <i>Nfkb1</i> geninin mRNA ekspresyon seviyesinin Real Time PCR yöntemiyle belirlenmesi	90

Şekil 4.8. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında <i>Sirt1</i> geninin mRNA ekspresyon seviyesinin Real Time PCR yöntemiyle belirlenmesi.....	91
Şekil 4.9. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında Total GSH, GSSG ve GSH/GSSG metabolit seviyesinin belirlenmesi	92
Şekil 4.10. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında Total demir metabolit seviyesinin belirlenmesi	93
Şekil 4.11. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında Malondialdehit seviyesinin belirlenmesi.....	93
Şekil 4.12. Kontrol grubu (A) ve λ -Carragenaan muamele grubu (B) sıçan karaciğer dokularında histopatoloji görüntüleri 50 μ m ölçek	95
Şekil 4.13. Kontrol grubu (C) ve λ -Carragenaan muamele grubu (D) sıçan karaciğer dokularında Fe^{+3} birikimi histopatoloji görüntüleri 50 μ m ölçek	97
Şekil 4.14. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında CAT protein ekspresyon seviyesinin western blot yöntemiyle belirlenmesi	98
Şekil 4.15. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında GPx protein ekspresyon seviyesinin western blot yöntemiyle belirlenmesi	99
Şekil 4.16. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında GR protein ekspresyon seviyesinin western blot yöntemiyle belirlenmesi	99
Şekil 4.17. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında SOD enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi	100
Şekil 4.18. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında CAT enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi	101
Şekil 4.19. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında GPx enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi	101
Şekil 4.20. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında GR enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi.....	102

Şekil 4.21. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında GST enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi.....	103
Şekil 4.22. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında G6PD enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi	103
Şekil 4.23. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında 6GPD enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi	104
Şekil 5.1. Akut inflamasyonun antioksidan sistem ve çeşitli yollar üzerine etkisinin şematize edilmesi.....	111



ÇİZELGELER DİZİNİ

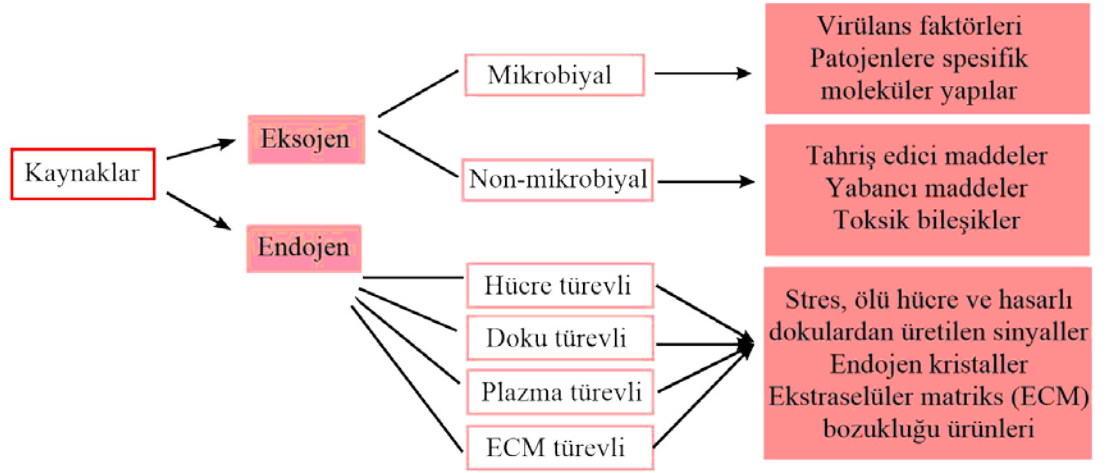
Çizelge 3.1. Tez dahilinde kullanılan kimyasal maddeler ve kitler	37
Çizelge 3.2. Tez dahilinde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	40
Çizelge 3.3. cDNA sentez kiti protokolü	50
Çizelge 3.4. Gen ekspresyon profillerine bakılacak genler için dizayn edilen primer ve problemlerin listesi	58
Çizelge 3.5. TaqMan Probe (Multipleks Real-Time PCR) reaksiyonunda her tüp için kullanılan kimyasal konsantrasyon ve miktarları	59
Çizelge 3.6. SYBR Green reaksiyonunda her tüp için kullanılan kimyasal konsantrasyon ve miktarları.....	60
Çizelge 3.7. GSH ve GSSG ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü.....	62
Çizelge 3.8. Lipit peroksidasyon (MDA) tayini için standart pipetleme prosedürü.....	65
Çizelge 3.9. Lipit peroksidasyonu (MDA) tayini için pipetleme prosedürü.....	65
Çizelge 3.10. SDS-PAGE jel elektroforezi için kullanılan ayırma jeli solüsyon miktarları	69
Çizelge 3.11. SDS-PAGE jel elektroforezi için kullanılan yükleme jeli solüsyon miktarları	69
Çizelge 3.12. Western blot uygulaması için kullanılan primer antikorların listesi.....	72
Çizelge 3.13. Western blot uygulaması için kullanılan sekonder antikorların listesi.....	72
Çizelge 3.14. Bradford (Coomassie Blue) protein tayini metodunda uygulama prosedürü	74
Çizelge 3.15. Süperoksit dismutaz enziminin ölçümünde kullanılan reaktif karışımın içeriği.....	74
Çizelge 3.16. Süperoksit dismutaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü	75
Çizelge 3.17. Katalaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü	76
Çizelge 3.18. Glutasyon peroksidaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü	77

Çizelge 3.19. Glutasyon redüktaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü	79
Çizelge 3.20. Glutasyon S-transferaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü	80
Çizelge 3.21. Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü	81
Çizelge 3.22. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü	82
Çizelge 4.1. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularından elde edilen total RNA'ların saflık dereceleri ve konsantrasyon miktarları.....	85
Çizelge 4.2. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında Hematoxylin & Eosin (H&E) yöntemiyle histopatolojik hasar skorlarının belirlenmesi	96
Çizelge 4.3. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında Perls' Prussian Blue yöntemiyle histopatolojik demir birikiminin kalitatif tayini	98

1. GİRİŞ

1.1. İnflamasyon ve Kaynakları

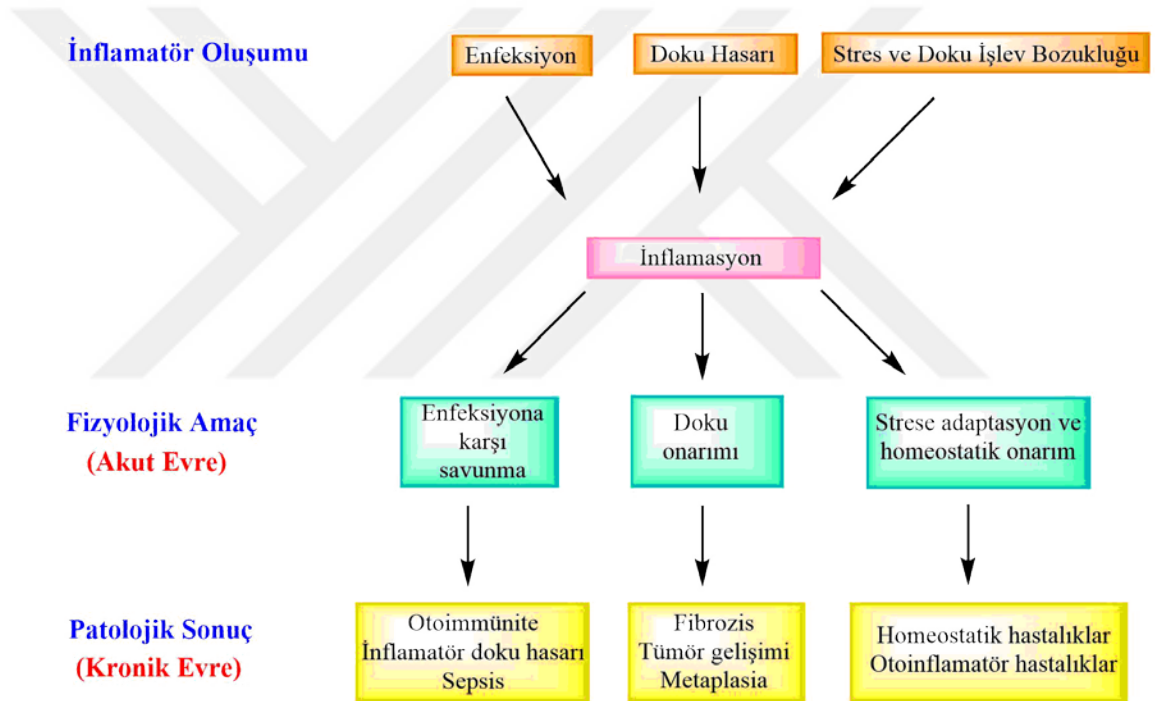
İnflamasyon vücudun hasarlı hücreler, patojenler, tahriş edici maddeler gibi zarar verici uyaranlara karşı oluşturduğu kompleks biyolojik yanıt olarak tanımlanmaktadır (Anonymous 2016). Klasik literatürde inflamasyon; şişlik, kızarıklık, ağrı, sızı gibi yaralanmalara karşı vücudun gösterdiği immünolojik yanıt olarak geçmektedir (Hotamisligil 2006). İnflamasyon kaynakları; mikrobiyal ve viral enfeksiyonlar, radyasyona ve toksik kimyasallara maruz kalma, otoimmün ve kronik hastalıklar; obezite, alkol tüketimi, tütün kullanımı ve yüksek kalori diyeti gibi birçok faktörden oluşmaktadır (Reuter *et al.* 2010). İnflamasyon ve enfeksiyon farklı terimlerdir. Enfeksiyon, mikrobiyal invazyon ile inflamator yanıt arasındaki etkileşimi tanımlarken; inflamasyon endojen, eksojen uyaranlara karşı vücudun verdiği yanıttır (Şekil 1.1) (Anonymous 2016).



Şekil 1.1. İnflamasyon kaynakları (Medzhitov 2008)

1.1.1. İnflamasyonun sebepleri, patolojik ve fizyolojik sonuçları

İnflamasyon akut ve kronik olmak üzere iki evreden oluşmaktadır (Şekil 1.2). Akut inflamasyon; inflamasyonun başlangıç (doğal bağışıklık) evresidir ve immün sistemin aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu inflamasyon türü kısa süreli olup konakçı için yararlıdır. Eğer inflamasyon uzun süreli devam ederse ikinci evre inflamasyon ya da kronik inflamasyon oluşumu gerçekleşir. Bu durum kanser, diyabet, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklara eğilimi artırır (Reuter *et al.* 2010).



Şekil 1.2. İnflamatör oluşum, fizyolojik amaçları ve patolojik sonuçları (Medzhitov 2008)

Akut inflammatör yanıt, sitokin ve kemokinlerin yanı sıra temel yağ asidi arasıdonik asitten üretilen eikosanoidler gibi (prostaglandin ve lökotrienler) lipid medyatörleri sağlayarak yanıtın başlamasında önemli rol alırlar. Prostaglandin, lökotrienler ve pro-inflamatör sitokinler arasındaki bağlantı inflamasyonu meydana getirir. Patolojistler akut inflamasyonu başlangıç ve çözüm olarak ikiye ayırmaktadır. Çözüm evresi pasif süreç olarak değerlendirilir (Serhan 2014). Akut inflamasyon polimorfonükleer lökositlerin (PMN) akışı ile sonuçlanan pro-inflamatör medyatörlerin salınımı

tarafından karakterize olmaktadır. Bu durum erken faz fagositoz makrofajları tarafından lökosit rezolüsyonu oluşturulması için takip edilmektedir. Bazı yolaklar akut inflammatör yanıtı sonlandırır ya da homeostazis gerçekleşirken kronik inflamasyon ve otoimmüniteden uzaklaşmaya katkı sağlar (Newson *et al.* 2014).

1.1.2. Sitokinler ve inflammatör yanıt

Enfeksiyon ve doku hasarına karşı lokal yanıt, inflamasyon bölgesinden salınan sitokin üretimini içermektedir. Sitokinler immünoregülatör rolleri kanıtlanan küçük polipeptitlerdir. Bazı sitokinler lenfosit, nötrofil ve monosit gibi hücre akımı oluşturmaktadır. Lokal inflammatör yanıt, akut faz yanıtı olarak bilinen sistemik yanıt ile beraber hareket etmektedir. Başlıca sitokinler; Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), İnterlökin-1 beta (IL-1 β), İnterlökin-6 (IL-6), IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra), ve çözülebilir TNF- α reseptörleridir (sTNF-R). Enfeksiyon veya travmaya yanıt olarak, sitokinler ve sitokin inhibitörlerinin seviyesi artar ve enfeksiyon tedavi edildiğinde azalır. Düşük seviyeli kronik inflamasyonda TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-1ra ve sTNF-R seviyelerinde 2-3 kat artış olduğu bilinmektedir (Petersen and Pedersen 2005).

1.1.3. İmmün sistem ve inflammatör hücreleri

İnflamasyonun önemli bir özelliği iltihaplı dokuların nötrofil, eozinofil ve makrofajlar gibi immün hücreler tarafından infiltrasyonunun yapılmasıdır (Hotamisligil 2006). İnflamasyon çoğu durumda monosit/makrofaj gibi çeşitli hücre tiplerinden sentezlenen sitokin ve benzeri medyatörler tarafından kontrol edilir ve yönlendirilir (Gerner *et al.* 2013). Makrofajlar çeşitli patojenler ve hücre hasarları tanıdığına doğal immün sistemi devam ettiren ve fagositoz, sitokin ve kemokin salınımı, antijen oluşumu gibi birçok olayın meydana gelmesini sağlayan majör efektör hücrelerdir (Ham *et al.* 2013). Lipid mediyatörlerinde pro-inflamatör prostaglandinlerin lipoksinlere dönüşümü (anti-inflamatör etki) inflamasyon probleminin çözümü için önemlidir. Lipoksinler nötrofillerin etkisini inhibe eder, ölü hücreleri ortadan kaldıran ve doku onarımını sağlayan monositlerin oluşumunu uyarır. Büyüme faktörlerinin yanı sıra lipid

mediyatörlerinin diğ er sınıfı olan ve makrofajlar tarafından üretilen resolvinler ve protektinler, doku tamiri ve inflamasyon tedavisi için önemli bir role sahiptir (Medzhitov 2008).

Eğer akut inflamatör yanıt patojenleri elimine etmede başarısız olursa, inflamatör süreç yeni karakteristik özellikler kazanarak devam eder. Nötrofil infiltrasi makrofajlarla, enfeksiyon durumunda da T hücreleriyle yer de i tirir. Bu iki hücre kombinasyonunun etkisi de yetersiz kalırsa, granüloma ve tersiyer lenfoid dokularının oluşumuna neden olan kronik inflamatör durum ortaya çıkar. Bu inflamasyonun karakteristik özelliği T hücrelerinin sınıfına göre farklılık gösterir. Kalıcı patojenlere ek olarak, kronik inflamasyon otoimmün yanıtı gibi doku hasarlarına da sebep olmaktadır. Patojenleri veya yabancı maddeleri yok etmede başarısız olan makrofajlar, konakçı hücreyi korumak için granüloma oluşumuna neden olabilir (Medzhitov 2008).

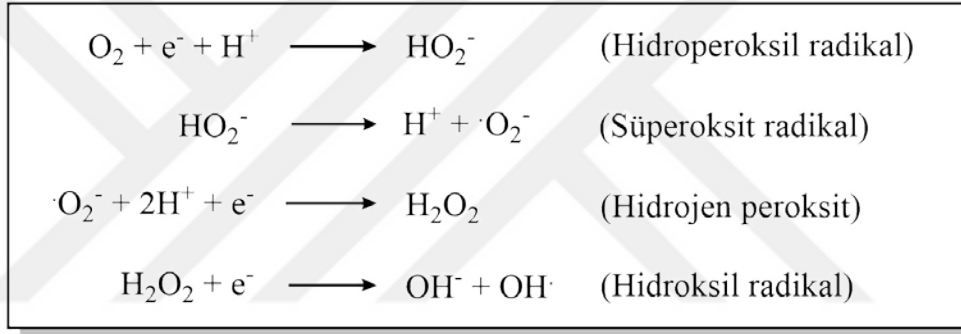
1.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Dioksijen veya O₂ olarak bilinen oksijen atmosferde yaklaşık üç milyar yıldır bulunmakta olup bitkiler ve mikroorganizmaların (mavi yeşil algler) fotosentetik aktivitesi sonucu oluşmaktadır. Artan atmosferik oksijen seviyesi stratosferde ozon tabakası oluşumunu takip etmektedir. Hem oksijen hem de ozon tabakası dünya yüzeyine ulaşan ultraviyole radyasyonu filtreler (Tangvarasittichai 2015).

Aerobik canlılar yaşamları için gerekli enerji ve kimyasal elementleri elde edebilmek, bunun yanı sıra karbon ve hidrojen zengin substratları metabolize etmek için oksijen kullanır. Moleküller oksijenle oksitlendi i zaman, oksijen molekülü indirgenir ve ara ürünler oluşturur (Tangvarasittichai 2015). Oksijenin zararlı özelliği ve sebepleri Gerschman'ın 1954'teki serbest radikal teorisine kadar tam olarak bilinmemekteydi (Gerschman *et al.* 1954).

Serbest radikaller e le memi  elektronlara sahip olan atom ve moleküllerdir, genellikle kararsız ve yüksek derecede reaktiftirler. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller;

oksijen temelli radikaller ve nitrojen temelli radikaller olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Süperoksit (O_2^-), hidroksil ($\cdot OH$), alkoksil ($RO\cdot$), peroksil ($RO_2\cdot$), peroksinitrit ($ONOO^-$) oksijen türevi serbest radikaller ve hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloröz asit ($HOCl$), hipobromöz asit ($HOBr$), ozon (O_3) gibi oksijen türevi non-radikal gruplar reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinir. ROS'lar oksijenin metabolik sürecinde üretilirler (Şekil 1.3). Nitrojen dioksit, nitrik oksit radikalleri ve peroksinitrit gibi nitrojen temelli radikaller ve non-radikalleri içeren reaktif nitrojen türleri (RNS), uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) aracılığıyla nitrik oksit ve O_2 'den türetilmiştir (Tangvarasittichai 2015).



Şekil 1.3. Oksijen metabolizması ve radikal oluşumu (Tangvarasittichai 2015)

Mitokondride elektron taşıma zincirinde peroksizomlar ve sitokrom P450 sistemi ROS üretim kaynağı olarak önemli role sahiptir. Ayrıca siklooksigenaz, ksantin oksidaz, nitrik oksit sentetaz (NOS), NADPH oksidaz gibi enzimler de ROS üretimini hızlandırabilir. Sitokrom P450, siklooksigenaz ve NADPH oksidaz gibi enzimlerin elektron transport zinciri aracılığıyla oksijen molekülünden bir elektron azalması ile oluşan süperoksit radikali ana ROS molekülü olarak davranır. Çeşitli kemoterapötik ilaçlar, ağır metaller (Fe^{+3} , Cd^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2}), kloroform, tersiyer bütül hidroperoksit, karbon tetraklorit, çevresel kirlilikler (nitrojen, CO_2 , SO_2 oksitlenmesi), ksenobiyotikler, UV, radyasyon gibi faktörler de ROS üretimini indükleyebilir. Hem serbest radikaller hem de non-radikaller hücrel hasarla bağlantılı oksidatif stresin önemli faktörleridir (Tangvarasittichai 2015).

Kimyasal karakteristik özelliklerinden dolayı, ROS/RNS'ler lipid peroksidasyonunu başlatabilir, biyolojik membran ve dokularda hasara sebebiyet verecek moleküllerin oksidasyonuna sebep olabilir (Li *et al.* 2015). İyonize radyasyon, enfektöz ajanlar, toksinler, kansızlık ve diğer patolojik faktörler aracılığıyla fazla miktarda ROS üretimi sonucu, lipid-lipit ve lipid-protein yapısında bozunmalar oluşur, böylece hücrel metabolizma dengesizliği meydana gelir (Iskusnykh *et al.* 2013). ROS, RNA ve DNA'daki bazıları birbirine bağlayan fosfodiester bağlarını birbirinden ayırır ve zincir kırıkları oluşturur. Özellikle, hidroksil grupları proteinlerin sistein rezidülerindeki SH gruplarını disülfid, sülfoksit veya sülfonik aside okside eder. Enzimatik aktivite sistine bağlı olduğundan dolayı, enzimler ROS tarafından inaktive olurlar (Muriel and Gordillo 2016). Serbest radikallerin zarar verici etkisi potansiyel biyolojik hasara sebep olurken oksidatif ve nitrosatif stresi oluşturur (Ridnour *et al.* 2005; Kovacic *et al.* 2005). Oksidatif modifiye biyomoleküller oksidatif strete *in vivo* ve *in vitro* biyobelirteç olarak kullanılırlar (Tangvarasittichai 2015).

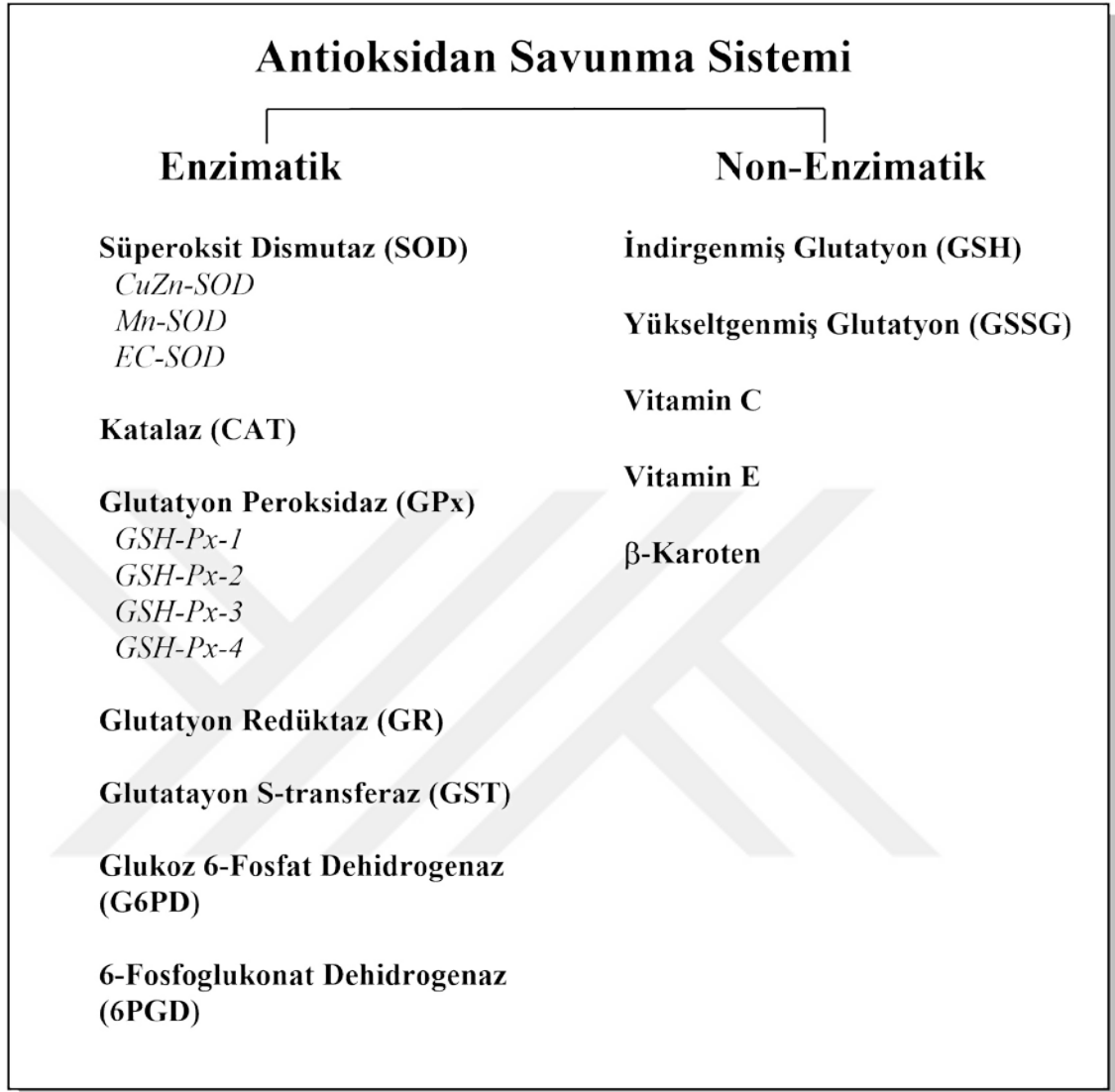
Oksidatif stresin temeli mitokondriyel respirasyondan kaynaklanmaktadır. Kalp, beyin, böbrek, karaciğer ve iskelet kasları etkin oksijeni süperoksite çevirerek tüketen organlardır. Mitokondriyel elektron taşıma zinciri $\cdot\text{O}_2^-$ oluşumunun kaynağıdır ve her mitokondri günlük yaklaşık 107 çeşit ROS molekülü üretmektedir. Malondialdehit, 4-hidroksi-2-nonenal, izopropan türevleri, protein karbonilleri, 3-nitrotirozin, hidroperoksitler, protein oksidasyon ürünleri, glikasyon sonlanma ürünleri, karbonhidrat modifikasyonları ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG), oksitlenmiş DNA ürünü gibi moleküller oksidatif stres biyobelirteçleri içerisinde bulunmaktadır (Tangvarasittichai 2015).

Oksidatif stres, inflamasyon, kardiyovasküler hastalıklar, insülin direnci, adipositokin disregülasyonu, karsinogenez, nörolojik hastalıklar, diyabet, kansızlık, yaşlanma gibi çeşitli patolojik bulguları kapsamaktadır (Valko *et al.* 2007; Ghezzi 2011; Tangvarasittichai 2015). Bu hastalıklar iki gruba ayrılmaktadır: (i) ilk grup hastalıklar 'mitokondriyel oksidatif stres' olarak adlandırılan pro-oksidanlardaki bozulmalar, glikoz toleransı tarafından karakterize olanlar; (ii) ikinci grup hastalıklar 'inflamator

oksidatif koşullar' tarafından karakterize olanlardır. Bu durumlar hem NADPH oksidaz hem de ksantin oksidaz kaynaklı ROS oluşumunu artırmaktadır (Valko *et al.* 2007).

1.2.1. Antioksidan savunma sistemi

Serbest radikallerin yararlı ve zararlı etkileri arasında hassas bir denge bulunmakta olup bu durum 'redoks regölasyonu' olarak adlandırılmaktadır. Redoks regölasyonu süreci canlı organizmaları çeşitli oksidatif streslerden korur ve *in vivo* olarak kontrol edilen redoks homeostazisini oluşturur (Valko *et al.* 2007). ROS ürünleri (pro-oksidanlar) normal koşullarda hücrede bulunmakta ve seviyeleri *in vivo* antioksidan savunma mekanizması tarafından dengelenmektedir (Tangvarasittichai 2015). Hasar verici pro-oksidanlara karşı kompleks yapıda olan enzimatik antioksidanlar (Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPx), Glutasyon Redüktaz (GR), Glutasyon S-transferaz (GST)) ve non-enzimatik antioksidanlar (İndirgenmiş glutasyon (GSH), Yükseltgenmiş glutasyon (GSSG), vitamin C ve E gibi.) bulunmaktadır (şekil 1.4) (Reuter *et al.* 2010).



Şekil 1.4. Antioksidan savunma sistemi

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit çeşitli kaynaklardan üretilen başlıca ROS'lardan biridir ve SOD tarafından dismutasyonu hücre için önemli role sahiptir. SOD'un 3 formu bulunmaktadır: CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), EC-SOD (SOD3). SOD ya da ksantin oksidaz gibi oksidazlar tarafından üretilen H_2O_2 , CAT ve GPx enzimleri tarafından suya dönüştürülür (Birben vd 2012; Yang *et al.* 2015). Özellikle mitokondride, manganaz süperoksit dismutaz (MnSOD) $O_2\cdot^-$ 'yi H_2O_2 'ye hızlı bir şekilde çevirir. Demir, bakır gibi çeşitli metallerin varlığında ise daha çok zarar verici olan $\cdot OH$ 'ye çevirir (Bakala *et al.* 2012).

Katalaz (CAT): Dört monomerin birleşmesi sonucu oluşan tetramer halinde bulunur ve her monomer aktif bölgesinde hem grubu içermektedir. H_2O_2 'nin degradasyonu, hem katalaz-ferrikatalaz hem de bileşik I'in (bir oksijen atomu ve demir kompleksi) dönüşümü aracılığıyla gerçekleşmektedir. Katalaz aynı zamanda H_2O_2 aracılığıyla enzimin oksidatif inaktivasyonunu önlemek için NADPH'a bağlanır (Birben vd 2012). Katalaz, özellikle mitokondride, H_2O_2 kaynaklı hücre ölümüne ve oksidatif hasara karşı sitozolik ekspresyona göre daha önemli bir koruma aktivitesine sahiptir (Bakala *et al.* 2012).

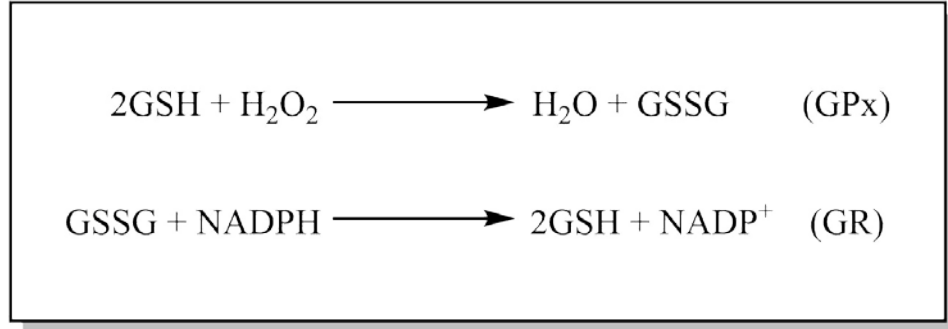
Glutasyon Peroksidaz (GPx): GPx redoks döngüsündeki enzimler aracılığıyla H_2O_2 ve lipid hidroperoksiti redüksiyonundan sorumludur. Hidrojen peroksiti enzimatik parçalama ile suya çevirerek etkisiz hale getirir. Farklı genlerden kodlanan GPx-1 (hücresel), GPx-2 (gastrointestinal), GPx-3 (ekstraselüler), GPx-4 (fosfolipid hidroperoksit) olmak üzere 4 çeşit GPx tanımlanmıştır. (Bakala *et al.* 2012; Birben vd 2012).

İndirgenmiş Glutasyon (GSH): Serbest radikallerin hasar verici etkilerine karşı korumayı sağlayan en önemli antioksidan sistem zinciri glutasyon sistemidir (Iskusnykh *et al.* 2013). Non-enzimatik antioksidanlar, vitaminler (vitamin C ve E), β -karoten, ürik asit, tiyol grubu içeren tripeptit ve GSH gibi düşük moleküler ağırlığa sahip bileşikler içerir. Tripeptit glutasyon, GSH, L- γ -glutamil-L-sisteinil glisin, bütün hücrelerde bol miktarda bulunan ve yüksek çözünme özelliğine sahip, ubikuitöz düşük moleküler ağırlıklı tiyoldür (Birben vd 2012; Circu and Aw 2012; Yang *et al.* 2015). Sisteindeki –SH grubu oksidasyona karşı hassastır ve çoğunlukla peroksitler tarafından oluşturulmaktadır. β -merkaptetanol gibi çeşitli ajanlar moleküller üzerinde yıkıcı etkiye sahiptir ve okside oldukları zaman kullanışsız hale gelirler. Glutasyon sitozolde (1-11 mM), nükleusta (3-15 mM), ve mitokondride (5-11 mM) seviyelerinde bulunmaktadır ve hücrede majör çözülebilir antioksidan olarak bilinmektedir. Buna ek olarak, sitozolik konsantrasyonu 15 mM'a kadar ulaşabilir (Valko *et al.* 2007; Yang *et al.* 2015).

GSH seviyesi hücreyi reaktif oksijen türlerine karşı korumak için önemlidir. Böylece, GSH seviyesindeki azalış ya da artış canlı organizmalardaki oksidatif stres kaynağı olan ROS birikimini meydana getirmekte ve antioksidan sistem bozulan dengeye karşı girişimde bulunmaktadır (Budak *et al.* 2014). Hücre içi 'redoks homeostazisi' GSH ve tioredoksin (TRX) tarafından sağlanmaktadır. İndirgenmiş GSH ve TRX'in yükseltgenmiş formlarına oranı GSH redüktaz ve TRX redüktaz aktivitesiyle oluşturulmaktadır. Bu iki redoks tampon sistemi intrasellüler oksidatif strese göre ters hareket etmektedir (Valko *et al.* 2007). GSH hücreyi artan ROS miktarına karşı koruyan önemli bir bileşen olduğundan dolayı azalan GSH miktarının sebebi redoks balansı oluşturmaya çalışan gen ekspresyon seviyesindeki artış olabilir (Xu *et al.* 2003). GSH geridönüşümündeki bozulmanın yanısıra antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimler makromoleküllere hasar veren hücrel ROS birikimine ve mitokondri gibi organellerde disfonksiyona sebep olmaktadır (Yang *et al.* 2015).

Biyolojik olarak aktif form olan indirgenmiş GSH, GPx ve GST gibi çeşitli detoksifiye edici enzimler için kofaktör olarak davranır (Birben vd 2012). Glutatyon peroksidaz, glutatyonu indirgeyerek organik ve inorganik peroksitlerin detoksifikasyonunu sağlar (Iskusnykh *et al.* 2013). Ancak, GSH birkaç farklı şekilde antioksidan etki gösterir. GPx aracılığıyla hidrojen peroksit ve lipit peroksidasyonunu detoksifiye eder. GSH, elektronlarını H_2O_2 'ye verir, H_2O ve O_2 'ye dönüşümünü sağlar (Birben vd 2012).

Glutatyon oksidasyona uğradığında GSH disülfid (GSSG) oluşur (Ghezzi 2011). GSSG, glutatyon redüktaz tarafından e^- verici olarak NADPH'ı kullanmasıyla GSH'a indirgenir (Şekil 1.5) (Birben vd 2012).



Şekil 1.5. İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon dönüşümü (Sarkar *et al.* 1995)

Ayrıca GSH, vitamin C ve E'yi aktif formlarına dönüştürmede rol alır. GSH, pro-apoptotik ve anti-apoptotik sinyal yollarıyla etkileşerek hücreyi apoptozise karşı korur. Aynı zamanda aktivatör protein-1 (AP-1), nükleer faktör kappa B (NF-κB), spesifik protein 1 (Sp1) gibi çeşitli transkripsiyon yollarının redoks aktivasyonunu da aktive eder (Birben vd 2012).

Yükseltgenmiş Glutatyon (GSSG): Glutatyonun okside formu glutatyon disülfid (GSSG) olarak adlandırılır. Yüksek miktardaki GSSG çoğu enzime oksidatif olarak hasar verebilir (Valko *et al.* 2007).

GSH'nin GSSG'ye yükseltgenmesi intrasellüler redoks imbalansı oluşturup, GSH/GSSG oranında azalışa sebep olmaktadır (Circu and Aw 2012). GSH/GSSG oranı oksidatif stresi belirleyici önemli bir faktördür (Birben vd 2012). Oksidatif oluşum süresince, disülfid oluşumu için proteinlerin reaktif sisteinleri GSSG ile interaksyonu gerçekleşir, bu süreç S-glutatyolasyon (S-glutatyonylasyon) olarak adlandırılmaktadır. İntrasellüler GSH redoks durumu, NADPH gerektiren ve GR tarafından katalizlenen GSSG'nin indirgenmesi ile oluşmaktadır (Circu and Aw 2012).

Glutatyon redüktaz (GR): Glutatyon ilişkili enzim olan GR, ROS detoksifikasyonunda direkt veya indirekt olarak etki edebilmektedir. Aynı zamanda GSH homeostazisinden de sorumludur (Yang *et al.* 2015). GR, glutatyon S-transferaz

(GST) ve GSSG gibi çeşitli enzimler antioksidan savunma sisteminde birçok farklı rol alır (Tangvarasittichai 2015).

Glutasyon S-transferaz (GST): GST, doymamış aldehitler, epoksitler ve hidroperoksitler gibi sekonder metabolitleri inaktive eden diğer bir antioksidan enzim ailesidir. Sitozolik GST, mitokondriyel GST, membran-bağımlı mikrozomal GST olmak üzere üç temel GST ailesi tanımlanmıştır (Birben vd 2012). Glutasyon S-transferaz bir detoksifikasyon mekanizmasıdır. Bu enzim özellikle glutasyon S-transferaz B (ligandin), sitokrom P-450 uyarıcılarına bağlanmaktadır (Moron *et al.* 1979).

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD): Glukoz hücre içine taşındığında, hekzokinaz/glukokinaz enzimleri tarafından fosforilasyona uğrar. Glukoz-6-fosfat (G6P), adenozin trifosfat ve nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) oluşumundan enerji üretimi için glikoliz döngüsüne girer. Glikojen formunu oluşturarak enerjiyi depolanması ya da pentoz fosfat yolağı için (PPP) kullanılabilir. PPP aynı zamanda ‘heksoz monofosfat yolağı’ olarak da adlandırılmaktadır. Bu yolağın temel ürünleri nükleik asit sentezi için gerekli olan riboz-5-fosfat, G6PD, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP⁺)’dan oluşturulan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat dehidrogenaz (NADPH)’tır (Stanton 2012).

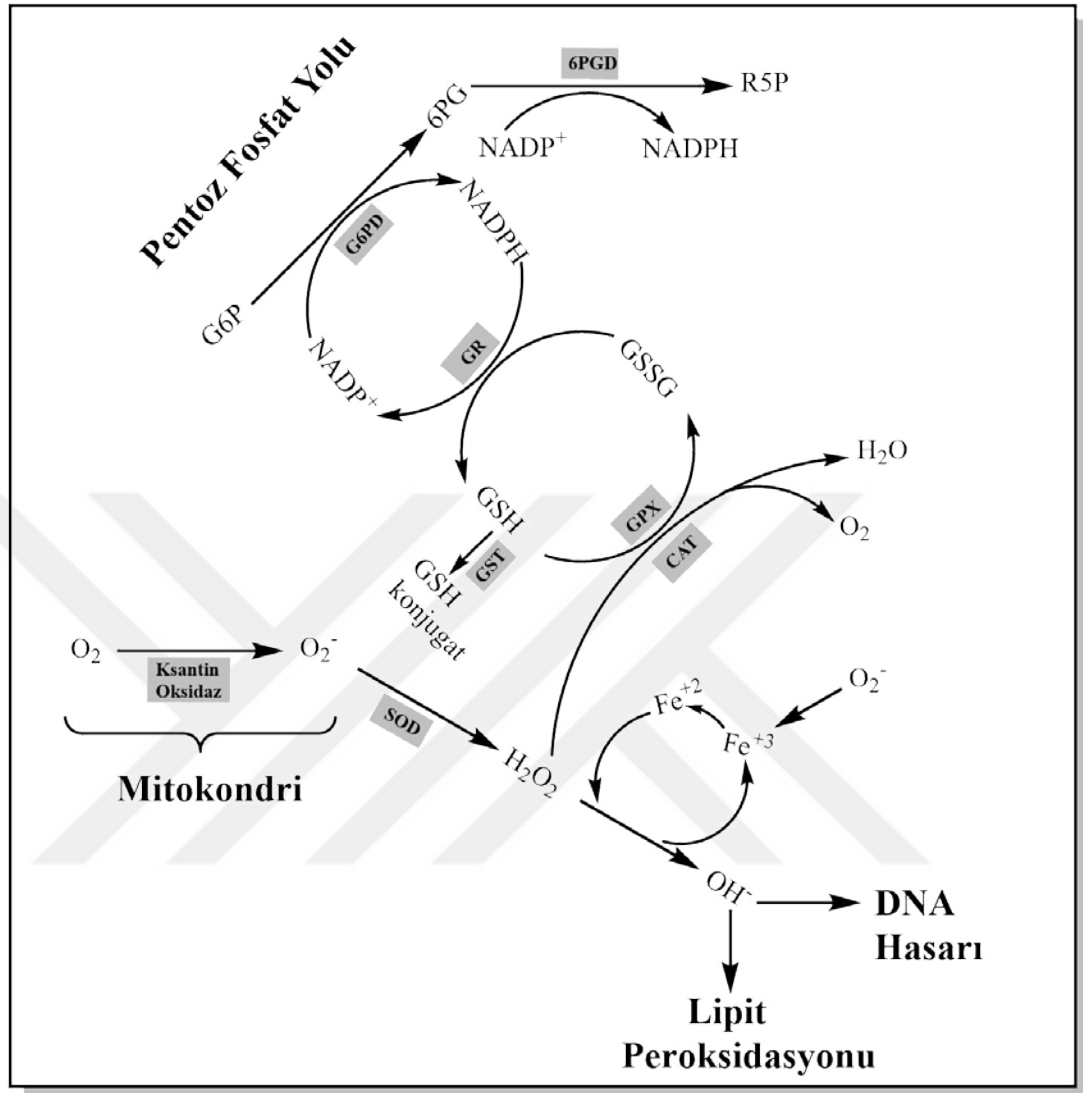
G6PD, pentoz fosfat yolağının ilk ve hız-sınırlayıcı enzimidir (Park *et al.* 2006). G6PD, α -D-glukoz-6-fosfatı D-glukono-1,5-lakton-6-fosfata dönüştürür ve hücrel redoksu sağlayan NADPH üretimi için gereklidir. Eritrositlerde sitrik asit döngüsü olmadığından dolayı tek NADPH kaynağı pentoz fosfat yolağıdır (Efferth *et al.* 2006). G6PD biyosentez, oksidatif stres regülasyonu ve hücrel büyüme gibi birçok metabolik yolağın oluşumunu sağlar (Ham *et al.* 2013). G6PD fonksiyon kaybı doğuştan gelen kusurlardan biri olup yaklaşık 400 milyon insanı etkileyen ve G6PD eksikliği olarak da bilinen bir hastalıktır (Efferth *et al.* 2006).

G6pd geni X kromozomu Xq28 bölgesinde lokalize olmaktadır ve hastalık erkeklerde resesif olarak aktarılmaktadır (Efferth *et al.* 2006). Evrimsel süreç boyunca yüksek derecede korunmaktadır (Stanton 2012). Fare embriyonik kök hücrelerinde G6PD delesyonu, NADPH/NADP⁺ oranında %50 azalmaya ve hücrelerin kimyasal, letal oksidanlara karşı duyarlı olmasına sebep olmaktadır (Wang *et al.* 2014).

G6PD aktivitesinin normal ve neoplastik hücre büyümesinde artış gösterdiği bilinmektedir. Aynı zamanda artan G6PD aktivitesinin ROS ilişkili hücre ölümü için esansiyeldir. Glikoz miktarındaki artış, glikoz bağımlı insülin salınımını bozmakta ve G6PD aşırı ekspresyonundan kaçmaktadır. Böylece uzun vadeli beta hücre kaybı G6PD seviyesinde azalışa neden olabilmektedir (Stanton 2012).

6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD): 6PGD oksidatif pentoz fosfat yolağındaki üçüncü enzim olup, 6-fosfoglukonatı (6-PG), Ribuloz-5-fosfata (Ru-5-P) dönüştürür ve NADPH üretir (Lin *et al.* 2015).

Antioksidanlar ve pro-oksidanlar arasındaki denge bozulunca oksidatif stres ortaya çıkar ve bu durum hücre fonksiyonunu bozarak hasar oluşturur (Şekil 1.6). Bozulan denge ya ROS seviyesinin aşırı artışı ya da antioksidan savunma sistemi etkisinin azalmasından kaynaklanır (Tangvarasittichai 2015). Hem enzimatik hem de non-enzimatik antioksidan sistemler oksidatif strese karşı mücadele etmede hücresel yanıt için gereklidir. Bu yüzden, CAT, SOD ve GPx gibi enzimler ile GSH gibi non-enzimatik elektron reseptörleri, oksidatif stresi ölçmek için kullanılan ve etki eden indekslerdir (Li *et al.* 2015).



Şekil 1.6. Antioksidan sistem ve oksidatif hasar yolağı (Budak *et al.* 2014; Tangvarasittichai 2015)

NADPH: Redüktif biyosentez ve hücrel redoks potansiyeli için önemli bir metabolittir. Yağ asitlerinin, izoprenoidlerin ve aromatik amino asitlerin redüktif biyosentezi için gerekli bir kofaktördür. NADPH'ın mekanizmalardaki önemine rağmen, NADPH homeotazisi hala tam olarak anlaşılamamıştır (Wang *et al.* 2014).

Hücrel NADPH oluşturan birçok yolak bulunmaktadır. NADPH memeli hücrelerinde pirüvat yolağında bulunan malik enzim (ME), trikarboksilik asit döngüsünde (TCA) bulunan izositrat dehidrogenaz (IDH), pentoz fosfat yolağının enzimleri olan G6PD ve

6PGD gibi çeşitli enzimler tarafından üretilmektedir (Park *et al.* 2006; Wang *et al.* 2014). NADPH üreten bu enzimler arasında, G6PD memeliler türlerinde evrimsel olarak en yüksek derecede korunanıdır (Park *et al.* 2006). G6PD, NADPH'ın kullanıldığı birçok hücresel proseslerde eşsiz bir öneme sahiptir ve inhibisyonu hücresel prosesleri bozmaktadır. Bu nedenle diğer enzimler hücreyi normal seviyeye çekmek için yeterli miktarda NADPH üretemez. Hücredeki enerji miktarını indirmek için NADPH kullanan birçok enzim bulunmaktadır (Stanton 2012). İntrasellüler NADPH, glikoz-6-fosfatın, 6-fosfoglukonata dönüşmesi süresince G6PD tarafından NADP^+ 'nın indirgenmesiyle oluşur (Birben vd 2012).

ROS oluşumu ve antioksidan sistem arasında oluşan denge hücre içi NAD(P)H - NAD(P)^+ oranı ile sağlanmaktadır. NADPH pro- ve antioksidanların temel bileşimidir. NADPH, glutatyon redüktaz aracılığıyla GSSG'nin GSH'a redüksiyonu için kofaktör olarak görev alır (Park *et al.* 2006). Bu sistemi düzenleyen üç major bileşen, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon sistemidir. Katalaz, hidrojen peroksiti suya dönüştürmek için NADPH'a gerek duymaz, ancak aktif formunu oluşturmak için NADPH'a bağlanan allosterik bağlanma bölgesine sahiptir (Stanton 2012). NADPH aynı zamanda glutatyonu indirgenmiş formunda tutmayı sağlamaktadır (Wang *et al.* 2014). NADPH'ın oluşumu ve G6PD, sitozolik GSH (GSH/GSSG dengesi) için önemli belirleyici faktördür (Birben vd 2012). GSH hücreyi tehlikeli oksidatif metabolitlere karşı korumaktadır ve hidrojen peroksidi, GPx yardımıyla suya dönüştürmektedir (Wang *et al.* 2014).

Ayrıca thioeredoksin (TRX), glutaredoksin ve peroksiredoksin sistemler, NADPH aracılığıyla antioksidan sistemin önemli kısmını oluşturmaktadır. NADPH, CAT'ın aktif formda kalmasını sağlar. TRX, GPx'in ko-substratı olan GR'yi kofaktör olarak kullanmasıyla GSSG'nin GSH'a dönüşmesini sağlar (Birben vd 2012; Nobrega-Pereira *et al.* 2016).

1.3. İnflamasyon, Kanser ve Metabolik Hastalıklar

İnflamasyon biyolojik, kimyasal ve çeşitli fiziksel faktörler tarafından indüklenmektedir. İnflamasyon ve kanser arasındaki bağıntı epidemiyolojik ve deneysel verilerle belirtilmiş ve kanser tedavisinde anti-inflamatör tedavilerin etkisinin önemli olduğu kanıtlanmıştır (Reuter *et al.* 2010).

Çevresel stres durumunda, ROS uzun süre boyunca sentezlenirse hücre yapısında, fonksiyonunda önemli derecede hasar meydana gelir ve somatik mutasyonları, neoplastik transformasyonu indükler. Ayrıca kanser başlangıcı ve ilerlemesi DNA mutasyonlarını, hasarlarını, genomik instabiliteyi ya da hücre proliferasyonunu artırarak oksidatif stresle ilişkili olmaktadır (Reuter *et al.* 2010).

Karaciğer ROS tarafından etkilenen başlıca detoksifiye edici organdır ve metabolik homeostaziye sağlar. Karaciğer fazla glikozun, glikojene dönüşümünü sağlaması haricinde, detoksifikasyon, protein sentezi, hormon üretimi, sindirim, demir gibi birçok temel vitamin ve mineralin depolanmasında yardımcı olmaktadır (Budak *et al.* 2014; Li *et al.* 2015; Muriel and Gordillo 2016). Parenkimal hücreler karaciğerde oksidatif stres kaynaklı hasara karşı tabi tutulan primer hücrelerdir. Kupffer hücreleri, hepatik stellat hücreleri ve endotelyal hücreleri oksidatif stres moleküllerine karşı daha çok hassastır. Bundan dolayı oksidatif stres kronik viral hepatit, alkolik karaciğer hastalıkları ve non-alkolik steatohepatit gibi çeşitli karaciğer hastalıklarına neden olan patolojik mekanizmalardan biri olarak kabul edilir (Li *et al.* 2015).

Dünya sağlık örgütüne göre, her yıl yaklaşık 100,000 insan kronik karaciğer hastalıklarından dolayı yaşamını yitirmektedir. Alkol tüketimi, iltihap ve kaza yaralanmalarının yanı sıra yaşlanma da kronik karaciğer hastalıkları oluşumunda önemli faktörlerdendir (Yang *et al.* 2015). Karaciğerde inflamasyon oluşumu adenoma ve karsinoma gelişiminin yanısıra bağırsak gibi distal organlarda karsinogenez oluşumuna da neden olmaktadır (Gerner *et al.* 2013). Sistemik oksidatif stres, amonyak ile sinerjistik olarak hareket ederek kronik karaciğer bozukluğunda beyin ödemine neden

olabileceği öne sürülmüştür. Böbrek rahatsızlığı ile ilgili olarak, sistemik oksidatif stres çeşitli böbrek hastalıklarının patofizyolojisinde de kritik öneme sahip olduğu belirtilmiştir (Li *et al.* 2015).

Metabolik hastalıklarda, oksidatif stresin moleküler sonuçları endotelial hücre disfonksiyonu yüzünden diyabet ile ilişkisi olduğu bilinmektedir. Ancak yakın zamandaki çalışmalar oksidatif stres ve metabolik disfonksiyonun tip2 diyabette önemli rol aldığını belirtmektedir. Bu yollar aynı zamanda adiposit ve kas hücrelerinde, inflammatör ve insülin direnci yollarıyla birleşerek pankreatik β hücrelerinden insülin salınımını bozmuştur. Hem NF- κ B hem de JNK yolları oksidatif stres koşullarında aktive olabilir ve bu durum ROS'un insülin direnci oluşturma özelliği olabileceğini göstermektedir. Obezite, insülin direnci ve tip 2 diyabet, anormal sitokin üretimi, akut faz reaktantları ve diğer medyatörlerin artışı ve inflammatör sinyal yollarının artması aracılığı ile karakterize olan 'kronik inflamasyon' ile yakından ilişkilidir (Hotamisligil 2006). Obezite durumunda, yağ asitleri ve diğer metabolitlerdeki artış oksidatif fosforilasyon ve ATP oluşumuna neden olur. Ayrıca oksidatif stres ve ROS/RNS ürünlerinde artışa sebep olur (Li *et al.* 2015). Kronik oksidatif stres, hiperglisemia ve dislipidemia en düşük antioksidan seviyesinden β -hücreleri için zararlıdır, yüksek oksidatif enerji gerektirmektedir, β -hücre genlerinin ekspresyonunu azaltır ve hücreyi ölüme sürükler. β -hücre fonksiyonu azalırsa, insülin üretimi, insülin salınımını uyaran glikoz bozulması, hiperglisemi ve sonuç olarak tip 2 diyabet gelişimine sebep olur (Tangvarasittichai 2015).

Yaşlanmak ise bütün organizmaların yaşamında olan normal bir olaydır. Yaşlanma hücre fonksiyonların hasara karşı verdiği yanıt zamanla azalması ile karakterize olmaktadır. Yaşlanma ile birlikte karaciğer atrofiye maruz kalır, ağırlığının %25-35'ini kaybeder ve böylece kan akışı azalır. Brown atrofi hepatositlerde yüksek miktarda oksitlenmiş çözülebilen proteinlerin (lipofuscin) birikmesinden oluşur. Lipofuscin kronik oksidatif stresle ilişkilidir ve hasarlı, denatüre proteinleri degrades edememektedir. Bu yüzden, oksidatif stres memelilerde yaşlanma ile ilişkili değişikliklere büyük katkı sağlayan unsurlardan biri olarak ele alınmaktadır. Yaşlanma

süresince artan oksidatif stres ve onu takip eden moleküler hasar, reaktif oksijen türleri oluşumunda artışa sebep olmaktadır ve dokularda çeşitli hastalıkları oluşturan oksidatif hasara karşı duyarlılık geliştirir (Yang *et al.* 2015).

1.3.1. ROS, apoptozis ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) sinyal yolağı

NF- κ B proteinleri, inflamasyon ve immünitede önemli rol oynayan transkripsiyon faktörü ailesidir. Hücre büyümesi, proliferasyonu gibi birçok patolojik süreçte görev almaktadır (Morgan and Liu 2011). NF- κ B proteinleri, 10 bç uzunluğunda κ B bölgesine homodimer veya heterodimer olarak bağlanan beş farklı aile üyesi içermektedir. Bu üyelerin hepsi Rel-Homoloji Domaini (RHD) içerir. Bu bölge DNA'ya bağlanma ve dimerizasyon için gereklidir. Bu ailenin üç Rel üyesi, RelA (p65), RelB ve cRel, gen ekspresyonunu düzenleyen C-terminal transkripsiyon aktivasyon domaini (TAD) içerir. Diğer iki memeli NF- κ B proteinleri p105 ve p100 prekürsör proteinleri olarak sentezlenir. Bu proteinlerde TAD bölgesi eksiktir ve Rel proteinlerinden herhangi biriyle heterodimer oluşturmadıkça genellikle transkripsiyonel olarak aktif değildir (Hatada *et al.* 1992; Hayden and Ghosh 2008; Vallabhapurapu and Karin 2009). RelB hariç bütün NF- κ B proteinleri, diğer üyeleriyle homodimerizasyon ya da heterodimerizasyon yapma özelliğine sahiptir. RelB yalnızca heterodimer oluşturabilmektedir (Morgan and Liu 2011).

NF- κ B aktivitesi, I κ B proteinleri tarafından düzenlenmektedir ve genellikle DNA bağlanmasını inhibe etmektedir. Bu proteinlerin üçü (I κ B α , I κ B β ve I κ B ϵ) 'tipik' I κ B olarak tanımlanmaktadır. Diğer ikisi; I κ Bs ve I κ B ζ 'atipik I κ B' olarak adlandırılır. Bu proteinler NF- κ B proteinlerine bağlanarak bunların DNA'ya bağlanmalarını engeller (Morgan and Liu 2011).

ROS, çeşitli hücrel mekanizmalar ve sinyal yolları tarafından oluşmaktadır ve oksidatif stres oluşturup lipitler, proteinler ve nükleik asitlerde hasar meydana getirdiğinden dolayı bazı seviyelerde toksik etkiye sahiptir. ROS üretimine karşı oluşan doğru hücrel yanıt oksidatif stresi engellemeye katkı sağlar. Ancak fazla miktarda

Kanonik NF- κ B yolağı genellikle TNF reseptör süper ailesi, Toll benzeri reseptör (TLR) ve sitokin reseptör aileleri gibi pro-inflamatör reseptörlerin uyarılmasıyla aktive olmaktadır. Dominant negatif I κ B- α 'nın overekspresyonu, granüositler tarafından sitokinlerin üretiminde NF- κ B'nin önemli rol oynadığını göstermektedir. Nötrofil türevli sitokin ve kemokinler *in vivo* inflammatör ve immün reaksiyonlarda önemli rol oynamaktadır (Ear and McDonald 2008).

1.3.2. Karsinogenez ve metadherin aktivasyonu

Astrosit elevated gen-1 (AEG-1), insan primer fetal astrositlerinden HIV-1 kaynaklı transkript olarak klonlanmıştır. Ayrıca insan metadherin geni olarak da bilinmektedir. AEG-1 aktivasyonu TNF- α , glikoprotein 120 (gp120) ve onkogenik Ha-ras tarafından tetiklenir. AEG-1 ubiquitöz olarak insan malignant glioma ve meme kanseri gibi çeşitli hücre tiplerinde ekspresyona uğrar. AEG-1, lipopolisakkarit (LPS) yanıt genidir ve NF- κ B aktivasyonu aracılığıyla LPS kaynaklı TNF- α ve prostaglandin E2 (PGE₂) üzerinde önemli rol oynamaktadır. AEG-1, LPS ilişkili TLR4'ün gen ekspresyonu için düzenleyici (regülatör) molekül olarak düşünülmektedir (Khuda *et al.* 2009).

1.3.3. Epigenetik mekanizmalar, ROS ve karsinogenez arasındaki ilişki

Epigenetik terimi, hücre proliferasyonu ve gelişimi süresince gen ekspresyonundaki kalıcı değişikliklerin tanımı için kullanılmaktadır (Jaenisch and Bird 2003). Memelilerde temel epigenetik modifikasyonlar DNA metilasyonu ve asetilasyon, fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlardır (Ropero and Esteller 2007).

Ökaryotlarda kromatin içindeki DNA'ların paketlenmesi, transkripsiyon, replikasyon ve DNA onarımına engel olmaktadır. Kromatin yapı ve fonksiyonu, nükleozomal histonların amino-terminal uçlarının post-translasyonel modifikasyonları tarafından etkilenmektedir. Bunların arasında en çok bilineni lizin asetilasyonudur. Asetilasyon, transkripsiyonel aktivasyonun yanı sıra DNA replikasyonu, histon depozisyonu ve DNA onarımı ile bağlantılıdır. Histon asetilasyonu, histon asetiltransferazlar (HAT)

tarafından katalizlenmektedir ve protein-protein etkileşimlerini düzenler. Bu olayın tersi ise histon deasetilazlar (HDAC) tarafından meydana gelmektedir. HAT ve HDAC'lar mayadan insanlara kadar yüksek derecede korunmuş birçok sınıf içermekte olup transkripsiyon faktörlerini düzenlerler (Legube and Trouche 2003).

Histon asetilasyonu, DNA replikasyonu, onarımı ve gen transkripsiyonunda modülatördür. HDAC'lar ise korepresör komplekslerde bulunmakta, histonlardan asetil gruplarını çıkararak transkripsiyonel olarak baskılanan sıkı kromatin yapısının oluşmasına sebep olmaktadır (Delcuve *et al.* 2012).

Mayalardaki HDAC'larla homolojisine göre farklı alt sınıflara ayrılabilen 18 tane memeli histon deasetilaz enzimi belirlenmiştir. Mayalarda Rpd3 homoloğu olan sınıf I ailesi insan hücre ve dokularında eksprese olup nükleer lokalizasyona sahip olan HDAC 1, 2, 3 ve 8'i içerir. Sınıf II, mayalarda Hda1 homoloğu olup iki alt sınıfa ayrılır: IIa (HDAC 4, 7 ve 9) ve IIb (HDAC 6 ve 10). Sınıf II dokuya özgün ekspresyona sahip olup nükleus ve sitoplazmada bulunur. Yakın zamanda keşfedilen HDAC11, sınıf IV ailesinin tek üyesidir. Sınıf III HDAC'lar, sirtuin (SIRT 1-7) olarak da bilinirler ve maya Sir2 ailesi ile homolojiye sahiptir (Ropero and Esteller 2007).

Sirtuin'ler (SIRT) sınıf III histon/protein deasetilazlara (HDAC) aittir ve silent information regülatör 2 (Sir2) ailesinin üyesidir. Bu ailenin üyeleri yaşlanma, hücre döngüsü regülasyonu, apoptozis, metabolizma ve inflamasyon gibi durumlarda rol alırlar. Bu üyeler mayada beş homolog (ySir2 ve Hst1-4) ile insanda yedi homologa (SIRT1-7) sahiptir. Asetil gruplarının hidrolizi için bir molekül su grubu tüketen Sınıf I ve II HDAC'ların tersine, sirtuinler deasetilaz reaksiyonu için ko-substrat olarak NAD^+ 'ya ihtiyaç duymaktadır (Yang *et al.* 2007).

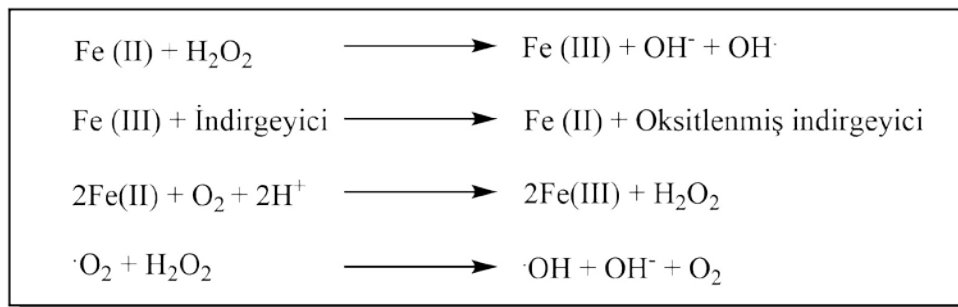
SIRT1 en çok çalışılan aile üyesi olup, hücre dönüğüünün düzenlenmesinden enerji homeostazisine kadar birçok işlemde rol almaktadır (Nogueiras *et al.* 2012). SIRT1 çeşitli histon, transkripsiyon faktör ve kofaktörünü deasetilleyerek yaşlanma ilişkili nöronal hastalıkların yanı sıra obezite, insülin direnci ve hepatik steatosis gibi metabolik

hastalıklara karşı koruyucu etkiye sahiptir (Nakagawa and Guarente 2014). SIRT3'ün, mitokondriyel enerji metabolizmasında rol aldığı bulunmuştur. Birçok çalışma SIRT1 ve SIRT3'ün farklı kanser türlerinde önemli role sahip olduğunu göstermiştir. SIRT1 ve SIRT3 yaşlanma, metabolik sendrom ilişkili kanserlerde tümör süpresör aktiviteye sahiptir (Nogueiras *et al.* 2012).

SIRT3 majör mitokondriyel deasetilazdır ve hücre metabolizmasındaki birçok enzimi hedef almaktadır. SIRT3'ün mitokondriden ROS üretimini de düzenlemekte olduğu bilinmektedir. Ayrıca, SIRT3 eksikliği hücrel ROS seviyesini artırıp tümör oluşumu gibi birçok patolojik durumu oluşturabilir (Jeong *et al.* 2015).

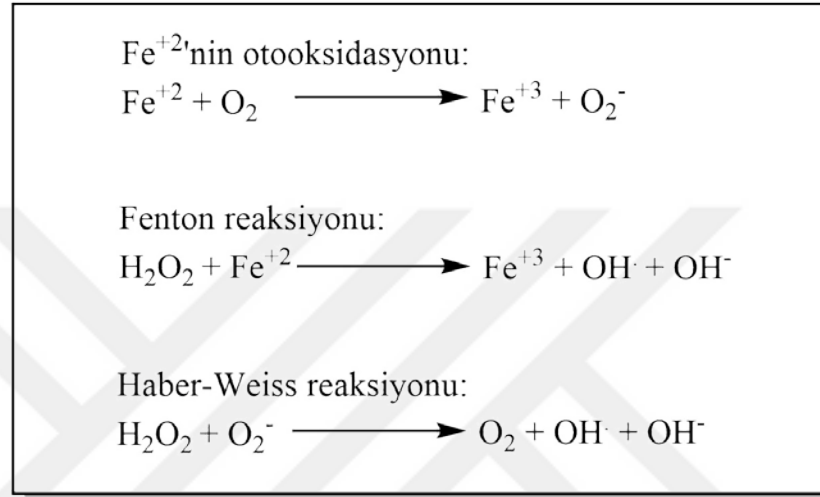
1.3.4. İnflamasyonun oksijen ve demir metabolizması üzerine etkisi

Demir, yaşamın sürdürülebilmesi için temel elementlerden biridir ve elektron transportu, DNA sentezi, eritropoez gibi birçok biyolojik proseste rol almaktadır. Demir (Fe) elementi, ribonükleotit redüktaz (RR) ve DNA sentezinde hız sınırlayıcı enzimlerin aktif bölgeleri için gerekli olduğundan dolayı elzemdir. Demir, ferröz (Fe^{+2}) ve ferrik (Fe^{+3}) demir olmak üzere iki okside forma sahiptir. Demirin bir elektron alıp vermesiyle bu formların dönüşümü gerçekleşir. Vücutta demirin varlığı oksijen transportu için önemlidir, ayrıca bu moleküllerin hasar verici etkilerinin olduğu da vurgulanmaktadır. Fenton tarafından 1894 yılında hidroksil radikali üretiminde demirin rolü açıklanmıştır. Bu metalin indirgenmiş formu oksijenle interaksyona girerek H_2O_2 üretimine neden olmakta ve Fenton reaksiyonunu başlatmaktadır (Şekil 1.8) (Richardson *et al.* 2009).



Şekil 1.8. Demir metabolizması ve radikal oluşumu (Richardson *et al.* 2009)

Demir katalizlemesi sonucu hidroksil radikali ve hidroksit anyonunun oluşması ise Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinmektedir (Richardson *et al.* 2009). Fenton ve Haber Weiss reaksiyonları aracılığıyla lipid peroksidasyonu, $\text{OH}\cdot$, H_2O_2 ve $\cdot\text{O}_2^-$ oluşumuna neden olan demir otooksidasyonu gerçekleştirir (Şekil 1.9). (Tangvarasittichai 2015).



Şekil 1.9. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları (Tangvarasittichai 2015)

Yetişkin bir insan vücudundaki demirin yaklaşık %25-30'u intrasellüler depo demir proteini olan ferritine bağlı bir şekilde bulunmaktadır. Ferritin bütün hücrelerde eksprese olmaktadır ve demirin uzaklaştırılmasından sorumludur. Diğer demir bağlayıcı proteinler gibi, ferritin de demire bağlanır ve bağlanmamış metallerin toksik etkilerini engellemeye çalışır. Hücre demir artışına gerek duyduğunda, transferrin (serum Fe-transport protein) yardımıyla demirin depo kaynaklardan taşınarak salınımı sağlanır (Richardson *et al.* 2009).

Demir alınımı gen seviyesinde, demir regülatör proteinleri 1 ve 2 (IRP1 ve IRP2) tarafından düzenlenir. Bu sitozolik proteinler, post-transkripsiyonel regülatör bağlantısı oluşturan demir sensörleri tarafından belirlenmektedir. Hem IRP1 hem de IRP2, demir yanıt elementi (IRE)'yi tanıyıp, bu elemente spesifik bağlanma özelliğine sahiptir. IRP-IRE mekanizması neredeyse bütün hücrelerde bulunan intrasellüler Fe seviyesi ve

transferrin reseptör protein 1 (TfR1), ferritin, ferroportin-1 (FPN-1) gibi ilişkili moleküllerin ekspresyonunda rol almaktadır (Richardson *et al.* 2009).

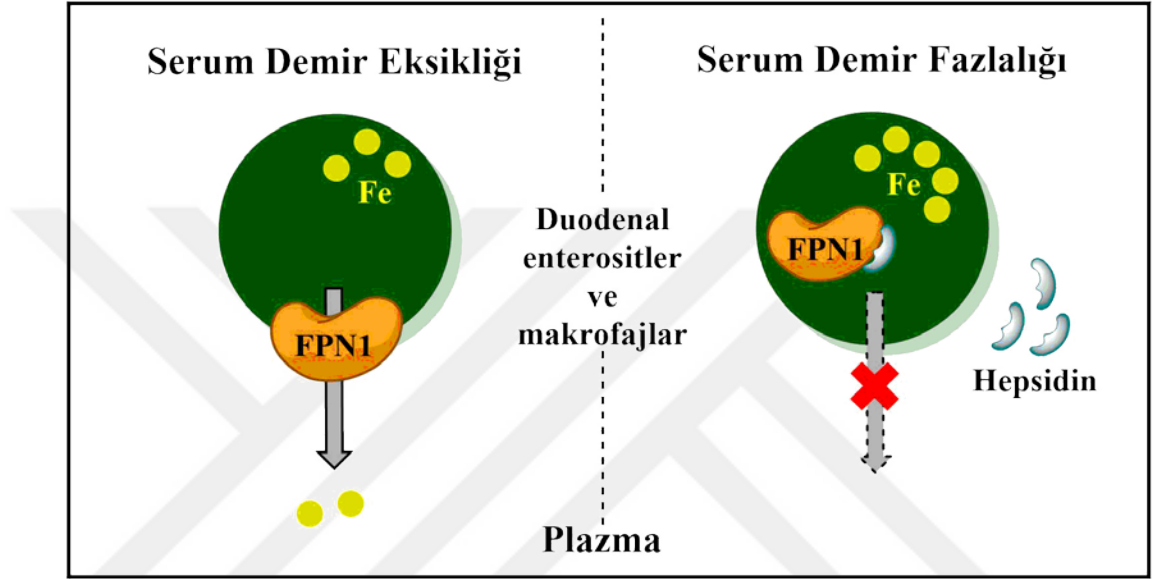
Hücrel demir homeostazisi, normal hücre fonksiyonu için kritik öneme sahiptir. Demir eksikliği hücre büyümesini engellemekte ve hücre ölümüne sebep olmaktadır. Bu homeostazideki bozukluklar nörodejeneratif, kanser gibi birçok hastalığa öncülük etmektedir. Hücrel demir homeostazisi demir alımı, depolanması ve taşınımındaki proteinlerin ekspresyonları arasındaki koordinasyon ve denge ile sağlanmaktadır. Hücrel demir homeostazisi, demir regülatör proteinleri (IRP1 ve IRP2) tarafından düzenlenmektedir. Yakın zamandaki çalışmalar IRP'lerin sadece hücrel demir seviyesiyle değil aynı zamanda ROS'lar tarafından da etkilendiğini ispatlamıştır (Jeong *et al.* 2015).

ROS oluşumu sonucu olarak yüksek demir seviyesi, kanser gelişimi için risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Çeşitli çalışmalar da kolorektal, karaciğer, böbrek, akciğer ve mide kanserleri ile demir arasında ilişki olduğunu belirtmiştir (Richardson *et al.* 2009).

Hepsidin, vücudun demir homeostazisini sağlayan ve karaciğerden salınan 20 ile 25 aminoasitlik peptitler içeren iki predominant formdan oluşan bir hormondur. Hepsidin salınımı karaciğerde başladığında, duodenal enterositlerin bazodermal yüzeyine doğru harekete geçerek FPN1'in degradasyonuna sebep olur ve hücredeki demirleri yakalar. Normal koşullarda, hepsidinin vücut demir depolarıyla zıt ilişkisi vardır. Bu durum hücrelerdeki demir mobilizasyonunu ve ince bağırsaktaki demir absorpsiyonunu azaltmaktadır (Richardson *et al.* 2009; Darshan *et al.* 2010).

Hepatik hepsidin ekspresyonu, sistemik inflamasyon, eritropoez mekanizmalar sonucu vücut demir depolarındaki değişikliklerden etkilenmektedir. Hepsidin demir alımı yüksek seviyede olduğunda vücuttaki demir seviyesini düzenlemektedir. İnflamasyon ve enfeksiyon durumunda makrofajlarda hepsidin üretimi uyarılmakta ve plazma demir seviyesinde azalışa neden olmaktadır. İnflamatör sitokinleri (IL-6 gibi) JAK/STAT

yolağını aktive ederek hepsidin ekspresyonunu uyarmaktadır. Ancak bu uyarıların hepsidin ekspresyonunu nasıl etkilediği kısmen anlaşılmıştır (Darshan *et al.* 2010). Serumda yüksek demir seviyesine paralel olarak, FPN1 aracılığıyla hepsidin seviyesinde artış gözlemlendiğini belirtmiştir (Şekil 1.10) (Nemeth and Ganz 2006).



Şekil 1.10. Serumdaki demir seviyesi ve hepsidin ilişkisi (Nemeth and Ganz 2006)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Uzun süreli iritasyonların kanser oluşumuna sebep olabileceği 5000 yıl önce yazılmış geleneksel Ayurvedic’de (Uzun yaşamın sırları) anlatılmıştır. İritasyonun aynı etkilere sahip olup olmadığı 19.yy’da Rudolf Virchow’un tanımladığı inflamasyonla belirsizdir. Virchow öncelikle inflamator hücrelerinin tümörlerde bulunduğu ve tümörün kronik inflamasyon bölgelerinden oluştuğunu belirtmektedir. Bu inflamasyon kanser gibi hastalıklar için ‘secret killer’ olarak tanımlanmaktadır. Örneğin, ülseratif kolit ve crohn hastalığı, kolon adenokarsinomasında risk faktörü oluşturmaktadır, kronik pankreatitis ise pankreatik kanserlerin oluşumuyla ilişkilidir (Reuter *et al.* 2010).

Carrageenan (CGN) hücre ve hayvan deneylerinde inflamasyon oluşturucu olarak kullanılmaktadır. Et, soya sütü, kozmetik, diş macunu, oda spreyleri ve farmasötik maddelerin üretim proseslerinde kıvamlaştırıcı, stabilize ve emülsifiye edici olarak kullanılmaktadır. Carrageenalar yüksek derecede sülfat içeren polisakkaritler olup kırmızı algler (Rhodophyceae) tarafından üretilmektedirler. Birçok çalışmada Carrageenan’a maruz kalan memelilerde inflamasyon, ülser, polip ve kolorektal tümörlerin oluştuğu tespit edilmiştir. Borthakur *et al.* (2012) Carrageenan; Toll benzeri reseptör 4 (TLR4), B hücre lenfoma 10 (BCL10), I kappaB kinaz (IKK) γ ve fosfo-IkB ilişkili RelA aktivasyonu, RelB’nin nükleer translokasyonu üzerinden IKK α -ilişkili non-kanonik yolağın aktivasyonu, ısı şoku protein 27 (Hsp27) ve IKK β gerektiren ROS ilişkili yolak aktivasyonu gibi üç mekanizma aracılığıyla inflamator yanıtı tetiklemektedir. Yakın zamandaki fare ve hücre çalışmalarında CGN kaynaklı inflamasyonun glukoz intoleransı, insülin direnci ve insülin sinyalinde bozukluklara da sebep olduğu tespit edilmiştir (Borthakur *et al.* 2012).

Bhattacharyya *et al.* (2008) CGN muamelesi sonucu, doku kültüründeki insan kolonik epitelyal hücreleri NF κ B nükleer translokasyonunu ve interleukin-8 (IL-8) salınımını Bcl10 ve ROS aracılığıyla iki farklı yoldan artırdığını belirlemiştir (Bhattacharyya *et al.* 2008).

IL-6 ise akut faz yanıt regülasyonunu içeren ve ilk karakterize edilen pro-inflamatör sitokin olup inflamasyon, immün cevap ve hematopoezde rol alan çözülebilir medyatördür. İnflamasyonun başlangıç aşamasında IL-6 lokal bölgelerde üretildikten sonra kan yoluyla karaciğere taşınır ve C-reaktif protein (CRP), serum amiloid A (SAA) gibi çeşitli akut faz protein üretimini indükler. Diğer taraftan fibronektin, albümin ve transferrin üretimini ise azaltır (Tanaka *et al.* 2014). IL-6'nın potansiyel hücre proliferasyonu düzenleyicisi olduğu karaciğer ve immün sistem hücrelerindeki çalışmalar sonucu ortaya konmuştur. Bu nedenle IL-6 inflamasyon, insülin direnci, kardiyovasküler hastalıklar için marker olarak kullanılabilir. (Kamimura *et al.* 2003; Matos *et al.* 2012; Tanaka *et al.* 2014).

Tanaka ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan çalışmada patojen reseptörleri tarafından tanınan patojen ilişkili moleküler yapıların (PAMP) pro-inflamatör sitokinleri indüklediği gösterilmiştir. Hücre zarında bulunan TLR4 reseptörünün LPS'yi tanıyarak NF- κ B sinyal yolağı aktivasyonu aracılığıyla mRNA seviyesinde IL-6 üretimini indüklediği görülmüştür (Tanaka *et al.* 2014).

Çeşitli çalışmalar obez adipöz dokulardan yüksek miktarda IL-6, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), resistin ve monosit kemoatraktant protein 1 (MCP1) gibi inflammatör sitokin salındığını belirlemiştir. Ayrıca, obez örneklerde adipöz dokular ve makrofajlar arasındaki ilişki kronik inflammatörde ve obezite ilişkili metabolik sendromda önemli rol oynamaktadır (Park *et al.* 2006).

TNF (veya TNF- α), makrofajlar ve T lenfosit hücreleri tarafından üretilmekte olan 26 kDa ağırlığında bir proteindir. Matriks metaloproteinazları tarafından ekstraselüler domaininden ayrılarak 17 kDa ağırlığında çözülebilir forma dönüşür ve plazma membranında eksprese olmaktadır (Bradley 2008). TNF- α yaklaşık 19 sitokin içeren peptit medyatör ailesinin üyesi olan pleiotropik sitokindir. Doğal ve adaptif immünite, hücre proliferasyonu, apoptotik proseslerde temel rol alan pro-inflamatör özelliklere sahiptir. Bu sitokinler makrofajlar, monositler, T-hücreleri, düz kas hücreleri, adipositler ve fibroblastlar olmak üzere çeitli hücrelerden üretilmektedir. TNF- α 'ya

biyolojik yanıt, tip I (tümör nekrozis faktör reseptör tip I (TNF-RI); p55) ve tip II (TNF-RII; p75) iki farklı yapısal reseptör aracılığıyla ligandların bağlanması ile gerçekleşir. Bu iki reseptör de intrasellüler sinyal yollarında bağlanma afinitelerine göre farklılaşır. Bu yolun uyarılmasıyla, TNF-RI intrasellüler domaini, TNF reseptör ilişkili apoptoz domain (TRADD) proteinine bağlanır ve Fas-iliskili apoptoz domain (FADD) proteini aracılığıyla apoptotik mekanizmayı, TNF reseptör ilişkili faktör 2 (TRAF2) aracılığıyla da pro-inflamatör mekanizmayı aktive eder. Bu durum sonucunda NF- κ B aktivasyonu da gerçekleşir (Popa *et al.* 2007).

Adipoz doku infiltre edici lökositler, obezite ilişkili inflamasyon durumunda pro-inflamatör sitokinlerin temel kaynağıdır. Adipoz doku önemli miktarda çeşitli pro-inflamatör sitokinleri içermektedir. Böylece obezite ve tip 2 diyabet (T2D), karaciğer yağlanması (NAFLD) gibi ilişkili hastalıklar anormal seviyede sitokin üretimi, C-reaktif protein (CRP) gibi akut faz reaktanlarının seviyesindeki artış ve inflamator sinyal yollarının aktivasyonu ile paralel olan kronik inflamator süreç tarafından karakterize olmaktadır (Gerner *et al.* 2013). Adipositokinler adipoz doku tarafından üretilen çözülebilir medyatörler olarak tanımlanmaktadır. Prototipik pro-inflamatör sitokin TNF- α , obezite ve insülin direnci ile ilişkisi belirlenmiş ilk adipositokindir (Hotamisligil *et al.* 1993). Crespo *et al.* (2001) yaptıkları çalışmada obezitenin NAFLD beraberinde oluştuğunu ve NAFLD hastalarının karaciğerlerinde TNF- α ekspresyonunda artış olduğunu tespit etmişlerdir (Crespo *et al.* 2001). Moschen *et al.* (2010) yaptıkları çalışmada adipoz ve pro-inflamatör sitokinlerin karaciğerdeki ekspresyonlarında kilo kaybının etkisini araştırmışlardır (Moschen *et al.* 2010). TNF- α 'nın karaciğer hastalıkları ve NAFLD inflamasyonu oluşturduğu da belirtilmiştir (Tilg and Diehl 2000).

Nanji *et al.* 2001 yılında yaptıkları çalışmada dişi sıçanlar etanol ile diyetle sokulmuştur. Bunun sonucunda endotoksemi ve lipid peroksidasyon seviyesinde artış gözlenmiştir. Bu durum beraberinde NF- κ B aktivasyonu ve kemokin üretimi sonucu karaciğer hasarında artış gözlenmiştir. Ayrıca TNF- α ve COX-2 upregülasyonu ile önemli derecede karaciğer hasarı meydana geldiği saptanmıştır (Nanji *et al.* 2001).

Ercal ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı çalışmada Wistar cinsi erkek sıçan kullanılmış ve 14 gün boyunca arsenit muamelesi sonucu ekstrakte edilen böbrek dokularında SOD ve CAT aktivitesinde azalış, lipid peroksidasyon seviyesinde ise artış gözlenmiştir. Fakat karaciğer dokularında lipid peroksidasyon seviyesi ve SOD aktivitesinde önemli bir değişime rastlanmamıştır. Karaciğer GSH seviyesi artış göstermiş ve GR, GST aktiviteleri gibi antioksidan bileşenler arsenit kaynaklı oksidatif hasara karşı koruyucu etki göstermiştir (Ercal *et al.* 2001).

Budak *et al.* tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada karaciğer dokularındaki GSH seviyesinin non-toksik demir konsantrasyonu varlığında önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Ancak GSH seviyesinde doz-bağımlı azalış uzun süreli demir toksisitesi ile görülmüştür. GSH seviyesinde 30 ppm konsantrasyonda azalışa rastlanırken, 3 ve 300 ppm konsantrasyonlarda değişiklik gözlenmemiştir (Budak *et al.* 2014). Valko *et al.* 2007 yılında kolon ve meme kanseri hastalarının kanlarında yaptığı çalışmada GSH/GSSG oranının kontrol gruplarına kıyasla önemli derecede azalış gösterdiğini gözlemlemişlerdir (Valko *et al.* 2007).

Non-enzimatik sistemlerin yanısıra hücresel homeostaziyi sağlayan enzimatik sistemlerin de, alkolden etkilendikleri çalışmalarla kanıtlanmıştır. Özellikle, Mallikarjuna *et al.* (2010), Shanmugam *et al.* (2011), Dahiru ve Obidoa (2007) yaptıkları çalışmalarda alkol muamelesi sonucu hayvanlarda lipid peroksidasyonu seviyesi, SOD, CAT, GPx, GR ve GST aktivitelerinde değişiklik oluştuğunu gözlemlemiştir (Dahiru and Obidoa 2008; Mallikarjuna *et al.* 2010; Shanmugam *et al.* 2011).

Kadmiyum (Cd) farklı dokularda membran lipidlerinin peroksidasyonunu sağlayarak oksidatif hasar oluşturabilir ve antioksidan sistem üzerinde değişikliğe neden olabilir. Hücre membranındaki peroksidatif hasar hücre komponentlerinde soruna neden olur. Sarkar 1995 yılındaki çalışmasında Cd enjeksiyonundan (0,4 mg/kg) 3 saat sonra sıçan kalp dokusunda lipid peroksidasyonu önemli derecede arttığını gözlemlemiştir. Karaciğer ve böbrekte ise 6-12 saat sonra artış olmuştur. Antioksidan enzimler ve diğer

antioksidanlar hücreyi oksidatif hasara karşı korumaktadırlar. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi kalp, karaciğer ve böbrek dokularında Cd intoksikasyonundan 24 saat sonra artış göstermiştir. Katalaz (CAT) aktivitesi Cd enjeksiyonundan 9 saat sonra önemli derecede artış göstermiştir, ancak böbrek ve karaciğer dokularında önemli bir değişim gözlenmemiştir. GSH içeriği ve GR aktivitesi Cd enjeksiyonundan 72 saat sonra kalp, karaciğer ve böbrek dokularında azalış göstermiştir, bu durum dokularda lipid peroksidasyonunda artış olduğunu kanıtlamaktadır. SOD ve CAT aktivitesindeki artış kalp dokusunun Cd kaynaklı lipid peroksidasyonuna karşı bir savunma mekanizması olabileceğini ortaya koymaktadır (Sarkar *et al.* 1995).

Stanton 2012 yılında yaptığı çalışmada çeşitli hücre tipleri kullanarak G6PD aktivitesinin hücre büyümesiyle korele olduğunu gözlemlemiştir. Böylece G6PD overekspresyonu hücre büyümesini uyarmaktadır. Bazı çalışmalar orta seviyede glikoz seviyesindeki artışın G6PD aktivitesini belli şartlarda artırabileceğini göstermektedir. Örneğin, bazı araştırmacılar kandaki glikoz seviyesindeki artışın kalp kası ve aorttaki G6PD aktivitesinde artışa sebep olabileceğini kanıtlamıştır. Yüksek G6PD aktivitesi, NADPH oksidaz aktivitesi için NADPH sağlamaktadır. Artan NADPH oksidaz aktivitesi ROS seviyesinde artışa ve böylece hücre hasara sebep olmaktadır. Bu durumun diğer çalışmalarla kıyaslandığında hayvan modellerinde yanıt ve farklılıklarda hücre heterojenitesine etki edip etmediği hala tam olarak anlaşılamamıştır (Stanton 2012).

Park *et al.* (2005) G6PD'nin fizyolojik rolünü belirlemek için siRNA'lar aracılığıyla G6PD ekspresyonunu baskılamışlardır. G6PD knockdown hücrelerde adiposit farklılaşmasında bozulma olup, intrasellüler lipid birikimine ve adiposit marker gen ekspresyonunda artış meydana gelmiştir. Bunun sonucunda yüksek seviyede G6PD'nin yağ hücrelerinde anormal seviyede lipid metabolizması ve insülin direncine sebep olduğu anlaşılmıştır (Park *et al.* 2005).

Çeşitli obez hayvan modellerinin adipoz dokularında G6PD aşırı eksprese olmaktadır. G6PD'nin aşırı ekspresyonu insülin direncine, lipid metabolizmasında ve adipositokin

ekspresyonunda disregülasyona sebep olmaktadır. Park *et al.* (2006), adipositlerdeki G6PD ekspresyonundaki artışın oksidatif stres ve NF- κ B sinyalini teşvik ettiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca, G6PD overekspresyonu makrofaj spesifik gen ekspresyonunu aktive etmektedir. Böylece G6PD'nin ekspresyon seviyesi adipoz dokularda obezite ve insülin direncini oluşturmaya yönlendirmektedir. Park *et al.* (2006) çalışmaları sonucu bu yolağa özgün terapötik bir ilaç ya da maddelerin metabolik hastalıkların tedavisi için önemi olabileceğini göstermişlerdir (Park *et al.* 2006).

Oksidatif pentoz fosfat yolağı, tümör gelişimine katkıda bulunmaktadır, fakat bu yolaktaki üçüncü enzim olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD)'nin tümörjenezdeki rolü kesin olarak bilinmemektedir. Lin *et al.* (2015) 6PGD'nin supresyonunun hücre proliferasyonu ve tümör gelişimini azaltarak, lipojenez ve RNA biyosentezini azaltıp, kanser hücrelerinde ROS seviyesini artırdığını gözlemlemiştir. 6PGD ilişkili ribuloz 5-fosfat (Ru-5-P) üretimi, asetil-CoA karboksilaz 1 ve lipojenezi aktive ederek, aktif LKB1 (karaciğer kinaz 1) kompleksini bozarak AMPK (adenin monofosfat aktive protein kinaz) aktivasyonunu inhibe etmektedir. Ru-5-P ve NADPH, RNA biyosentezin ve lipojenezde prekürsör olarak düşünülmektedir. Böylece Lin *et al.* (2015) Ru-5-P bağımlı LKB1-AMPK sinyali inhibisyonu üzerinde oksidatif pentoz fosfat yolağı ve lipojenez arasında bir bağıntı olduğunu öne sürmektedir. Ayrıca, 6PGD inhibitörleri belirlenmiş ve geliştirilmiş olup, inhibe 6PGD'nin herhangi bir toksisite olmayan fare ksenograftlarında kanser hücre proliferasyonu ve tümör gelişimine etki ettiği görülmüş, böylece 6PGD'nin anti-kanser hedefi olabileceği önerilmiştir (Lin *et al.* 2015).

Brown *et al.* (2004), Yoo *et al.* (2009) çalışmaları sonucunda astrosit elevated gen 1 (AEG1)'in meme, prostat, özofagus ve karaciğer kanseriyle ilişkisi olabileceğini kanıtlamışlardır (Brown and Ruoslahti 2004; Yoo *et al.* 2009). Deng ve arkadaşları 2013 yılında karaciğer kanser HepG2 hücrelerinde çalışma yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda AEG1'in, NF- κ B aktivasyonu üzerinden COX-2 upregülasyonunu gerçekleştirebileceğini öne sürmüşlerdir (Deng *et al.* 2013).

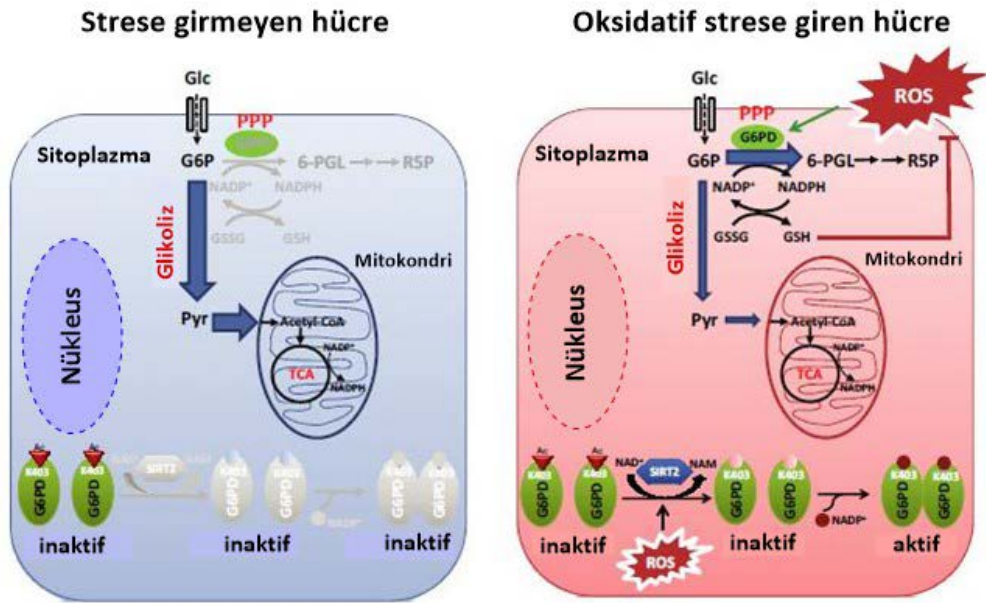
AEG-1 aynı zamanda metadherin (MTDH) ya da LYRIC olarak da bilinen onkogen olarak tanımlanmıştır. AEG-1 tümör proliferasyonu, invazyon ve metastaz regülasyonunda temel role sahiptir. Tümör ilişkili anjiyogenez, kemorezistans ve apoptozisten korunmak için pozitif yönde katkıda bulunmaktadır. Robertson *et al.* (2015) AEG-1'in lipid metabolizmasının homeostazisine etkisini belirlemek için AEG-1 nakavt (AEG1-KO) fareler üzerinde doğal tip (DT) farelere kıyasla çalışma yapmışlardır. Deney modelleri yüksek yağ ve kolesterol diyetiyle beslendiğinde, DT farelerin normal bir şekilde hızlıca kilo aldığı gözlenirken, AEG-1KO farelerin kilo artışı göstermedikleri tespit edilmiştir. Ayrıca AEG-1 overekspresyonu vücutta yağ birikimine, obezite ilişkili hastalıklara, karaciğerde siroza öncülük etmektedir. Aynı zamanda AEG-1, obezite ilişkili hastalıklarda potansiyel terapötik hedef olarak da düşünülmektedir (Robertson *et al.* 2015).

Makrofajlar monositlerden üretilmekte olup kronik inflamator yanıt ve hastalıklarda temel rol almaktadır. Kronik obstrüktif pulmoner hastaların makrofajlarından salınan pro-inflamator sitokin seviyeleri, sigara tüketmeyen kontrol gruplarına kıyasla artış göstermektedir (Yang *et al.* 2007). Sirtuin 1 (SIRT1), memeli NAD(+)-bağımlı protein deasetilaz ailesi, çeşitli dokularda metabolik sensör olarak ortaya çıkmaktadır (de Mingo *et al.* 2016). Yang *et al.* (2007) yaptıkları çalışmada sigara dumanının oksidan ilişkili mekanizmalar üzerinden SIRT1 seviyesinde azalışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Oksidatif modifikasyonların RelA/p65 asetilasyonu üzerinden SIRT1 bozulmasını uyardığı ve sıçan akciğer MonoMac6 hücrelerindeki pro-inflamator sitokinlerin seviyesini artırdığı ortaya çıkmıştır (Yang *et al.* 2007).

Wang ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları çalışmada G6PD'nin lizin 403 (K3403) bölgesinden asetilasyonu ile negatif olarak etkilendiğini tespit etmişlerdir. Böylece K403, G6PD'yi asetilleyerek, aktif dimerler oluşturup, aktivite kaybına sebep olmaktadır. Wang *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışmada hücrelerin SIRT2 üzerinden G6PD asetilasyonunu azaltmak için ekstrasellüler oksidatif uyarana karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca SIRT2 ilişkili deasetilasyon ve G6PD aktivasyonunun oksidatif hasarın etkisini yok etmek ve fare eritrositlerini korumak için

PPP yolağını uyardığı belirlenmiştir. Aynı zamanda KAT9/ELP3'ün potansiyel G6PD asetiltransferaz olduğu ortaya çıkarılmıştır (Wang *et al.* 2014).

Wang *et al.* (2014) G6PD'nin potansiyel KAT (lizin asetiltransferaz) ve KDAC (lizin deasetiltransferaz) enzimlerini belirlemede ve oksidatif stres süresince hücrel NADPH homeostazisini oluşturmak için asetilasyonun G6PD aktivitesine nasıl etki ettiğini çalışmışlardır. SIRT2 ilişkili K403 deasetilasyonu ve G6PD aktivasyonu, oksidatif hasarı yok etmek için pentoz fosfat yolağını uyarmaktadır (Şekil 2.1). İlginç bir şekilde, ekstrasellüler oksidatif hasar ortadan kalktığında, G6PD K403 asetilasyonu bazal seviyeye normalize olarak G6PD inhibisyonu ve pentoz fosfat yolağı resupresyonuna sebep olabilmektedir. Böylece Wang *et al.* (2014) SIRT2'nin G6PD deasetilasyonu ve aktivasyonunda önemli role sahip olduğu ve hücrel redoks potansiyeli oluşturarak oksidatif hasara karşı korunma sağladığı kanıtlanmıştır (Wang *et al.* 2014).



Şekil 2.1. Oksidatif stres altında hücrel NADPH homeostazisinde G6PD K403 asetilasyonunun rolü (Wang *et al.* 2014)

Memeli sirtuinleri NAD^+ bağımlı enzim ailesi olup *Saccharomyces cerevisiae* silent information regülatör 2 (Sir2) geniyle homolojiye sahiptir (Nogueiras *et al.* 2012).

Jeong ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı çalışmada SIRT3 nakavt (SIRT3 KO) fare embriyonik hücreleri (MEF) ve SIRT3 KO fare pankreas dokusu üzerinde incelemeler yapılmıştır. SIRT3'ün demir alınımlı ve içeriğini düzenlediği gözlemlenmiştir. Ayrıca SIRT3 eksikliğinde hücre ve fare pankreas dokusunda demir birikimi olduğu ispatlanmıştır. Demir birikimi toksik etki oluşturmaktadır, çünkü demir beraberinde yüksek miktarda reaktif radikalleri getirmektedir. Özellikle hidroksil radikali hücre membranı, lipitler, proteinler ve DNA'ya zarar vermektedir. Demir ayrıca ROS oluşumunu da katalizler ve oksidatif stres oluşumuna öncülük eder. Bu çalışmada SIRT3 IRP1 aktivitesini düzenleyerek demir metabolizmasında rol alarak demir homeostazisine etki ettiği, bunun yanında SIRT3 eksikliğinde Tfrr1 regülasyonunda bozuklukların da oluştuğu görülmüştür (Jeong *et al.* 2015).

2.1. Amaç

Reaktif oksijen türleri oksijen metabolizması sonucu oluşan *in vivo* sistemin devamlılığı için bazal seviyede ihtiyaç duyulan küçük moleküller olarak bilinmektedir. Elektron alışverişi sonucu birçok radikale dönüşümleri gerçekleşmekte olup ayrıca antioksidan sistemin temel yapıtaşlarıdır. Antioksidan savunma sistemi *in vivo* redoks homeostazisinin oluşumunu sağlar. Çeşitli eksojen ve endojen kaynaklar antioksidan sistemi etkileyerek ROS seviyesinde değişikliklere sebep olmaktadır. ROS seviyesinin aşırı derecede artması veya antioksidan sistemin etkisini kaybetmesiyle hücre içi denge bozulmaya başlar. UV, kimyasal ajanlar, iyonize radyasyon ve özellikle inflamasyon, ROS oluşumuna tesir etmelerinden dolayı intrasellüler homeostazide rol alan başlıca etkenlerdir. İnflamasyonun akut ve kronik evreleri hücre yanıtı ve homeostazisiyle yakından ilişkilidir. Hücre dejenerasyonu ile birlikte inflamasyon çoğu hastalığın patolojik temelini oluşturmaktadır.

ROS oluşumu antioksidan sistemin yanı sıra karsinogenez, epigenetik mekanizmalar, intrasellüler demir metabolizması gibi birçok yolağa etki etmektedir. Histon asetiltransferaz ve deasetiltransferazlar birçok genin ve transkripsiyon faktörünün düzenlenmesinde rol alan epigenetik mekanizmalara etki etmekte olup bu mekanizmalar

tarafından da düzenlenebilmektedir. Histon deasetilaz aile üyesi olan Sirtuin'ler çeşitli histonları, transkripsiyon faktörü ve kofaktörünü deasetiller. Ayrıca hücre döngüsünün düzenlenmesinden enerji homeostazisi gibi birçok süreçte rol alır. Sirtuin'ler yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar, obezite, tip 2 diyabet ve kanser oluşumuna karşı koruyucu etkiye sahiptir. Karsinogenez aşamasında metadherin ve nükleer faktör kappa B gibi çeşitli gen ve transkripsiyon faktörleri de rol almaktadır.

Bunlara ek olarak inflamasyon, hücrel demir homeostazisi IRP-IRE mekanizmasıyla düzenlenmekte ve ilişkili moleküllerin ekspresyon seviyesinde değişikliklere sebep olmaktadır. Bu mekanizmayla ilişkili olan hepsidin ise, demir homeostazisinde önemli bir faktör olan ve salınımı karaciğerden başlayan bir polipeptit hormondur. Ayrıca hücrel demir seviyesi ve kanser gelişimi arasında bağlantı bulunmaktadır.

λ -Carrageenan kaynaklı inflamasyon sonucu ROS seviyesindeki artış ile oluşan akut inflamasyonun kronik inflamasyona dönüşmesini engellemek için bariyer görevinde bulunan antioksidan savunma mekanizmasının nasıl oluştuğu bilinmemektedir. Bugüne kadar bu savunma mekanizmasının ayrıntılı olarak açıklanmamış olması bu tez çalışmasını özgün kılmaktadır. Böylece bu tez kapsamında inflamasyon oluşturulan sıçan karaciğer dokularında antioksidan savunma sistemi ve ilişkili karsinogenez, epigenetik mekanizmalar, demir metabolizması gibi kompleks yolların nasıl bağlantıyla gerçekleştiği bilinmediğinden bu sistemin gen, metabolit, protein ve enzim aktivitesi seviyesinde detaylı bir şekilde incelenerek aydınlatılması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda ilk olarak muamele grubundaki Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlara steril tuz solüsyonunda hazırlanan 10 mg/kg λ -Carrageenan, buna paralel olarak kontrol grubu sıçanlarına da sadece steril tuz solüsyonundan enjekte edildi. Enjeksiyondan 6-8 saat sonra sıçanların boynu kırılarak sakrifiye edildi. Kontrol ve muamele gruplarındaki sıçanların karın boşlukları longitudinal abdominal insizyon yöntemiyle açılarak karaciğer dokuları toplandı. Histopatolojik çalışma amacıyla kullanılacak doku parçaları %10'luk formalin sıvısında fiksle edildi ve parafine gömüldü. Diğer çalışmalar için kullanılacak dokular ise alikuatlara ayrılarak derin

dondurucuda (-86°C) muhafaza edildi. Deney modelinin oluştuğunu belirlemek için inflamasyon yolağına ait Tümör nekrozis faktör-alfa (*Tnf-*) ve İnterlökin 6 (*Il-6*)’nın kantitatif gen ekspresyon seviyeleri ve oksidatif stres belirteci olan İndirgenmiş glutatyon (GSH), Yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) ve Malondialdehit (MDA) metabolitlerinin seviyelerindeki değişim incelendi. İnflamasyon sonucu doku hasarı varlığı ve seviyelerini belirlemek için kontrol ve -Carrageenan muamele deney gruplarında Hematoxylin & Eosin (H&E) protokolü ile histopatolojik analizleri yapıldı. Deney modelinin oluştuğu kanısı kesinleştikten sonra antioksidan sisteme ait Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutatyon peroksidaz (GPx), Glutatyon redüktaz (GR), Glutatyon S-transferaz (GST), Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) kantitatif gen ve protein ekspresyon profilleri, enzim aktivite seviyeleri araştırıldı.

Antioksidan sistem ve inflamasyon ilişkili karsinogenez yolağı ve epigenetik mekanizmaların detaylı araştırılması amacıyla Metadherin (*Mtdh*), Nükleer faktör kappa B (*Nfkb1*) ve Sirtuin 1 (*Sirt1*) kantitatif gen ekspresyon seviyelerindeki değişim incelendi. İnflamasyon sonucu demir metabolizması yolağındaki değişimleri incelemek için Hepsidin antimikrobiyal peptit (*Hamp*)’in kantitatif gen ekspresyon seviyesi, metabolit olarak hücre içi total demir seviyesindeki değişim ve histopatolojik boyutta kontrol ve -Carrageenan muamele deney gruplarında dokularında Perls’ Prussian Blue yöntemiyle demir birikimi analizleri yapıldı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 3.1. Tez dahilinde kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

KİMYASAL ADI	ŞİRKET
Agaroz DNase-RNase-Protease free	Sigma Aldrich
Akril Amid	Sigma Aldrich
Amonyum Sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Sigma Aldrich
Bisakril Amid	Sigma Aldrich
Amonyum Persülfat (APS)	Sigma Aldrich
Antikor (β-Aktin)	Santa Cruz Biotech. sc-47778
Antikor (Catalase Rabbit Polyclonal)	Santa Cruz Biotech. sc-50508
Antikor (Glutasyon Peroxidase-1/2 Rabbit Polyclonal)	Santa Cruz Biotech. sc-30147
Antikor (Glutasyon Reductase Rabbit Polyclonal)	Santa Cruz Biotech. sc-32886
Antikor (Goat anti-mouse IgG HRP)	Santa Cruz Biotech. sc-2005
Antikor (Goat anti-rabbit IgG HRP)	Santa Cruz Biotech. sc-2004
Bakır Klorür (CuCl ₂ .2H ₂ O)	Sigma Aldrich
Bromfenol Mavisi	Sigma Aldrich
λ-Carrageenan	Sigma Aldrich
Coomassie G-250 Brilliant Blue	Sigma Aldrich
1-Kloro-2,4,-Dinitrobenzen (CDNB)	Sigma Aldrich
Demir Ölçüm Kiti (MAK025)	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
Diklorodifeniltri-kloroetan (DDT)	Sigma Aldrich
5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit)	Sigma Aldrich
Etanol	Riedel-de Haen
Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)	Sigma Aldrich
Etidyum Bromür	Sigma Aldrich
Fenilmetansülfonil Florid	Sigma Aldrich
Formamid	Sigma Aldrich

Çizelge 3.1. (devam)

Fosfataz İnhibitörü	Sigma Aldrich
Fosforik Asit (H ₃ PO ₄)	Sigma Aldrich
Glasiyel Asetik Asit	Sigma Aldrich
Gliserol	Carlo Erba
Glisin	Riedel-de Haen
Glukoz-6-fosfat (G6P)	Sigma Aldrich
Okside L-Glutasyon (GSSG)	Sigma Aldrich
İndirgenmiş L- Glutasyon (GSH)	Sigma Aldrich
Glutasyon Redüktaz (GR)	Sigma Aldrich
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma Aldrich
Hidrojen Peroksit (%30'luk H ₂ O ₂)	Sigma Aldrich
İzopropil Alkol	Sigma Aldrich
Ksantin ve Ksantin Oksidaz	Sigma Aldrich
β-Merkaptoetanol	Sigma Aldrich
Metanol	Sigma Aldrich
3-N-Morfolino Propansülfonik Asit (MOPS)	Sigma Aldrich
β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide 2'- Phosphate Reduced Tetrasodium Salt Hydrate (NADPH)	Sigma Aldrich
β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrate (NADP ⁺)	Sigma Aldrich
n-Bütanol	Riedel-de Haen
Nitrotetrazolium Blue Chloride	Sigma Aldrich
Piridin	Sigma Aldrich
Potasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich
Potasyum Karbonat (K ₂ CO ₃)	Sigma Aldrich
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma Aldrich
Primer ve Prob	Integrated DNA Technologies (IDT)- Sentegen-Metabion
Protein Marker	Thermo Fisher Scientific
Proteaz İnhibitörü	Sigma Aldrich
Polivinilidin Diflorid Membran (PVDF)	Macherey Nagel
QIAzol Liziz Solüsyonu	Qiagen
Sığır (Bovine) Serum Albümin (BSA)	Sigma Aldrich
Sodyum Deoksikolat	Sigma Aldrich
Sodyum Fosfat Dibazik (Na ₂ HPO ₄)	Sigma Aldrich
Sodyum Karbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma Aldrich
Skim Milk Powder	Sigma Aldrich

Çizelge 3.1. (devam)

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma Aldrich
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma Aldrich
SuperSignal™ West Pico Kemilüminesans Substrat (ECL Reagent)	Thermo Fisher Scientific
SuperSignal™ West Femto Kemilüminesans Substrat (ECL Reagent)	Thermo Fisher Scientific
Tert-bütül Hidroperoksit (tbst-Hprx)	Sigma Aldrich
1,1,3,3-Tetrametoksipropen	Sigma Aldrich
2-Tiyobarbitürik Asit	Sigma Aldrich
Trikloroasetik Asit	Riedel-de Haen
Trisma Base	Sigma Aldrich
Trizol	Sigma Aldrich
Triton X-100	Sigma Aldrich
Tween-20	Riedel-de Haen
N, N, N', N'- Tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich
2-Vinilpiridin	Sigma Aldrich
Whatman Blotlama Kağıdı	Bio-Rad

3.2. Tez Dahilinde Kullanılan Materyal ve Cihazlar

- | | |
|--|------------------------------------|
| 1. 1, 1,5 ve 3 mL'lik kuvartz küvetler | : Merck |
| 2. 1,5-2 mL'lik Tüpler ve Raklar | : Isolab |
| 3. 15-50 mL Falcon Tüp ve Raklar | : Isolab |
| 4. 1.5-3.0 mm Zirconium Beads | : BeadBug™ |
| 5. Çeker Ocak | : Space Series Fume Cupboard |
| 6. Derin Dondurucu (-86°C) | : New Brunswick Premium U410 |
| 7. Derin Dondurucu (-20 °C) | : Vestel FT 280, Siemens |
| 8. Buzdolabı (+4 °C) | : Uğur |
| 9. Distile Su Üretme Cihazı | : mp MINI Pure |
| 10. Elektroforez Cihazı | : Bio-Rad |
| 11. Fusion FX Görüntüleme Cihazı | : Vilber Lourmat |
| 12. Güç Kaynağı | : Thermo EC EC 135-90 |
| 13. Hassas Terazî | : Denver Instrument |
| 14. Homojenizatör | : Benchmark Scientific BeadBlaster |
| 15. Isıtıcı Bloğu | : Lab Line |
| 16. Kar Üretme Cihazı | : Scotsman |
| 17. Magnetik Karıştırıcı | : Wids WiseStir MSH-20A |
| 18. Mikropipet Takımı | : Eppendorf |
| 19. Mini Santrifüj | : AOSHENG |

20. Nanodrop	: Thermo Scientific Multiscan GO USA
21. Otoklav	: HMC HIRAYAMA
22. PCR	: BIO RAD C1000 Thermal Cyclers
23. pH Metre	: Mettler Toledo
24. Real-Time PCR	: Qiagen
25. BioRad Görüntüleme Cihazı	: BIO-RAD
26. Blotlama (Semidry Blotter) Cihazı	: BIO-RAD
27. Soğutmalı Santrifüjler	: Hettich Mikro 220R
28. UV-VIS Spektrofotometre	: Beckman Coulter
29. Vorteks	: Wids WiseMix VM-10
30. Kesim Aletleri	: Fine Science Tools
31. Mikrotom Cihazı	: Leica RM 2245

3.3. Tez Dahilindeki Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Çizelge 3.2. Tez dahilinde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

1. 1 M Tris/HCl Tamponu	121,14 g Tris 900 mL distile su içinde çözülüp, 1M HCl ile pH: 6,8'e ayarlanıp hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
2. 1,5 M Tris/HCl Tamponu	181,7 g Tris 900 mL distile su içinde çözülüp, 1M HCl ile pH: 8,8'e ayarlanıp hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.
3. %30'luk Akrlamid-Bisakrlamid	37,5 g Akrlamid, 1 g Bisakrlamid alınarak 128 mL dH ₂ O içerisinde 37 °C'de çözündürüldü.
4. %10'luk SDS	9 mL saf suda 1g SDS çözündürüldü.
5. %10'luk APS	2 mL için; 1,8 mL dH ₂ O içerisinde 0,2 g APS çözündürüldü.
6. %5'lik Bloklama Çözeltisi	95 mL TBST içerisinde 5 g Skim Milk Powder (Yağsız Süt Tozu) ya da Sığır (Bovine) Serum Albümin (BSA) çözündürüldü.
7. 0,15 mol/L İzotonik NaCl Çözeltisi	100 mL saf su içinde 0,87 g NaCl çözülerek hazırlandı ve +4°C'de saklandı.
8. Bradford (Commassie Blue) Çözeltisi	100 mg Commassie-Brillant Blue G-250, 50 mL metanolde çözülüp üzerine %85'lik 118 mL fosforik asit çözeltisi eklenerek toplam hacim 1 L'ye tamamlandı. Alüminyum folyo ile kaplanarak oda sıcaklığında saklandı.

Çizelge 3.2. (devam)

9. 20X MOPS Çözeltisi	41,9 g MOPS, 4,1 g sodyum asetat ve 2,6 g EDTA 350 mL DEPC'li suda çözüldü. Daha sonra NaOH ile pH:7'ye ayarlanıp son hacim DEPC'li suyla 500 mL'ye tamamlandı. Otoklavlanıp +4°C de saklandı.
10. 1X MOPS Çözeltisi	Daha önce hazırlanmış olan 20X MOPS solüsyonundan 25 mL alındı ve üzerine 475 mL saf su eklenerek hazırlandı.
11. Jelde Yürütülecek RNA Çözeltisi	1µL izole edilen RNA, 3,5µL ddH ₂ O, 0,5µL MOPS solüsyonu, 5µL formamid karıştırıldı. Karışım 65°C'de 15dk inkübe edilerek hazırlandı.
12. 10X Transfer Çözeltisi	29 g Glisin, 58 g Tris, 3,7 g SDS 900 mL distile su içerisinde çözdürüldü ve pH 8,3'e ayarlanarak son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
13. 10X TBS Çözeltisi	80 g NaCl, 2 g KCl, 30 g Tris 900 mL distile su içerisinde çözdürüldü ve 1 M HCl ile pH 7,4'e ayarlandı. Toplam hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı ve otoklav edildi.
14. 10X Tris-Glisin Elektroforez Çözeltisi	30,2 g Tris, 188 g Glisin, 100 mL %10 SDS 1 L distile su içerisinde çözdürüldü.
15. 5X SDS Yükleme Tamponu (Laemmli Buffer)	2,5 mL Tris/HCl çözeltisi, 0,771 g DTT, 0,05 g brom fenol mavisi, 5 mL %50 gliserol, 1 g SDS alındı ve toplam hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Alikuatlara ayrılarak -20°C'de muhafaza edildi.
16. 1X Transfer Çözeltisi	10X Transfer çözeltisinden 100 mL alınarak, 700 mL distile su ve 200 mL metanol ilave edildi.
17. 1X TBST Çözeltisi	10X TBS çözeltisinden 100 mL alınarak 900 mL distile su ile 1 L'ye tamamlandıktan sonra 1 mL Tween-20 ilave edildi.

Çizelge 3.2. (devam)

18. 1X Tris-Glisin Elektroforez Çözeltisi	10X Tris-Glisin Elektroforez çözeltisinden 100 mL alınara 900 mL distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
19. RIPA Buffer	150 mM sodyum klorür, %1.0 Triton X-100, %0.5 sodyum deoksikolat, %0.1 SDS (sodyum dodesil sülfat), 50 mM Tris alındı, bir miktar distile su içerisinde çözöldükten sonra pH 8.0'e ayarlandı ve son hacim 25 mL'ye tamamlandı.
20. Stripleme Çözeltisi	15 gr Glisin, 1 gr SDS, 10 ml Tween-20 bir miktar distile su içinde çözöldü, pH 2,2'ye ayarlandı. Son hacmi 1 L'ye tamamlandı.
21. 50 mM Potasyum Fosfat Çözeltisi	1,020 gr KH_2PO_4 , 135 mL saf su içinde çözöldü. pH: 7,4'e ayarlandı. Son hacim 150 mL'ye tamamlanır. +4°C'de muhafaza edildi.
22. 3,4 mM EDTA'lı 0,1 M Potasyum Fosfat Çözeltisi	0,68 gr K-fosfat (monobazik) 40 mL saf suda çözöldü. pH:7,5'a ayarlandı. 0,099 gr EDTA eklenir, tekrar pH'a bakıldı ve son hacim 50 mL'ye tamamlandı.
23. 2 mM NADPH Çözeltisi	0,0083 gr NADPH alındı ve 5 mL saf suda çözöldü.
24. 20 mM GSSG Çözeltisi	0,122 gr GSSG alındı ve 10 mL saf suda çözöldü.
25. 100 mM Potasyum Fosfat Çözeltisi	100 mM K-fosfat (monobazik) alınır. 90 mL saf suda çözöldü. pH:6,5 ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
26. 20 mM GSH Çözeltisi	0,061 gr GSH alındı ve 10 mL saf suda çözöldü.
27. 25 mM CDNB Çözeltisi	0,0506 gr CDNB alındı ve 10 mL saf etanolde çözöldü.
28. 5 mM EDTA'lı 1 M Tris/HCl Çözeltisi	0,0935 gr EDTA ve 6,05 gr Tris alınır. 40 mL saf suda çözöldü, pH:8,0'a ayarlanır. Son hacim 50 mL'ye tamamlandı.
29. 0,5 EU/ml GR Çözeltisi	2 μL 500 Unit'lik GR çözeltisinden alınıp 2 mL'ye saf su ile tamamlandı.
30. 7 mM Tert-bütil Hidroperoksit Çözeltisi	9,61 μL tert-bütil hidroperoksit alındı ve 10 mL'ye tamamlandı.

Çizelge 3.2. (devam)

31. 50 mM Tris/HCl Çözeltisi	0,3 gr Tris alınıp, 40 mL saf suda çözülüp pH:8,0'a ayarlandı. Son hacim 50 mL'ye tamamlandı.
32. 6 mM G6P Çözeltisi	0,091 gr G6P alınıp 5 mL saf suda çözülür.
33. 6 mM 6PGA Çözeltisi	0,0082 gr 6PGA alınıp ve 5 mL saf suda çözülür.
34. 2 mM NADP⁺ Çözeltisi	0,0153 gr NADP ⁺ alındı ve 10 mL saf suda çözülür.
35. 50 mM Potasyum Fosfat Çözeltisi	0,68 gr KH ₂ PO ₄ alındı, 80 mL saf suda çözülüp pH:7,0'a ayarlandı. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
36. Hidrojen Peroksit Çözeltisi	50 mM K-fosfat pH:7,0 çözeltisi içerisinde %30'luk H ₂ O ₂ 'den 200 µL çözülür.
37. 3 mmol/L Ksantin Stok Çözeltisi	0,0092 gr Ksantin 200 mL saf suda çözülür. Çözünmenin tam gerçekleşmesi için 0,1 N NaOH ile titre edildi.
38. 0,6 mM EDTA Çözeltisi	0,022 gr EDTA 100 mL saf su içinde çözülerek hazırlandı ve +4°C'de saklandı.
39. 150 µg/L NBT Çözeltisi	12,26 mg NBT 100 mL saf suda çözülüp +4 °C'de muhafaza edildi.
40. 400 mM Na₂CO₃ Çözeltisi	4,24 gr Na ₂ CO ₃ 100 mL saf su içinde çözülerek +4 °C'de muhafaza edildi.
41. 1 g/L BSA Çözeltisi	25 mg BSA son hacim 25 mL olacak şekilde saf suda çözülür.
42. 2 M Amonyum Sülfat ((NH₄)₂SO₄) Çözeltisi	2,643 gr (NH ₄) ₂ SO ₄ son hacim 10 mL olacak şekilde saf suda çözülür.
43. 0,167 EU/ml Ksantin Oksidaz Enzim Çözeltisi	2 mL soğuk (NH ₄) ₂ SO ₄ çözeltisi içinde 8,35 µL Ksantin Oksidaz enzimi çözülür.
44. 0,8 mM CuCl₂ Çözeltisi	0,85 gr CuCl ₂ alındı, 20 mL saf su içinde çözülür.
45. 50 mM EDTA'lı 200 mM Fosfat Tamponu	1,419 gr K-fosfat tartılıp 40 mL saf suda çözülür. 0,73 gr EDTA tartılıp, K-fosfat çözeltisinde çözülür ve pH: 7,4'e ayarlandı. Son hacim 50 mL'ye tamamlandı.
46. 6 mM DTNB Çözeltisi	0,0071 gr DTNB alındı ve 3 mL EDTA'lı tamponda çözülür.

Çizelge 3.2. (devam)

47. 0,5 EU GR Çözeltisi	2 µL 500 Unit'lik Glutasyon redüktaz çözeltisinden alındı ve son hacim 2 mL'ye tamamlandı.
48. %5 TCA Çözeltisi	5 gr TCA alınıp, son hacim 100 mL olacak şekilde saf suda çözüldü.
49. %10 KCl Çözeltisi	10 gr KCl alınıp, son hacim 100 mL olacak şekilde saf suda çözüldü.
50. %8,1 SDS Çözeltisi	8,1 gr SDS 90 mL saf suda çözüldü. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.
51. %20 Asetik Asit Çözeltisi	30 mL saf su üzerine, 20 mL %100'lük glasiyel asetik asit katıldı ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
52. %0,9 TBA Çözeltisi	0,45 gr TBA alınarak son hacim 50 mL olacak şekilde saf suda çözüldü.
53. n-Bütanol/Piridin Çözeltisi	15 mL n-bütanol'e 1 mL piridin eklenir.
54. MDA Standart Çözeltisi	1,1,3,3-tetrametoksipropolan solüsyonundan 0,66 µL alınıp bir miktar saf suda çözüldü. Son hacim 10 mL'ye tamamlandı.

3.4. Sıçanlarda İnflamasyon Modelinin Oluşturulması

Çalışmada kullanılacak sıçanlar Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK) tarafından onaylanan etik kurul raporu ile Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneyisel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarı'ndan sağlandı (Şekil 3.1). Kontrol ve muamele olmak üzere 2 grup oluşturuldu. Her bir grupta 5 adet Sprague Dawley cinsi (200-300 gr) erkek sıçan bulunduruldu. Çalışmadaki sıçanlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı/ 12 saat karanlık) ve oda ısısı koşullarında (20-22°C) muhafaza edildi. Muamele öncesi sıçanların ortama adaptasyonu için standart sıçan yemi ve içme suyuyla beslenerek 1 hafta bekletildi. Muamele grubunda inflamasyon oluşturmak için steril tuz solüsyonunda (%0,9 NaCl) hazırlanan 10 mg/kg λ-Carrageenan çözeltisinden intraperitoneal olarak edildikten 6-8 saat sonra sıçanların boynu kırılarak kurban edildi. Buna paralel olarak kontrol grubu sıçanlara steril tuz solüsyonu enjekte edildi.

Kontrol ve muamele gruplarındaki sıçanların karın boşlukları longitudinal abdominal insizyon ile açılarak karaciğer dokuları toplandı. Real Time PCR, western blot ve aktivite ölçümleri için kullanılacak dokular -86°C’de muhafaza edildi. Histolojik çalışmalar için kullanılacak dokular %10’luk formalin sıvısında fikse edildi ve parafine gömüldü.





T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-80

Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

30.03.2015

ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ Fen Fakültesi	
Tarih:	01.04.2015
Kayıt No:	840
Dosya No:	21

İlgi : 25.03.2015 tarih ve 55885869-483 sayılı yazınız.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Harun BUDAK'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığının Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Laboratuvarında yürütülecek olan "İnflamasyonun Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Genomik ve Proteomik Seviyede Sıçan Karaciğer Dokusunda Araştırılması" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 27.03.2015 tarih ve 3 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 67 no'lu karar ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Mol. Biy. ve Gen. Böl. Başkanı
02 Nisan 2015

Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan

Yrd. Doç. Dr. Harun Budak ve Dursun
02 Nisan 2015

Toplantı Tarihi : 27.03.2015

Toplantı Sayısı : 3

KARAR NO : 67- Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Harun BUDAK'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığının Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Laboratuvarında yürütülecek olan "İnflamasyonun Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Genomik ve Proteomik Seviyede Sıçan Karaciğer Dokusunda Araştırılması" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Fen Fakültesi Dekanlığının 25.03.2015 tarih ve 55885869-483 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Yakutiye / ERZURUM
Telefon : 0-442-231 47 30 Fax : 0-442-231 55 63 e-mail: hadyek@atauni.edu.tr

Şekil 3.1. Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYЕК) tarafından onaylanmış etik kurulu belgesi

3.5. Real Time PCR Uygulaması

3.5.1. Total RNA izolasyonu

Araştırmaya yönelik olarak, kontrol ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularından cDNA kütüphanesi hazırlamak için total RNA izolasyonu Ambion by Life Technologies PureLink™ RNA Mini Kitindeki protokole göre uygulandı.

RNA izolasyonu için homojenat hazırlanışı aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

- Wash buffer II üzerine 60 mL %100 etanol eklendi.
- 1 mL QIAzol Lysis Reagent 10 μ L β -merkaptoetanol eklenerek liziz buffer oluşturuldu.
- 60 mg sıçan karaciğer dokusu alınarak 2 mL'lik kapaklı eppendorf tüplerine konuldu.
- Üzerine 1,2 mL liziz bufferdan eklenen dokular homojenizatör (Benchmark Scientific BeadBlaster) yardımıyla 4260 rpm'de 30 sn parçalandı.
- Homojenizasyondan sonra 2600 g'de 5 dk 25°C'de santrifüj edildi.
- Süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.

Ambion by Life Technologies PureLink™ RNA Mini Kiti kullanılarak RNA izolasyon protokolü aşağıdaki şekilde uygulandı:

1. 1:1 hacminde homojenata %70'lik alkol eklenip vortekslendi.
2. Spin Cartridge tüpe ≤ 700 μ L örnek transfer edildi.
3. 1200 g'de 15 sn 25°C'de santrifüj et ve alttaki sıvı uzaklaştırıldı.
4. 2 ve 3. adımlar tekrarlandı.
5. 700 μ L Wash Buffer I, Spin Cartridge tüpe eklendi. 12000 g'de 15 sn 25°C'de santrifüj edildi.
6. Kolon yeni bir Collection tüpe aktarıldı.

7. 500 µL Wash Buffer II kolona eklendi. 12000 g'de 15 sn 25°C'de santrifüj edildi.
8. Alttaki sıvı uzaklaştırıldı.
9. 7 ve 8. adımlar tekrar edildi.
10. 12000 g'de 1 dk 25°C'de santrifüj edildi.
11. Kolon yeni bir Recovery tüpe aktarıldı.
12. 30-100 µL RNase Free Water kolona eklendi.
13. Oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi.
14. 2 dk 12000 g'de 25°C'de santrifüj edildi.
15. Kolonlar atıldı ve elde edilen tüplerdeki RNA'lar -86°C'de muhafaza edildi.

3.5.2. Total RNA'nın agaroz jel elektroforezinde incelenmesi

Jel elektroforezi, saflaştırılmış nükleik asit ve proteinlerin molekül ağırlığı, miktarı ve alt tiplerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılan moleküler bir yöntemdir. Agaroz ve poliakrilamid jellerin kullanıldığı elektroforez yöntemi, çözünmüş moleküllerin elektriksel bir alanda elektrik yüklerine göre göç etmeleri prensibine dayanır. Bu göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, ortamın yoğunluğuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir. Total RNA jelde oldukça belirgin 28S (veya 23S) ve 18S (veya 16S) rRNA bantlarına sahiptir. 18S rRNA bandı 28S rRNA bandının yaklaşık yarısı kadar bir parlaklık oluşturur. Bu 2:1 oranı toplam RNA'nın parçalanmadan elde edildiğinin en kesin göstergesidir (Kocpinar 2015).

3.5.3. Agaroz jelin hazırlanışı

5,64 mL 20X MOPS çözeltisine sırasıyla 0,9 g agaroz ve 85,5 mL ddH₂O eklendikten sonra mikrodalgada kaynatıldı. Çözelti 37°C'ye soğuduktan sonra 20,04 µL formamid ve 16,5 µL EtBr eklenerek jel polimerleşmeye bırakıldı.

3.5.4. Yürütülecek RNA örneğinin hazırlanışı

İzole edilen RNA örneklerinden 1 μL alınarak 3,5 μL ddH₂O ile karıştırıldı. Daha sonra 0,5 μL 20X MOPS ve 5 μL formamid eklenerek 65°C’de 15 dk inkübasyona bırakıldı. RNA örnekleri 1 μL 6X yükleme tamponu ilave edilerek agaroz jele yüklendi.

3.5.5. Elektroforez işlemi

Agaroz jele 7-10’ar μL olacak şekilde yüklenen RNA örnekleri 80V (Volt) 30 dk boyunca yürütüldü. Yürütme işleminden sonra görüntüleme cihazıyla (Quantum Vilber Lourmat) jelin görüntüsü alındı.

3.5.6. RNA’nın konsantrasyon ve saflığının belirlenmesi

İzole edilen nükleik asitlerin miktar tayininde absorpsiyon temeline dayanan spektrofotometrik yöntemler kullanılır. Biyolojik bir kaynaktan saflaştırılan nükleik asitlerdeki kontaminasyonu belirleyerek miktar tayininin yapılması için 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapılır. Protein kontaminasyonu içermeyen DNA örneklerinde A_{260}/A_{280} oranı 1.8 değerine çok yakındır. Proteinlerin ve izolasyon sırasında kullanılan fenolün varlığında 1.8’in altında, RNA varlığında ise üstünde bir oran elde edilir. Saf RNA örneklerinde A_{260}/A_{280} oranı 2’ye oldukça yakındır. Elde edilen RNA örneklerinin spektroskopik ölçümü nanodrop (Thermo Scientific Multiscan GO USA) ile yapılarak saflığı ve konsantrasyonu belirlendi.

3.5.7. cDNA kütüphanesinin hazırlanması

İzolasyonu yapılan mRNA’lardan cDNA sentezi için New England BioLabs ProtoScript First Strand cDNA Synthesis kiti kullanıldı ve protokolü Çizelge 3.3’deki gibidir:

Çizelge 3.3. cDNA sentez kiti protokolü

KOMPONENT BİLEŞEN	HACİM
Total RNA	1-6 µl (10 pg- 1µg)
d(T) ₂₃ VN (50 µM)	2 µl
Nükleaz-free H ₂ O	değişken
Total Hacim	8 µl

- Komponent bileşenler steril mikrosantrifüj tüpüne konuldu. RNA içeren bu örnekler 70°C’de 5 dakika süreyle denatüre edildi. Kısaca spin edildi ve buz üzerine konuldu. Bu basamak opsiyoneldir.
- Tüplere (her bir tüp için) aşağıdaki bileşenler eklendi:

M-MuLV Reaction Mix	10 µl
M-MuLV Enzyme Mix	2 µl

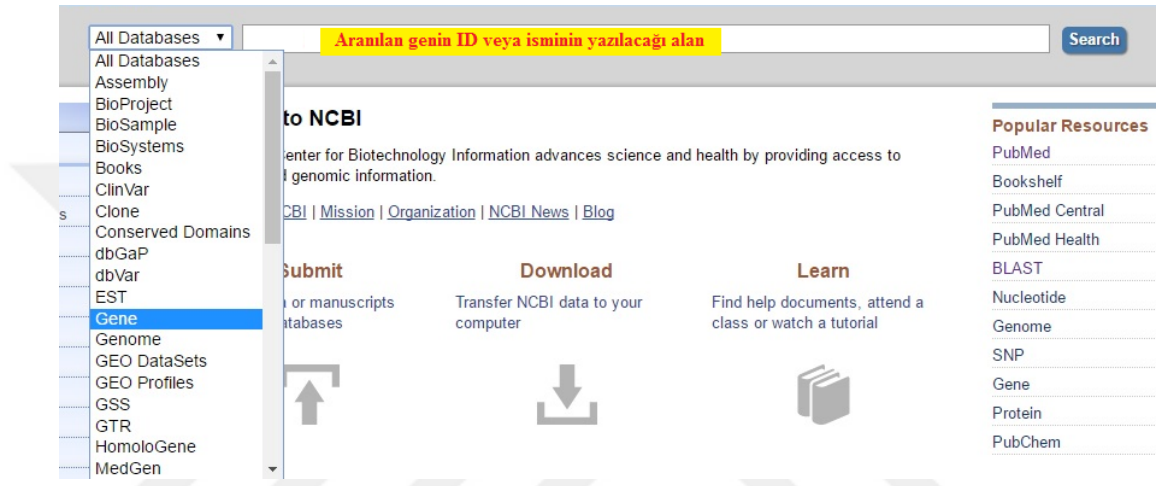
- Random primer kullanıldığı için 20 µl olan cDNA sentez reaksiyonu 42°C’de 1 saat basamağından önce 25°C’de 5 dakika inkübasyon basamağı eklendi.
- Enzim 80°C’de 5 dakika basamağıyla inaktive edildi. cDNA sentez işlemi BIO-RAD C1000™ Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.
- Elde edilen cDNA’lar Real-Time PCR’da kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

3.5.8. Primer ve Prob dizaynı

3.5.8.a. Primer ve prob dizaynı için gen sekansına ulaşılması

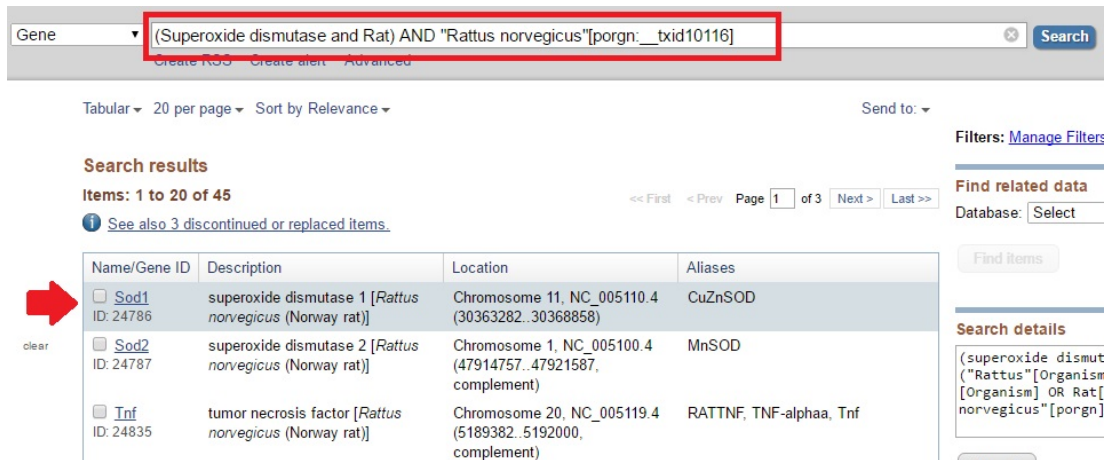
Tez kapsamında çalışılacak İnterlökin 6 (*Il-6*), Tümör nekrozis faktör alpha (*Tnf-α*), Hepsidin (*Hamp*), Süperoksit dismutaz (*Sod1*), Katalaz (*Cat*), Glutasyon peroksidaz (*Gpx1*), Glutasyon redüktaz (*Gr*), Glutasyon S-transferaz (*Gst*), Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (*G6pd*), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (*6pgd*), Metadherin (*Mtdh*),

Nükleer faktör kappa B (*Nfkb1*) ve Sirtuin 1 (*Sirt1*) genlerinin primer ve prob dizaynı için National Center for Biotechnology Information (NCBI) databazı kullanılmıştır. Bunun için NCBI ana sayfası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)'na gidilerek Şekil 3.2'deki gibi "All databases" bölümünden "Gene" seçeneği seçildi ve arama motoruna gen bilgisi (kısa veya uzun adı ya da ID numarası) girilerek "Search" tıklandı.



Şekil 3.2. Primer ve prob dizayn etmede kullanılan NCBI anasayfası

Bu tez çalışmasında hayvansal deney modeli olarak sıçan kullanıldığından "Rattus Norvegicus" seçeneği tıklanarak Şekil 3.3'teki gibi organizmaya ait gen bilgilerini içeren sayfaya ulaşıldı.



Şekil 3.3. Primer ve prob dizaynı için kullanılan organizma seçim ve ilgili genin temel özelliklerini gösteren NCBI sayfası

İlgilendiğimiz genin hangi organizma için aratıldığını gösteren Şekil 3.3’deki sayfada genin üzerine tıklayarak ilgili genin baz ve protein sekansını içeren Şekil 3.4’deki sayfaya ulaşıldı.

Açılan sayfanın alt bölümünde yer alan gen sekans kodu (NM_...) protein sekansı kodu (NP_...) bağlantı linkleri görülmektedir. NM ile başlayan linke tıklanarak ilgilenildiğimiz genin ayrıntılı bilgilerinin ve sekansının bulunduğu Şekil 3.4’deki sayfa görüntülendi.

NCBI Reference Sequences (RefSeq)

RefSeqs maintained independently of Annotated Genomes

These reference sequences exist independently of genome builds. [Explain](#)

mRNA and Protein(s)

NM_017050.1 – NP_058746.1 superoxide dismutase [Cu-Zn]
[See identical proteins and their annotated locations for NP_058746.1](#)

Status: PROVISIONAL

Source sequence(s)	Y00404
UniProtKB/Swiss-Prot	P07632
Related	ENSRNOP00000002885.4, ENSRNOT00000002885.6
Conserved Domains (1) summary	
	cd00305 Location:3 → 147

Cu-Zn_Superoxide_Dismutase; Copper/zinc superoxide dismutase (SOD). superoxide dismutase catalyse the conversion of superoxide radicals to molecular oxygen. Three evolutionarily distinct families of SODs are known, of which the copper/zinc-binding family is one. Defects in the .

Şekil 3.4. İlgili genin gen ve protein sekansını gösteren NCBI veritabanı

Gen ayrıntılarının bulunduğu Şekil 3.5’deki sayfanın sol bölümünde dikey olarak sıralanmış gene ait olan çeşitli bilgilerin sunulduğu kısımda “CDS” olarak adlandırılan sekans bilgisi tıklandı ve genin kodlanan bölgesi işaretlendi. “CDS” bir sekansın protein kodlayan bölgeleridir. Bu bölgenin belirlenmesi sonucu, dizaynı yapılacak primer ve probun hangi bölgeden yapılacağı konusunda kolaylık sağlandı. Şekil 3.6’da tez kapsamında çalışılan genlerden biri olan *Sod1* genine ait kodlanan bölge koyu zeminle işaretli olarak gösterildi.

GenBank ▾

Rattus norvegicus superoxide dismutase 1 (Sod1), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_017050.1

[FASTA](#)[Graphics](#)[Go to:](#) ☐**Şekil 3.5.** İlgili genin sekansının bulunduğu internet veri tabanı

ORIGIN

```

1  gttttgcacc ttctgttctt gcggcggctt ctgtcgtctc cttgcttttt gctctcccag
61  gttccgaggc cgccgcgcgt ctcccgggga agcatggcga tgaaggccgt gtgcgtgctg
121 aagggcgacg gtccggtgca gggcgctcatt cacttcgagc agaaggcaag cgggtgaacca
181 gttgtggtgt caggacagat tacaggatta actgaaggcg agcatggggt ccatgtccat
241 caatatgggg acaatacaca aggctgtacc actgcaggac ctcatTTTaa tcctcactct
301 aagaaacatg gcggtccagc ggatgaagag aggcattgtg gagacctggg caatgtggct
361 gctggaaagg acggtgtggc caatgtgtcc attgaagatc gtgtgatctc actctcagga
421 gagcattcca tcattggcgc tactatgggt gtccacgaga aacaagatga cttgggcaaa
481 ggtggaaatg aagaaagtac aaagactgga aatgctggaa gccgcttggc ttgtggtgtg
541 attgggattg cccaataaac attccctatg tggctctgagt ctcagactca tctgctgtcc
601 tgctaaactg tagaaaaaaa ccaaaccatt aaactgtaat cttaacagtt

```

//

Şekil 3.6. Sod1 genine ait kodlanan ve kodlanmayan bölgeleri gösteren veritabanı

Şekil 3.6'da gösterilen ilgili gene ait dizilimler arasında boşluklar ve satır sayıları bulunduğu ve bu durumun sonraki işlemlerin devam ettirilmesinde bir engel ortaya koymasından dolayı, işlemi kolaylaştırmak için 'FASTA' seçeneğine tıklanarak Şekil 3.7'deki gibi boşluklar ve sayı sıraları kaldırıldı. Daha sonra <http://bioinfo.ut.ee/primer3/> programı kullanılarak, genlere ait ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla primer ve prob dizaynı yapıldı.

FASTA ▾

Rattus norvegicus superoxide dismutase 1 (Sod1), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_017050.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```

>NM_017050.1 Rattus norvegicus superoxide dismutase 1 (Sod1), mRNA
GTTTGGCACCTTCGTTTCCTGCGGCGGCTTCTGTCGTCCTTGCTTTTGGCTCTCCAGGTTCCGAGGC
CGCCGCGCGCTCTCCGCGGAAGCATGGCGATGAAGGCCGTGTGCTGCTGAAGGGCGACGGTCCGGTGCA
GGGCGTCATTCACTTCGAGCAGAAGCAAGCGGTGAACAGTTGTGGTGTGACAGGACAGATTACAGGATTA
ACTGAAGGCGAGCATGGGTTCCATGTCATCAATATGGGGACAATACACAAGGCTGTACCACTGCAAGGAC
CTCATTTTAACTCTCACTCTAAGAAACATGGCGGTCCAGCGGATGAAGAGAGGCATGTTGGAGACCTGGG
CAATGTGGCTGCTGGAAAGGACGGTGTGGCCAATGTGTCCATTGAAGATCGTGTGATCTCACTCTCAGGA
GAGCATTCCATCATTGGCCGTACTATGGTGGTCCACGAGAAACAAGATGACTGGGCAAGGTGGAAATG
AAGAAAGTACAAAGACTGGAAATGCTGGAAAGCCGCTTGGCTTGTGGTGTGATTGGGATTGCCCAATAAAC
ATTCCCTATGTGGTCTGAGTCTCAGACTCATCTGCTGTCTGCTAAACTGTAGAAAAAACCAACCATT
AAACTGTAATCTTAACAGTT

```

**Şekil 3.7.** Sod1 genine ait FASTA dizilimi

Primer ve prob tasarımı yapılırken dikkat edilmesi gereken bazı hususlar vardır;

- Probun bağlanma sıcaklığı genellikle primerin bağlanma sıcaklığından ~10 °C yüksek olmalı
- Probun soğurucununun tutturulacağı 5'ucu G ile bitmemeli
- Probun GC içeriği genellikle %35-65 arasında olmalı
- Genellikle G ve C ile başlayan dizilimler tercih edilmemeli
- Primer ve problemlerin kendi aralarında ve kendi kendilerine bağlanma ihtimalleri olabildiğince düşük olmalı
- Amplifikasyon bölgesinin boyutu 60-150 bp arasında seçilmeli

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.		Checks for mispriming in template.	dis
		Primer3plus interface	ca

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence a [Mispriming Library \(repeat library\)](#):

CTCATTTTAATCCTCACTCTAAGAAACATGGCGGTCCAGCGGATGAAGAGAGGCATGTTGGAGACCTGGG
 CAATGTGGCTGCTGGAAAGGACGGTGTGGCCCAATGTGTCCATTGAAGATCGTGTGATCTCACTCTCAGGA
 GAGCATTCCATCATTGGCCGTACTATGGTGGTCCACGAGAAACAAGATGACTGGGCAAGGTGGAAATG
 AAGAAAGTACAAAGACTGGAAATGCTGGAAAGCCGCTTGGCTTGTGGTGTGATTGGGATTGCCCAATAAAC
 ATTCCCTATGTGGTCTGAGTCTCAGACTCATCTGCTGTCTGCTAAACTGTAGAAAAAACCAACCATT
 AACTGTAATCTTAACAGTT

☒ Pick left primer, or use left primer below:	☐ Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:	☒ Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on

Şekil 3.8. Primer ve prob tasarımında kullanılan veri tabanı

Şekil 3.8’de gösterildiği gibi ilgili gen dizilimi kutucuğa yapıştırılarak left primer, right primer ve eğer TaqMan yöntemi kullanılacaksa prob kutucukları işaretlendi. Açılan sayfadaki ‘General Primer Picking Conditions’ bölümünde primer dizaynı için gerekli olan bilgiler (primer boyutu, primerin bağlanma sıcaklığı, primer % GC oranı, amplifikasyon bölgesinin boyutu vs.) Şekil 3.9’daki bölümlere girildi.

General Primer Picking Conditions

Primer Size Min: 18 Opt: 20 Max: 23
 Primer Tm Min: 59 Opt: 60.0 Max: 61 Max Tm Difference: 100.0 Table of thermodynamic parameters: Breslauer et al. 1986 ▼
 Product Tm Min: Opt: Max:
 Primer GC% Min: 30 Opt: Max: 70
 Max Self Complementarity: 5 Max 3' Self Complementarity: 3.00
 Max #N's: 0 Max Poly-X: 2
 Inside Target Penalty: 1 Outside Target Penalty: 0 Note: you can set Inside Target Penalty to allow primers inside a target.
 First Base Index: 1 CG Clamp: 0
 Concentration of monovalent cations: 50.0 Salt correction formula: Schildkraut and Lifson 1965 ▼
 Concentration of divalent cations: 0.0 Concentration of dNTPs: 0.0

Şekil 3.9. Primere ait bilgilerin girildiği sayfa

Eğer kullanılacaksa proba ait bilgiler (prob uzunluğu, probun bağlanma sıcaklığı, probun % GC oranı vs.) Şekil 3.10’daki kısımlara girildi. Daha sonra ‘Pick Primers’ seçeneği tıklanarak tasarlandı. Şekil 3.11’deki primer dizilimleri elde edildi.

Hyb Oligo (Internal Oligo) General Conditions

Hyb Oligo Size: Min: 18 Opt: 20 Max: 23
 Hyb Oligo Tm: Min: 69 Opt: 70 Max: 71
 Hyb Oligo GC% Min: 30 Opt: Max: 0
 Hyb Oligo Self Complementarity: 12.00 Hyb Oligo Max 3' Self Complementarity: 12.00
 Max #Ns: 0 Hyb Oligo Max Poly-X: 2
 Hyb Oligo Mishyb Library: NONE ▼ Hyb Oligo Max Mishyb: 12.00
 Hyb Oligo Min Sequence Quality: 0
 Hyb Oligo Conc of monovalent cations: 50.0 Hyb Oligo DNA Concentration: 50.0
 Hyb Oligo conc of divalent cations: 0.0 Hyb Oligo [dNTP]: 0.0

Şekil 3.10. Proba ait bilgilerin girildiği sayfa

Primer3 Output

```

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO      start  len  tm  gc%  any_th  3'_th  hairpin  seq
LEFT PRIMER    984   20  59.47  55.00   0.00   0.00   0.00  AGACACCTCAATCGCCTCTG
RIGHT PRIMER   1193  20  59.61  55.00   0.00   0.00   0.00  ACGAAGGAGTTGGTCTGTGG
SEQUENCE SIZE: 1729
INCLUDED REGION SIZE: 1729

PRODUCT SIZE: 210, PAIR ANY_TH COMPL: 7.49, PAIR 3'_TH COMPL: 6.65

1  GGCTCACAAGCAGCTGGCCAGTTCTGGGGAGGCAGCTCAGAGGCTCTTTCTCAGGCCTCT

61  AGCTGGGTCTGTCCTGTACTTCACCAGAGGAAAAACGTTCTTGGGAGAGCTTGTCAGGTG

121  TGGAACTCAGCCATGGTGGCCTTCTTGTCTGCAACCTGCTACTGGTGGCCTGTGGCTC

181  TGTCACTTGGACCATGTGAGATACCGGAGAGTCCGGTGTGCGACTTAGCAGACCGGCTTGA

241  CCTGGTTGAGAAGATAGGCGACACGCACTCCAAAGACCTGGAGATCTGGATGGAGCTAGG

301  AAAACAACGGGAGGCGGATGCCAGGGAGATGCACGCAGTCTGCAGGGTACAGCCCTCAGC

```

Şekil 3.11. İlgili gene göre tasarımı yapılan primer ve proba ait bilgilerin bulunduğu sayfa

İlgili gene ait tasarımı yapılan primer ve probun başka genlerle homolojisinin olup olmadığı <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> programı ile Şekil 3.12’de gösterildiği gibi kontrol edilerek Şekil 3.13 ve Şekil 3.14’teki blastlama sonuçları elde edildi.

Enter Query Sequence

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#)

İlgili gene ait primer sekansının yazılacağı alan

Clear Query subrange [?](#)

From

To

Or, upload file Dosya seçilmedi [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

☐ Align two or more sequences [?](#)

Choose Search Set

Database ☐ Human genomic + transcript ☐ Mouse genomic + transcript ☒ Others (nr etc.):

Nucleotide collection (nr/nt) [?](#)

Organism ☐ Exclude [+](#)

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown [?](#)

Exclude ☐ Models (XM/XP) ☐ Uncultured/environmental sample sequences

Limit to ☐ Sequences from type material

Entrez Query

Enter an Entrez query to limit search [?](#)

[YouTube](#) [Create custom database](#)

Program Selection

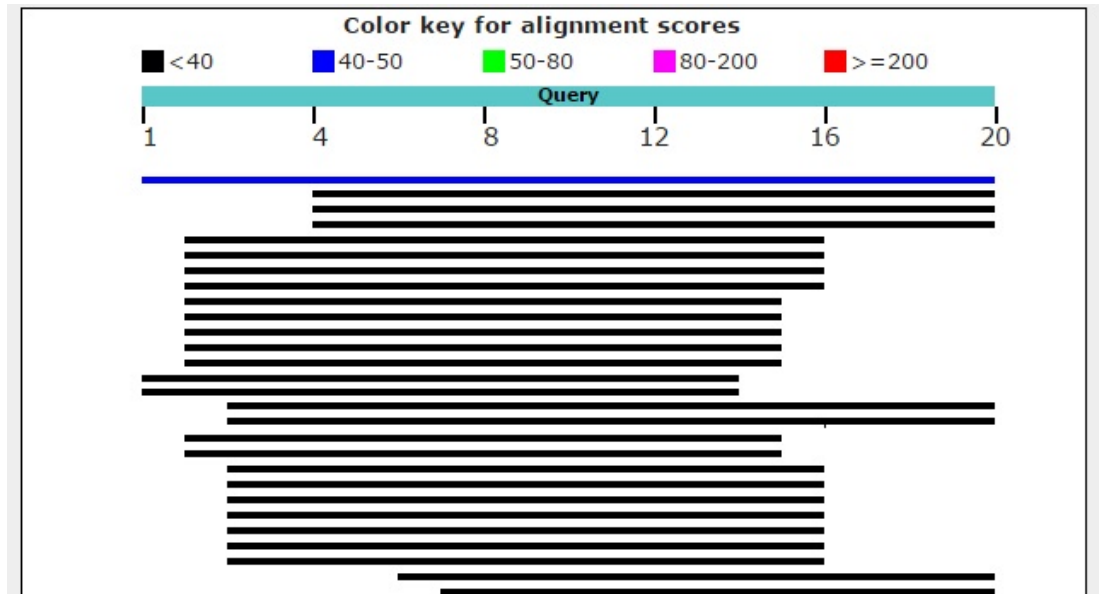
Optimize for ☒ Highly similar sequences (megablast) ☐ More dissimilar sequences (discontiguous megablast) ☐ Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm [?](#)

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

☐ Show results in a new window

Şekil 3.12. Gen sekansı homolojisinin kontrol edildiği organizmaya özgü blast sayfası



Şekil 3.13. Tasarlanan primer ve problemlerin homolojilerinin kontrol edilme amacıyla blastlandığı sayfa

Download ▾ GenBank Graphics				
Rattus norvegicus superoxide dismutase 1 (Sod1), mRNA				
Sequence ID: NM_012880.1 Length: 1729 Number of Matches: 1				
▶ See 1 more title(s)				
Range 1: 1174 to 1193 GenBank Graphics ▾ Next Match ▴ Previous Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	0.002	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Minus
Query 1	ACGAAGGAGTTGGTCTGTGG	20		
Sbjct 1193	ACGAAGGAGTTGGTCTGTGG	1174		

Şekil 3.14. Dizayn edilen primer ve problemlerin kontrol edildiği blastlama sayfasının aşağısında yer alan, primer ve problemlerin blastlanması sonucunda ortaya çıkan ve ilgili primer ve problemlerle homolojisi olan genler

*Query: verilen primer baz sırası, Sbjct: homoloji gösteren genin ilgili bölgesi

Gerçekleştirilen primer ve prob tasarımı sonrasında bu tez çalışmasında kullanılmak üzere sipariş verilen genlere ait bilgiler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Gen ekspresyon profillerine bakılacak genler için dizayn edilen primer ve problemlerin listesi

Gen Adı	Gen Accession No.	Primer Prob	Primer/Prob Dizisi (5'-3')	T _m Sıcaklığı (°C)
G6pd	NM_017006.2	Forward	TGCAGAAAGAACGCCTATCAG	59
		Reverse	TAGTGTGGCTATGGGCAGGT	60
		Prob	FAM-AATTGGGAGGAGCCTTGGGCC-TAMRA	65
Gst	NM_012577.2	Forward	AGACGGGAATTTGATGTTTGA	58
		Reverse	TGTCAATCAGGGCTCTCTCC	60
		Prob	FAM-TGACGGGATGAAGCTGGCACAG-TAMRA	66
GPx	NM_030826.4	Forward	TGGCTTACATCGCCAAGTC	57
		Reverse	CCGGGTAGTTGTTCTCTCAGA	60
		Prob	FAM-AGTGCCATCGGCCTGGATGG-TAMRA	65
6pgd	NM_001305435.1	Forward	TCCAACCTGAAACAGGACACG	58
		Reverse	ACGTGAACATCCAAGTGTGC	58
		Prob	FAM-TGAACCTCATGGCCTACATG-TAMRA	68
Gapdh	NM_017008.4	Forward	TGGACCTCATGGCCTACATG	60
		Reverse	AGGGAGATGCTCAGTGTGG	60
		Prob	Cy5-ACCACCCAGCCCAGCAAGGA-BHQ	65
Gsr	NM_053906.2	Forward	AGTTCACCTGCTCCACACATCC	61
		Reverse	TCCAGCTGAAAGAACCCATC	58
Il-6	NM_012589.2	Forward	GCAAGAGACTTCCAGCCAGT	57.3
		Reverse	CTGTGAAGTCTCCTCTCCGG	56.7
Tnf-α	NM_012675.3	Forward	TTCCAACAACACTACGATGCTCAG	55
		Reverse	ACATCTTCAGCAGCCTTGTG	55.5
Cat	NM_012520.2	Forward	GCGAATGGAGAGGCAGTGTA	57
		Reverse	GTGCAAGTCTTCTGCCTCT	57.3
Sod1	NM_017050.1	Forward	GCTTCTGTCGTCTCCTTGCT	57.2
		Reverse	CTCGAAGTGAATGACGCCCT	57.2
Hamp	NM_053469.1	Forward	CAACAGACGAGACAGACTACGG	56.9
		Reverse	GGCAGTGTGTTGAGAGGTCA	57.2

Çizelge 3.4. (devam)

<i>Mtdh</i>	NM_133398.1	Forward	TCTTCCACCTGCTATCTCTGC	61
		Reverse	CTTGGGTTTGTCTGTGTCTTGT	60
<i>Nfkb1</i>	NM_001276711.1	Forward	AGGAAGATGTGGTGGAGGAC	54
		Reverse	TAGGTGCAGGACAGAGTTGC	54
<i>Sirt1</i>	NM_001008368.1	Forward	TTTCTGTCTCCTGTGGATTG	59
		Reverse	ACACAGAGACGGCTGGAAGT	59
<i>Gapdh</i>	NM_017008.4	Forward	TGGACCTCATGGCCTACATG	60
		Reverse	AGGGAGATGCTCAGTGTGG	60

3.5.8.b. Kantitatif real time PCR (qRT-PCR) analizi

Kantitatif gen ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla yalnızca primer tasarlanan genler için SYBR Green, ek olarak prob da dizayn edilen genler için TaqMan Probe protokolleri uygulandı. SYBR Green reaksiyon miksinde hedef ve referans gen ayrı tüplere pipetlenirken, TaqMan Probe'da hedef gen (çalışılan gen) ve referans gen (housekeeping) aynı tüp içerisinde PCR reaksiyonuna sokuldu ve böylece istatistiki hata azaltıldı. Hedef gen probunun 5' ucunda raporör florokrom 6-carboxyfluorescein (FAM), 3' ucunda baskılayıcı florokrom 6- carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA) floresan etiketi takıldı. Referans genin probunun 5' ucunda raporör florokrom (Cy5), 3' ucunda baskılayıcı florokrom (BHQ) olan floresan etiketi takıldı. İnflamasyon oluşturulan sıçanlardan ve kontrol grubu sıçanlardan elde edilen karaciğer doku örneklerinden izole edilmiş total RNA'dan revers transkriptaz enzimi yardımıyla elde edilen cDNA'lar 1:10 seyreltilerek kullanıldı. Real-time PCR uygulamasında kullanılan reaksiyon karışımı ve pipetleme prosedürleri Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6'da gösterildi.

Çizelge 3.5. TaqMan Probe (Multipleks Real-Time PCR) reaksiyonunda her tüp için kullanılan kimyasal konsantrasyon ve miktarları

Bileşenler	Son Konsantrasyon	Miktar (µL)
ddH ₂ O (Steril)		8,5
TaqMan® Probe Master Mix	1X	12,5
Hedef gen-Forward Primer	0,8 pmol	0,25

Çizelge 3.5. (devam)

Hedef gen- Reverse Primer	0,8 pmol	0,25
Referans gen- Forward Primer (Gapdh)	0,8 pmol	0,25
Referans gen- Reverse Primer (Gapdh)	0,8 pmol	0,25
Hedef gen- Prob	0,4 pmol	0,15
Referans gen-Prob (Gapdh)	0,4 pmol	0,25
		
cDNA	0,02 ng/ μ L	2,5

Çizelge 3.6. SYBR Green reaksiyonunda her tüp için kullanılan kimyasal konsantrasyon ve miktarları

Bileşenler	Son Konsantrasyon	Miktar (μL)
ddH ₂ O (Steril)		9,5
SYBER Green Master Mix	1X	12,5
Hedef gen-Forward Primer	0,8 pmol	0,25
Hedef gen- Reverse Primer	0,8 pmol	0,25
Referans gen- Forward Primer (Gapdh)	0,8 pmol	0,25
Referans gen- Reverse Primer (Gapdh)	0,8 pmol	0,25
		
cDNA	0,02 ng/ μ L	2,5

3.5.8.c. Real Time PCR sonuçlarının istatistiki analizi

Sonuçların analizinde kontrol ve muamele grupları arasındaki karşılaştırmayı hesaplamak için kullanılan ΔC_T metodunun formülü şu şekildedir:

$$\text{Ekspresyon Seviyesi} = 2^{C_{T(\text{Referans})} - C_{T(\text{Hedef})}}$$

2: Hedef geni çoğaltan primer etkinlik oranı (Bu oran %100'e yakın ise 2 alınır.)

C_T Referans: Reaksiyon sırasında referans (housekeeping) genin miktarsal olarak anlamlı değişiminin gerçekleştiği değer

C_T Hedef: Reaksiyonu sırasında hedef genin miktarsal olarak anlamlı değişiminin gerçekleştiği değer

Kontrol ve λ -Carrageenan muamele gruplarından elde edilen gen, enzim ve protein sonuçlarının değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA) Software 7.0 istatistik programı kullanıldı. Gruplara Unpaired t test uygulandı. Bütün sonuçlarda mean $\pm$ standard hata (SEM) değerleri analiz edildi. Yıldız olarak ifade edilen değerler istatistiksel analiz sonucu elde edilen p önem değerlerini ifade etmektedir. Önem derecesine göre yıldız sayısı 1 ile 3 arasında doğru orantılı olarak değişmektedir. $p > 0,05 = \text{ns}$ (not significant) önemsiz, $p < 0,05 = *$ (significant) önemli, $p < 0,01 = **$ (very significant) çok önemli, $p < 0,001 = ***$ (highly significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

3.6. Antioksidan Sistem Bağıntılı Bazı Metabolit Seviyelerinin Ölçümü

3.6.1. İndirgenmiş-yükeltgenmiş glutatyon (GSH-GSSG) seviyelerinin ölçümü

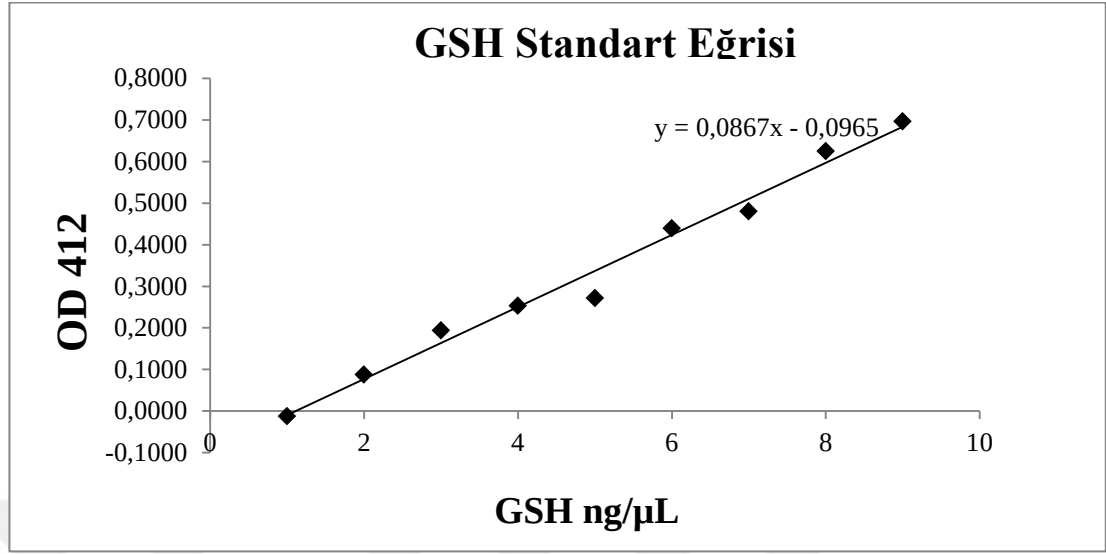
Glutatyon miktarı, Griffith (1980) tarafından uygulanan yöntemin modifikasyonu ile ölçüldü. Kontrol ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokuları 1:5 oranında %5'lik TCA çözeltisi kullanılarak homojenizatör (Benchmark Scientific BeadBlaster) yardımıyla 3500 speed 6 cycle (her cycle 1 dk süreyle) olmak üzere parçalanıp, +4°C 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Sonra her süpernatantın üzerine 1,25 M K₂CO₃ katıldı. Örneğin her 300 μ L süpernatant için 38,7 μ L K₂CO₃ ilave edildi. Daha sonra +4°C 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar toplam glutatyon (GSH+GSSG) ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) ölçümleri için iki basamağa ayrıldı.

İlk basamaktaki homojentalardan 412 nm dalga boyunda 5 dk süreyle toplam glutatyon miktarı Çizelge 3.7'daki pipetleme prosedürüne göre ölçüldü.

Çizelge 3.7. GSH ve GSSG ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü

	KÖR (µL)	NUMUNE (µL)
200 mM K-fosfat tampon (50 mM EDTA'lı)	230	200
2 mM NADPH	30	30
Süpernatant	-	30
0,5 EU/ mL GR	10	10
6 mM DTNB	30	30
Toplam Hacim	300	300

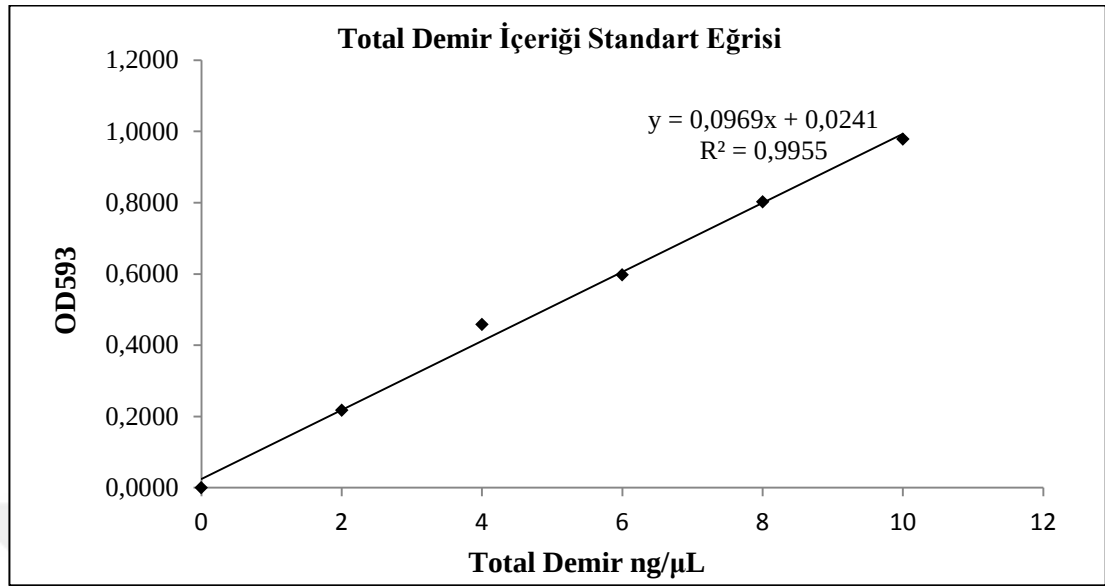
İkinci basamaktaki her 400 µL'lik homojenat örneği üzerine 8 µL 2-vinilpiridin ilave edilip oda sıcaklığında (15-25°C) 1 saat inkübasyona bırakılarak GSH'ın türevlenmesi sağlandı. İndirgenmiş glutatyonun (GSH) DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit)) ile konjugasyonu ölçülerek yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) miktarı Çizelge 3.7'daki pipetleme prosedürüne göre 412 nm dalga boyunda 5 dk süreyle absorbansın kinetik değişimi bağlı ölçüldü. GSH ve GSSG ölçüm değerlendirmeleri için kullanılacak standart eğri grafiği Şekil 3.15'te verildi.



Şekil 3.15. Glutasyon standart grafik eğrisi

3.6.2. Total demir seviyesi ölçümü

Kontrol ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında total demir içeriği miktarı Sigma Aldrich şirketinden alınan kit (MAK025) ve mikropate okuyucu (Thermo Scientific Multiskan Go) yardımıyla kit prosedürüne uygun bir şekilde 593 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı. Prosedür uygulanarak hazırlanan standart grafik ile elde edilen denklem yardımıyla total demir konsantrasyonları (S_a) hesaplanıp numune hacmi (S_v)'ne bölünerek her numunenin konsantrasyonu μM olarak hesaplandı. Total demir içeriği hesaplamalarında kullanılacak standart eğri grafiği Şekil 3.16'da verildi.



Şekil 3.16. Total demir içeriği standart grafik eğrisi

3.6.3. Lipid peroksidasyon (MDA) ölçümü

Kontrol ve λ - Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokuları her 10 mg doku başına 1 mL %10'luk KCl çözeltisi kullanılarak homojenizatör (Benchmark Scientific BeadBlaster) yardımıyla 3000 speed 4 cycle (her bir cycle 1 dk) olmak üzere parçalanıp, oda sıcaklığında 10000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi.

Öncelikle malondialdehit (MDA) tayini için standart hazırlandı. Standart hazırlanışı ve MDA tayini için pipetleme prosedürü Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Standart A: Stok standarttan (1,1,3,3 tetrametoksipropan) 0,66 μ L alındı. 10 mL saf suya tamamlandı.

Çizelge 3.8. Lipit peroksidasyon (MDA) tayini için standart pipetleme prosedürü

	10 nmol/ mL	20 nmol/ mL	30 nmol/ mL	40 nmol/ mL	60 nmol/ mL	80 nmol/ mL	90 nmol/m L
StA (µL)	2,5	5	7,5	10	15	20	22,5
Su (µL)	97,5	95	92,5	90	85	80	78,5

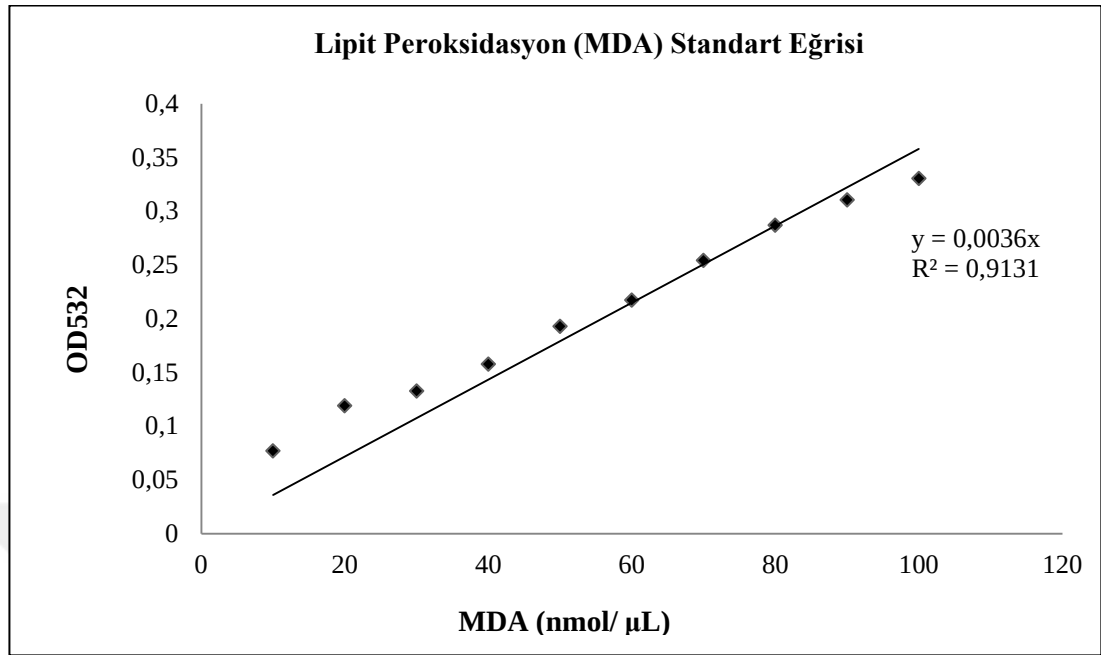
Çizelge 3.9. Lipit peroksidasyonu (MDA) tayini için pipetleme prosedürü

	Numune (µL)	Standart (µL)	Kör (µL)
%8,1 SDS	200	200	200
%20 Asetik Asit	1500	1500	1500
%0,9 TBA	1500	1500	1500
Numune	100	-	-
Standart	-	100	-
Su	700	700	800

Vortekslenip 10 mL’lik kapaklı tüplerde 1 saat 95°C’de inkübe edildi. Sonrasında su altında tüm tüpler soğutuldu. Üst kısımdan 1,5 mL’lik eppendorf tüplere 600 µL aktarıldı. Üzerine aşağıdaki maddeler eklendi.

Su	150	150	150
n-büt/piridin	750	750	750

Vortekslenen numuneler 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Köre karşı 532 nm dalga boyunda anlık fix ölçüm yapıldı. Prosedür uygulanarak hazırlanan standart grafik ile elde edilen denklem yardımıyla MDA konsantrasyonları hesaplandı. Hesaplamalarda kullanılacak MDA standart eğri grafiği Şekil 3.17’de verildi.



Şekil 3.17. Lipit peroksidasyon (MDA) standart grafiği eğrisi

3.7. Histopatolojik analiz

Kontrol ve λ -Carragenaan muamele gruplarından elde edilen sıçan karaciğer dokularından parça alınarak %10'luk formalinde fikse edildi ve parafine gömüldü. Daha sonra doku hasar seviyesi ve dokuda demir birikimini gözlemlemek için 4 μ m'lik kesitler alındı. Doku kesitlerinde hasarı belirlemek için Mayer'in Hematoxylin & Eosin (H & E) boyama protokolü uygulandı;

- Parafin kesitler 2 kez 10'ar dakika Ksilen içerisinde bekletildi.
- Parafin kesitler 2 kez 5'er dakika %100'lük alkolde bekletildi.
- Daha sonra %95'lik alkolde 2 dakika , %70'lik alkolde 2 dakika bekletildi.
- Kesitler kısa bir şekilde distile suda yıkandı.
- 8 dakika Mayer hematoksilin solüsyonunda boyandı.
- 10 dakika sıcak su ile yıkandı.
- Distile suda durulandı.
- %95'lik alkolde durulandı.

- 1 dakika 30 saniye Eosin Y solüsyonunda boyandı.
- 5'er dakika %95'lik alkolde ve 5'er dakika 2 kez %100'lük alkolde bekletildi.
- 2 kez 5'er dakika Ksilen içerisinde bekletildi.
- Slaytlar medyumla kaplandı ve mikroskopta görüntülenerek hasar skorları gözlemlendi.

Doku kesitlerinde Fe^{+3} birikimini belirlemek için Perls' Prussian Blue boyama protokolü uygulandı;

- Öncelikle %5'lik potasyum ferrosiyana ve %5'lik hidroklorik asit hazırlanarak eşit hacimde karıştırıldı.
- Kesitler distile su, alkol ve ksiolden geçirildi.
- 15 dk çalışma solüsyonunda bekletildi.
- Önce distile su ardında musluk suyu ile iyice yıkandı.
- 1 dk nötral kırmızısı ile boyandı.
- Etanol ile su uzaklaştırıldı.
- Ksiol ile temizlendi.
- Çekirdek kırmızı, demirler koyu mavi ile boyandı.

3.8. Kantitatif Protein Ekspresyon Analizi

3.8.1. Western blot

Blotlama uygulamaları, jel üzerinde elektriksel alanda göç ettirilerek fraksiyonlarına ayrılan protein veya nükleik asitlerin (DNA ve RNA) bir destek tabakaya aktarıldıktan sonra göreceli olarak miktarlarının belirlenmesidir. Western blot, numunelerden elde edilen protein homojenatındaki proteinlerin, SDS-PAGE jel elektroforezi aracılığıyla molekül ağırlıklarıyla doğru orantılı olarak, artı kutba (anot) doğru göç ettirilerek ayrılmasına dayanan bir protein blotlama tekniğidir (Budak vd 2016). Western blot dört basamaktan oluşmaktadır:

- SDS-PAGE üzerinde moleköl ağırlıklarına göre ayrılan proteinlerin poliviniliden florit (PVDF) membrana transferi (blotlama basamağı),
- Spesifik olmayan proteinlerin bağlanmalarını engellemek için PVDF membranda blotlama sonrası protein bağlanamayan kısımların ilgisiz proteinlerle bağlanması (bloklama basamağı),
- Spesifik antikorlarla inkübasyon basamağı,
- Proteinlerin görüntülenme basamağı (Budak vd 2016).

3.8.1.a. Sıçan karaciğer dokusundan total protein ekstrakte edilmesi

Kontrol ve λ -Carrageenan muamele gruplarındaki sıçanlar boyunları kırılarak sakrifiye edildi ve longitudinal abdominal insizyon yöntemiyle alınan karaciğer dokuları alikuatlara ayrıldı. Western blot tekniğı için kullanılacak protein homojenatı hazırlanana kadar alikuatlar -86°C’de muhafaza edildi.

Sıçan karaciğer dokusuna 1:5 oranında RIPA buffer ilave edildi. (örn; 100 mg karaciğer dokusuna 500 μ L RIPA buffer eklendi) ve dokular BeadBug™ 1,5 veya 3,0 mm boyutundaki zirkonyum ‘beads’ olarak adlandırılan bilyeler aracılığıyla homojenizatörde (Benchmark Scientific BeadBlaster™) 3000 speed 4 cycle (her cycle 1 dk ve her 1 dk’da 5 sn aralıklarla) olmak üzere parçalandı. Elde edilen homojenat 13000 rpm, 4°C’de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alındı. Daha sonra süpernatantlara ‘Enzim Aktivite Analizi’ metodunda bahsedilen Bradford yöntemi uygulanarak protein miktarları tayin edildi.

✓ 100 mL RIPA tamponuna, 1/50 oranında β -merkaptoetanol ve 1 tablet proteaz inhibitörü ilave edilerek kullanıldı (Budak vd 2016).

3.8.1.b. SDS jelinin hazırlanması ve yüklenmesi

Deneyde kullanılacak proteinlerin moleköl ağırlıklarına göre jelin yüzdesi belirlendikten sonra SDS-PAGE jeli hazırlandı. SDS jeli, ayırma jeli (Çizelge 3.10) ve Yükleme jeli (Çizelge 3.11) olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. 10-100 µg proteine 1XSDS yükleme tamponu (Laemmli Buffer) eklenip 10 dakika 95°C'lik ısıtma blokunda inkübe edildikten sonra proteinler 10 dakika da buz içerisinde bekletildi. Denatüre edilen numuneler yükleme jeline yüklendikten sonra 50 Volta 30 dakika SDS jel elektroforezinde yürütüldü. Numuneler ayırma jeline geçmeye başladığında voltaj 120 Volta çıkarılıp 90 dakika daha yürütüldü (Budak vd 2016).

Çizelge 3.10. SDS-PAGE jel elektroforezi için kullanılan ayırma jeli solüsyon miktarları

Jel Yüzdesi	%8(mL)	%9(mL)	%10(mL)	%12(mL)	%14(mL)
Didistile Su	6,9	6,45	5,9	4,9	3,9
%30Akrilamid-Bisakrilamid	4	4,5	5	6	7
1,5M Tris pH:8,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
%10 SDS	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
%10 Amonyum persülfat (APS)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
TEMED	0,009	0,006	0,006	0,006	0,006
Toplam	15	15	15	15	15

Çizelge 3.11. SDS-PAGE jel elektroforezi için kullanılan yükleme jeli solüsyon miktarları

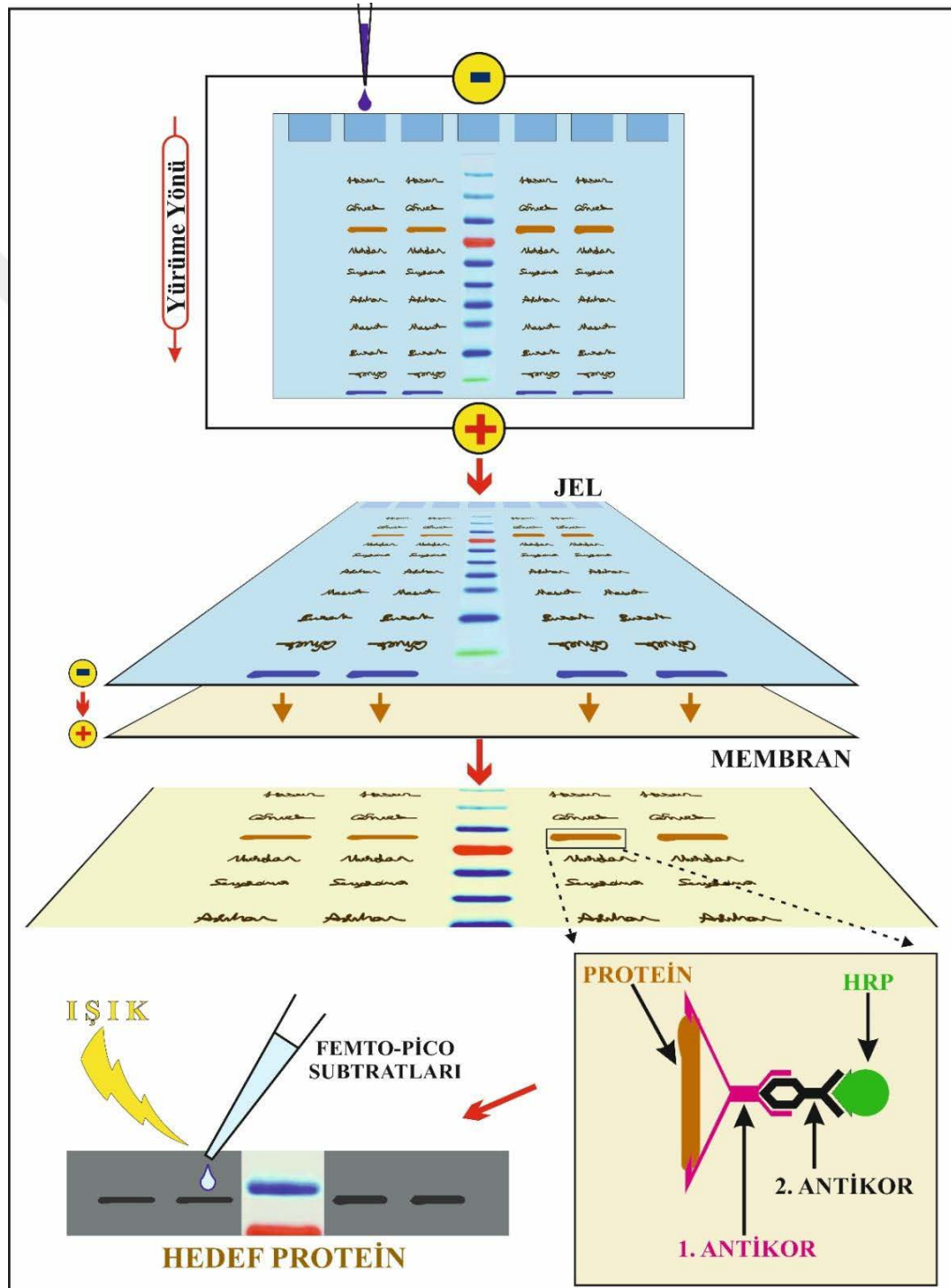
Toplam	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL
Didistile Su	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4
%30 Akrilamid	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83
1M Tris pH:6,8	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63
%10 SDS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
%10 APS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005

3.8.1.c. Jeldeki proteinin membrana transferi (blotlama), bloklama ve görüntüleme basamakları

SDS-PAGE jeli üzerinde molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinler BioRad Trans-Blot^R TurboTM Transfer System semidry blotter cihazı kullanılarak PVDF membrana aktarıldı. Tranfer için işlemler aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- Membranlar kullanılmadan 5 dakika metanol ile muamele edildikten sonra 1X Transfer Buffer ile 5 dakika muamele edildi.
- Semidry Blotter cihazına sıra ile 1 parça blot kağıdı, PVDF membran, jel, 1 parça blot kağıdı konuldu. 25 Volt 2,5 Amper 7 dakika süreyle blotlama işlemi gerçekleştirildi.
- Blotlama bittikten sonra membran 10 dakika TBST ile yıkandı.
- Bloklama çözeltisi (%5 Skim Milk Powder veya %5 Bovine Serum Albumin) ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edildi.
- 4°C'de 1 gece boyunca birinci antikor (Çizelge 3.12) ile inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon bittikten sonra 5 kez 5 dakika TBST ile yıkama yapıldı.
- HRP konjuge edilmiş ikinci antikor ile (Çizelge 3.13) oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon işlemi bittikten sonra membran 5 kez 5 dakika TBST ile yıkanarak görüntüleme basamağına geçildi.
- Antikorum kimyasal sinyal oluşturarak ışımaya vermesi için Femto ve Pico substratları (ECL Reagent) kullanıldı.
- BioRad ChemiDocTM Touch Imaging System cihazı kullanılarak membranın kemilüminesans görüntüsü elde edildi (Budak vd 2016).
- Western blot analizi ile elde edilen hedef proteinler ve β -Aktin housekeeping proteininin kemilüminesans sinyal yoğunluğu ImageJ software programı ile ölçüldü. Hedef proteinler ve β -Aktin housekeeping proteinine karşı normalize edildi. Deney sonuçlarının istatistiki değerlendirilmesi için GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA) istatistik programı kullanılarak Unpaired t-testi yapılarak p değerleri belirlendi. $p>0,05$ =ns (not significant) önemsiz, $p<0,05$ =*

(significant) önemli, $p < 0,01 = **$ (very significant) çok önemli, $p < 0001 = ***$ (highly significant) yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi. Her grup için 3 adet sıçan ($n=3$) kullanıldı ve deneyler 3'er kez tekrarlandı.



Şekil 3.18. Western blot tekniğinin şematize edilmesi (Budak vd 2016)

Çizelge 3.12. Western blot uygulaması için kullanılan primer antikorların listesi

Şirket - Antikor Kod	Primer Antikor Adı	Jel Yüzdesi	Bloklama Çözeltisi	Bloklama Süresi	Seyreltme Oranı	Antikor ile İnkübasyon Süresi	Protein Molekül Ağırlığı
Santa Cruz sc-32886	GR Rabbit Polyclonal	%11	%5 BSA çözeltisi	Oda Sıcaklığı 90 dakika	1:500	+4°C 1 gece	50-65 kDa
Santa Cruz sc-50508	CAT Rabbit Polyclonal	%10	%5 Skim Milk Powder çözeltisi	Oda Sıcaklığı 90 dakika	1:500	+4°C 1 gece	64 kDa
Santa Cruz sc-30147	GPx1/2 Rabbit Polyclonal	%10	%5 BSA çözeltisi	Oda Sıcaklığı 70 dakika	1:400	+4°C 1 gece	23-92 kDa
Santa Cruz sc-47778	β-Aktin	%10-11-16	%5 BSA-Skim Milk Powder	Oda Sıcaklığı 1 saat	1:1000	+4°C 1 gece	46 kDa

Çizelge 3.13. Western blot uygulaması için kullanılan sekonder antikorların listesi

Şirket -Antikor Kod	Primer Antikor Adı	Seyreltme Oranı	Antikor ile İnkübasyon Süresi
Santa Cruz sc-2004	Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:10000	Oda sıcaklığı 2 saat
Santa Cruz sc-2005	Goat anti-mouse IgG-HRP	1:10000	Oda sıcaklığı 1 saat

3.9. Enzim Aktivite Analizi

3.9.1. Bradford (Commassie Blue) protein tayini

Doku örnekleri ve süpernatantların içerdiği protein miktarlarını belirlemek için kullanılan analizlerden biri de Bradford (Coomassie Blue) protein tayin yöntemidir. 5-

100 µg/mL aralığında bulunan protein miktarlarının 595 nm dalga boyunda ölçümü yapılır. Bradford (Coomassie Blue) protein tayininin temeli organik boyaların proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşmesi sonucu renk oluşturması esasına dayanır. Bradford yöntemi Coomassie brilliant blue (parlak mavisi) G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanması sonucu değişik renk şiddetinde mavi renkli çözeltiler ortaya çıkmasıyla geliştirilmiştir. Oluşan mavi rengi proteinlerin yapısındaki arjinin gibi bazik amino asitler ve aromatik asitler sağlamaktadır. Yöntemdeki temel esaslardan biri de kullanılan boya normalde 465 nm dalga boyunda absorbans verirken, protein ile etkileştikten sonra 595 nm dalga boyunda absorbans verir.

Kontrol ve λ-Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğerlerinden elde edilen homojenatlarda, Bradford (Coomassie Blue) protein tayini yukarıda bahsedilen prosedüre göre gerçekleştirildi.

İlk olarak kullanılacak kör ve örnek sayısı hesaplanarak en az 5 mL hacme sahip deney tüpleri hazırlanır. Çalışmadaki her örneğin doku homojenatları (10 µL homojenat + 90 µL dH₂O) şeklinde 10 kat seyreltilir. Örneğin çalışmada kullanılacak örnek sayısı 2 ise buna ek olarak 1 tane de kör tüp hazırlanır. Bu şekilde prosedür aşağıdaki gibidir:

Kör : 4900 µL Coomassie Blue boyası + 100 µL dH₂O

Örnekler : 4900 µL Coomassie Blue boyası + 90 µL dH₂O + 10 µL süpernatant

Son hacim 5000 µL (5 mL) olacak şekilde ayarlanarak vortekslendi ve oluşacak mavi rengin sabitlenmesi için 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 595 nm dalga boyunda numunelerin köre karşı absorbansı ölçüldü. Elde edilen absorbans sonuçları aynı homojenattan bakılan tüm enzim aktiviteleri için EU/mg hesaplamalarında ortak kullanıldı.

Çizelge 3.14. Bradford (Coomassie Blue) protein tayini metodunda uygulama prosedürü

Kimyasallar	Kör	Örnek 1	Örnek 2
dH ₂ O	100 µL	90 µL	90 µL
Süpernatant	-	10 µL	10 µL
Coomassie Blue Boyası	4900 µL	4900 µL	4900 µL
Toplam Hacim	5000 µL	5000 µL	5000 µL

3.9.2. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aktivite ölçümü

Süperoksit dismutaz enzim aktivite tayininde katalaz homojenat hazırlama prosedürü kullanılarak kontrol ve λ -Carrageenan muamele grupları sıçan karaciğer dokularından homojenatlar hazırlandı. Elde edilen homojenatlardan SOD enzim aktivite ölçümü Çizelge 3.15 ve Çizelge 3.16'daki prosedürlere göre yapıldı:

Çizelge 3.15. Süperoksit dismutaz enziminin ölçümünde kullanılan reaktif karışımın içeriği

Reaksiyon karışım bileşenleri (Reaktif Karışım)
➤ 50 mL ksantin çözeltisi
➤ 25 mL 0,06 mM EDTA çözeltisi
➤ 25 mL NBT çözeltisi
➤ 15 mL 400 mM Na ₂ CO ₃ çözeltisi
➤ 7,5 mL Albümin çözeltisi

Çizelge 3.16. Süperoksit dismutaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü

	KÖR (µL)	NUMUNE (µL)
Reaktif Karışım	2850	2850
Saf Su	50	-
Homojenat	-	50
Ksantin Oksidaz	50	50
20°C’de 25 dk inkübasyon		
CuCl ₂ .2H ₂ O	50	50
Toplam Hacim	3100	3100

SOD aktivite ölçümü, 560 nm dalga boyunda 3 mL’lik kuvarz küvetler yardımıyla anlık fix ölçüm yapıldı. Öncelikle reaktif karışıma karşı kör okutuldu. Sonra reaktif karışıma karşı numuneler okutuldu. Burada dikkat edilmesi gereken kısım, körün reaktif karışıma karşı okutulan absorbansının, numunenin reaktif karışıma karşı okutulan absorbansından yüksek çıkmalıdır. Bu değerler protein tayin sonuçları ile birleştirilerek spesifik aktivite (EU/mg) hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{Abs(kör) - Abs(numune)}{Absk}$$

$$Aktivite (EU/ mL) = \frac{\% inhibisyon}{50 * 0,05}$$

$$Spesifik Aktivite (EU/mg) = \frac{Aktivite}{mg \text{ protein}}$$

% inhibisyon: Kör absorbansına karşı örnek absorbansının düşme miktarının %’si

Abs_k : Körün absorbansı

Abs_n : Numunenin absorbansı

50 : NBT’nin indirgenme hızının %50 inhibisyonu

0,05 : Kullanılan örnek miktarı (mL)

3.9.3. Katalaz (CAT) enzimi aktivite ölçümü

Katalaz enzim aktivite ölçümü için homojenat hazırlama prosedüründe, kontrol ve λ -Carrageenan muamele gruplarından alınan dokular tartılarak 5 katı oranında homojenat tamponu (50 mM pH: 7,4 olan K-fosfat tamponu)'na alınarak homojenizatör (Benchmark Scientific BeadBlaster) yardımıyla 3000 speed 3 cycle (her bir cycle 1 dk ve her dakika sonunda 5-10 sn buzda bekleterek) parçalama yapıldı. Daha sonra 30 dakika +4°C'de 10000 g'de santrifüj yapıldı. Elde edilen homojenatlardan CAT enzim aktivite ölçümü Çizelge 3.17'deki prosedüre göre yapıldı:

Çizelge 3.17. Katalaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü

	KÖR (µL)	NUMUNE (µL)
50 mM K-Fosfat	1500	1490
Tamponu pH: 7,0		
Homojenat	-	10
H ₂ O ₂	1500	1500
Toplam Hacim	3000	3000

CAT aktivite ölçümü, 240 nm dalga boyunda 3 mL'lik kuvarz küvetler yardımıyla 1 dakika süreyle 15 sn aralıkla olmak üzere ölçüm yapılarak enzim aktiviteleri (EU/mL) hesaplandı. Bu değerler protein tayin sonuçları ile birleştirilerek spesifik aktivite (EU/mg) hesaplandı.

$$\text{Spesifik aktivite(EU/mg)} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \cdot t} \times \frac{V_t}{V_o} \times S_f \times \frac{1}{\text{mg protein/mL}}$$

Abs : 240 nm'de ölçülen absorbans değeri

ϵ : H₂O₂'nin 240 nm'deki ekstinksiyon katsayısı

t	: Enzim aktivitesinin toplam ölçüm zamanı
V_t	: Toplam hacim
V_ö	: Kullanılan örnek hacmi
S_f	: Seyreltme faktörü

3.9.4. Glutasyon peroksidaz (GPx) enzimi aktivite ölçümü

Glutasyon peroksidaz enzim aktivite tayininde glutasyon redüktaz homojenat hazırlama prosedürü kullanılarak kontrol ve λ -Carrageenan muamele grupları sıçan karaciğer dokularından homojenatlar hazırlandı. Elde edilen homojenatlardan GPx enzim aktivite ölçümü Çizelge 3.18'deki prosedüre göre yapıldı:

Çizelge 3.18. Glutasyon peroksidaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü

	KÖR (µL)	NUMUNE (µL)
1 M K-Fosfat Tamponu		
pH: 8,0	100	100
dH ₂ O	590	580
20 mM GSH	100	100
10 EU/mL GR	100	100
2 mM NADPH	100	100
Homojenat	10	10
t-bst Hprx	-	10
Toplam Hacim	1000	1000

Glutasyon peroksidaz enzimi aktivitesi için yukarıda bulunan pipetleme prosedüründeki t-bst Hprx solüsyonuna kadar pipetleme yapıldı. Daha sonra 340 nm'de 1 mL'lik kuvarz kuvvetler yardımıyla 5-10 dk absorbans ölçülerek absorbans değişiminin sabitenmesi beklendi.

Absorbans değişim sabitletince numune küveti çıkarıldı ve hızlı bir şekilde t-bst Hprx eklendi. Yine 340 nm dalga boyunda 1 mL'lik kuvarz küvetler kullanılarak 3 dakika süreyle 3'er kez ölçüm yapılarak enzim aktiviteleri (EU/mL) hesaplandı. Bu değerler protein tayin sonuçları ile birleştirilerek spesifik aktivite (EU/mg) hesaplandı.

$$S \text{ spesifik aktivite (EU/mg)} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \cdot t} \times \frac{V_t}{V_o} \times S_f \times \frac{1}{\text{mg protein/mL}}$$

Abs	: 340 nm'de ölçülen absorbans değeri
ϵ	: 340 nm'de 1 mM NADPH'ın ekstinksiyon katsayısı
t	: Enzim aktivitesinin toplam ölçüm zamanı
V_t	: Toplam hacim
V_o	: Kullanılan örnek hacmi
S_f	: Seyreltme faktörü

3.9.5. Glutatyon redüktaz (GR) enzimi aktivite ölçümü

Glutatyon redüktaz enzim aktivite ölçümü için homojenat hazırlama prosedüründe, kontrol ve λ -Carrageenan muamele gruplarından alınan dokular tartılarak 5 katı oranında homojenat tamponu (1 mM DDT, 1 mM EDTA ve 1 mM PMSF içeren 50 mM Tris HCl)'na alınarak homojenizatör (Benchmark Scientific BeadBlaster) yardımıyla 3 kez 3 dk (her dakika sonunda 5-10 sn buzda bekleterek) parçalama yapıldı. Daha sonra 1 saat +4°C'de 13500 rpm'de santrifüj yapıldı. Elde edilen homojenatlardan GR enzim aktivite ölçümü Çizelge 3.19'daki prosedüre göre yapıldı:

Çizelge 3.19. Glutatyon redüktaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü

	KÖR (µL)	NUMUNE (µL)
0,1 M K-Fosfat Tamponu	200	200
pH:7,5		
dH ₂ O	600	590
Homojenat	-	10
20 mM GSSG	100	100
2 mM NADPH	100	100
Toplam Hacim	1000	1000

Glutatyon redüktaz (GR) enzim aktivite ölçümü için yukarıda bulunan çizelgedeki çözeltiler kullanılarak 1 mL'lik kuvarz küvetler yardımıyla 340 nm dalga boyunda 3'er kez 3 dakika süreyle ölçüm yapıp absorbanslar kaydedildi. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak enzim aktivitesi (EU/mL) hesaplandı. Daha sonra protein tayini sonuçları ile birleştirilerek spesifik aktivite (EU/mg) hesaplandı.

$$\text{Spesifik aktivite(EU/mg)} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \cdot t} \times \frac{V_t}{V_0} \times S_f \times \frac{1}{\text{mg protein/mL}}$$

Abs	: 340 nm'de ölçülen absorbans değeri
ε	: 340 nm'de 1 mM NADPH'ın ekstinksiyon katsayısı
t	: Enzim aktivitesinin toplam ölçüm zamanı
V_t	: Toplam hacim
V₀	: Kullanılan örnek hacmi
S_f	: Seyreltme faktörü

3.9.6. Glutasyon S-transferaz (GST) enzimi aktivite ölçümü

Glutasyon S-transferaz enzim aktivite tayininde glutasyon redüktaz homojenat hazırlama prosedürü kullanılarak kontrol ve λ -Carrageenan muamele grupları sıçan karaciğer dokularından homojenatlar hazırlandı. Elde edilen homojenatlardan GST enzim aktivite ölçümü Çizelge 3.20'deki prosedüre göre yapıldı:

Çizelge 3.20. Glutasyon S-transferaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü

	KÖR (µL)	NUMUNE (µL)
100 mM K-Fosfat	200	200
Tamponu pH: 6,5		
dH ₂ O	730	729
20 mM GSH	50	50
Homojenat	-	1
25 mM CDNB	20	20
Toplam Hacim	1000	1000

GST aktivite ölçümü, 340 nm dalga boyunda 1 mL'lik kuvarz küvetler yardımıyla 3 dakika süreyle 3'er kez ölçüm yapılarak enzim aktiviteleri (EU/mL) hesaplandı. Bu değerler protein tayin sonuçları ile birleştirilerek spesifik aktivite (EU/mg) hesaplandı.

$$\text{Spesifik aktivite (EU/mg)} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \cdot t} \times \frac{V_t}{V_o} \times S_f \times \frac{1}{\text{mg protein/mL}}$$

- Abs** : 340 nm'de ölçülen absorbans değeri
 ϵ : 340 nm'de 1 mM CDNB-SG'nin ekstinksiyon katsayısı
t : Enzim aktivitesinin toplam ölçüm zamanı
V_t : Toplam hacim
V_o : Kullanılan örnek hacmi

S_f : Seyreltme faktörü

3.9.7. Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi aktivite ölçümü

Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivite tayininde glutatyon redüktaz homojenat hazırlama prosedürü kullanılarak kontrol ve λ -Carragenaan muamele grupları sıçan karaciğer dokularından homojenatlar hazırlandı. Elde edilen homojenatlardan G6PD enzim aktivite ölçümü Çizelge 3.21'deki prosedüre göre yapıldı:

Çizelge 3.21. Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü

	KÖR (μ L)	NUMUNE (μ L)
50 mM Tris-HCl	200	200
Tamponu pH: 8,0		
dH ₂ O	600	600-x
6 mM G6P	100	100
Homojenat	-	x
2 mM NADP ⁺	100	100
Toplam Hacim	1000	1000

G6PD aktivite ölçümü, 340 nm dalga boyunda 1 mL'lik kuvarz küvetler yardımıyla 3 dakika süreyle 3'er kez ölçüm yapılarak enzim aktiviteleri (EU/mL) hesaplandı. Bu değerler protein tayin sonuçları ile birleştirilerek spesifik aktivite (EU/mg) hesaplandı.

$$\text{Spesifik aktivite (EU/mg)} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \cdot t} \times \frac{V_t}{V_o} \times S_f \times \frac{1}{\text{mg protein/mL}}$$

Abs : 340 nm'de ölçülen absorbans değeri

ϵ : 340 nm'de 1 mM NADPH'nin ekstinksiyon katsayısı

t	: Enzim aktivitesinin toplam ölçüm zamanı
V_t	: Toplam hacim
V_ö	: Kullanılan örnek hacmi
S_f	: Seyreltme faktörü

3.9.8. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) enzimi aktivite ölçümü

6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzim aktivite tayininde glutatyon redüktaz homojenat hazırlama prosedürü kullanılarak kontrol ve λ -Carragenaan muamele grupları sıçan karaciğer dokularından homojenatlar hazırlandı. Elde edilen homojenatlardan 6PGD enzim aktivite ölçümü Çizelge 3.22'deki prosedüre göre yapıldı:

Çizelge 3.22. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin aktivite ölçümünde kullanılan pipetleme prosedürü

	KÖR (µL)	NUMUNE (µL)
50 mM Tris-HCl	200	200
Tamponu pH: 8,0		
dH ₂ O	600	600-x
6 mM 6PGA	100	100
Homojenat	-	x
2 mM NADP ⁺	100	100
Toplam Hacim	1000	1000

6PGD aktivite ölçümü, 340 nm dalga boyunda 1 mL'lik kuvarz küvetler yardımıyla 3 dakika süreyle 3'er kez ölçüm yapılarak enzim aktiviteleri (EU/mL) hesaplandı. Bu değerler protein tayin sonuçları ile birleştirilerek spesifik aktivite (EU/mg) hesaplandı.

$$\text{Spesifik aktivite (EU/mg)} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \cdot t} \times \frac{V_t}{V_o} \times S_f \times \frac{1}{\text{mg protein/mL}}$$

Abs	: 340 nm’de ölçülen absorbans değeri
ϵ	: 340 nm’de 1 mM NADPH’in ekstinksiyon katsayısı
t	: Enzim aktivitesinin toplam ölçüm zamanı
V_t	: Toplam hacim
V_ö	: Kullanılan örnek hacmi
S_f	: Seyreltme faktörü

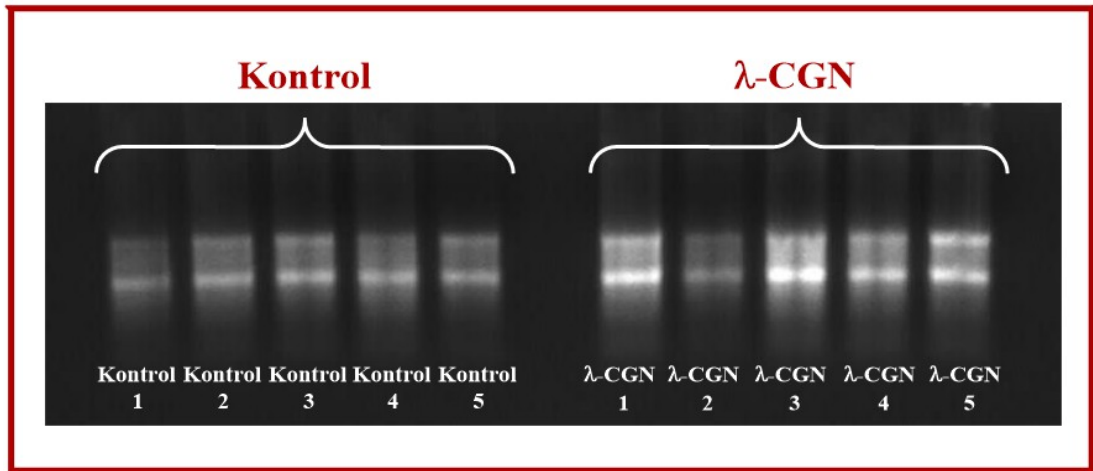


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada kontrol ve λ -Carrageenan ile muamele edilen erkek sıçan karaciğer dokularında oluşan akut inflamasyonun antioksidan sistem, oksidatif stres yolağı, epigenetik ve demir metabolizması mekanizmaları üzerine etkisi kantitatif gen ekspresyon profilleri ve metabolit seviyelerindeki değişiklikler ile araştırıldı. Doku hasarı ve dokuda demir birikimini belirlemek için histopatolojik analizler yapıldı. Kantitatif protein ekspresyon seviyelerini belirlemek ve fonksiyonel aşamadaki değişikliklerin incelenmesi için enzim aktivite tayini yapıldı.

4.1. Total RNA İzolasyon Sonuçları

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda kontrol ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer total RNA, Ambion by Life Technologies PureLink™ RNA Mini Kiti kullanılarak elde edildi. Elde edilen RNA'ların agaroz jel görüntüsü şekil 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.1. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularından elde edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü

İzole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık dereceleri nanodrop cihazı kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları 260 nm dalga boyunda ölçülerek, saflık dereceleri ise 260/280 oranı ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Kontrol ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğerlerinden izole edilen total RNA örneklerinin saflık dereceleri ve konsantrasyon miktarları çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularından elde edilen total RNA’ların saflık dereceleri ve konsantrasyon miktarları

Deney Grupları	RNA Saflık (A_{260}/A_{280})	RNA Konsantrasyon (ng/ μ l)
Kontrol 1	2,1845	2151,68
Kontrol 2	2,0784	2402,80
Kontrol 3	2,2009	1901,92
Kontrol 4	2,1482	2208,56
Kontrol 5	2,1968	2007,92
Muamele 1	1,9046	2628,16
Muamele 2	2,2338	1100,64
Muamele 3	2,0386	2499,68
Muamele 4	2,2320	1695,04
Muamele 5	2,1815	2118,32

İzole edilen total RNA’lardan cDNA sentezi, BIO-RAD C1000TM Thermal Cycler cihazı yardımıyla New England BioLabs ProtoScript First Strand cDNA sentez kiti protokolüne göre gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA’ların konsantrasyonları nanodrop cihazı (Thermo Scientific Multiskan GO) ile ölçülerek cDNA örneklerinin konsantrasyonları eşitlendi.

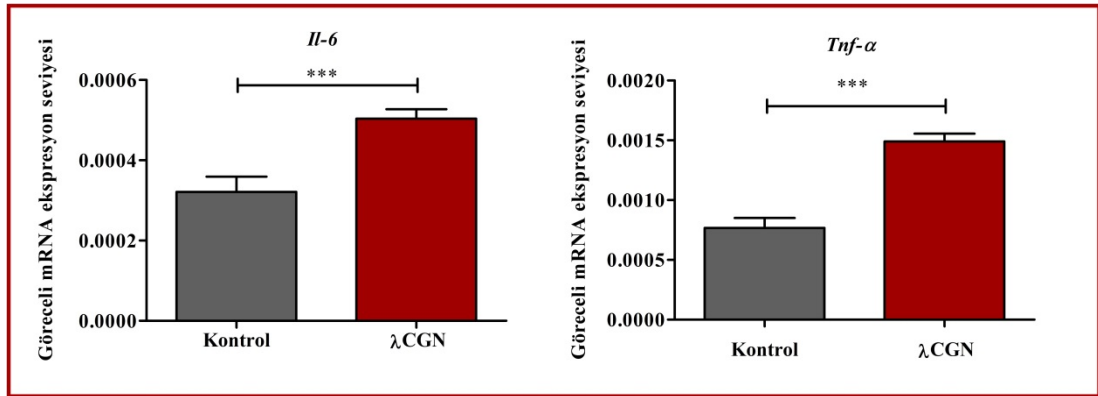
Kullanılan cDNA örneklerinin konsantrasyonlarının birbirinden farklı olması, cihazın farklı C_T değerleri vermesine neden olacağından sonuçların güvenilirliğinin azalmasına sebep olur. Bu nedenle Real-Time PCR uygulamasına geçilmeden önce mutlaka

kullanılacak cDNA örneklerinin konsantrasyonları eşitlenmelidir. Real-Time PCR uygulamasında amplifiye olan gen, belirli bir konsantrasyona ulaştığında bir C_T değeri ile ifade edilecektir. Böylece Real-Time PCR sırasında daha güvenilir sonuçlar elde edilir.

4.2. Real Time PCR Analiz Sonuçları

4.2.1. İnflamasyon marker genlerinin (*Il-6* ve *Tnf-α*) mRNA ekspresyon seviyeleri

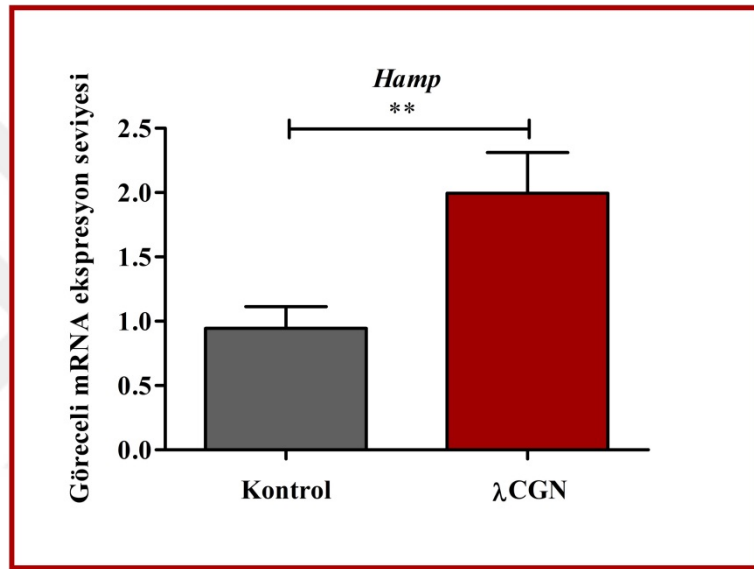
İnflamasyon yolağına ait olup inflamatorik marker olarak değerlendirilen İnterlökin-6 (*Il-6*) ve Tümör nekroz faktör-alfa (*Tnf-α*) genlerine ait mRNA ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. *Il-6* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde λ -Carragenaan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış gözlenmiştir. ($p < 0,001$) *Tnf-α* geninin mRNA ekspresyon seviyesinde de λ -Carragenaan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış gözlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında *Il-6* ve *Tnf-α* genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

4.2.2. Hepsidin antimikrobiyal peptit (*Hamp*) geninin mRNA ekspresyonu

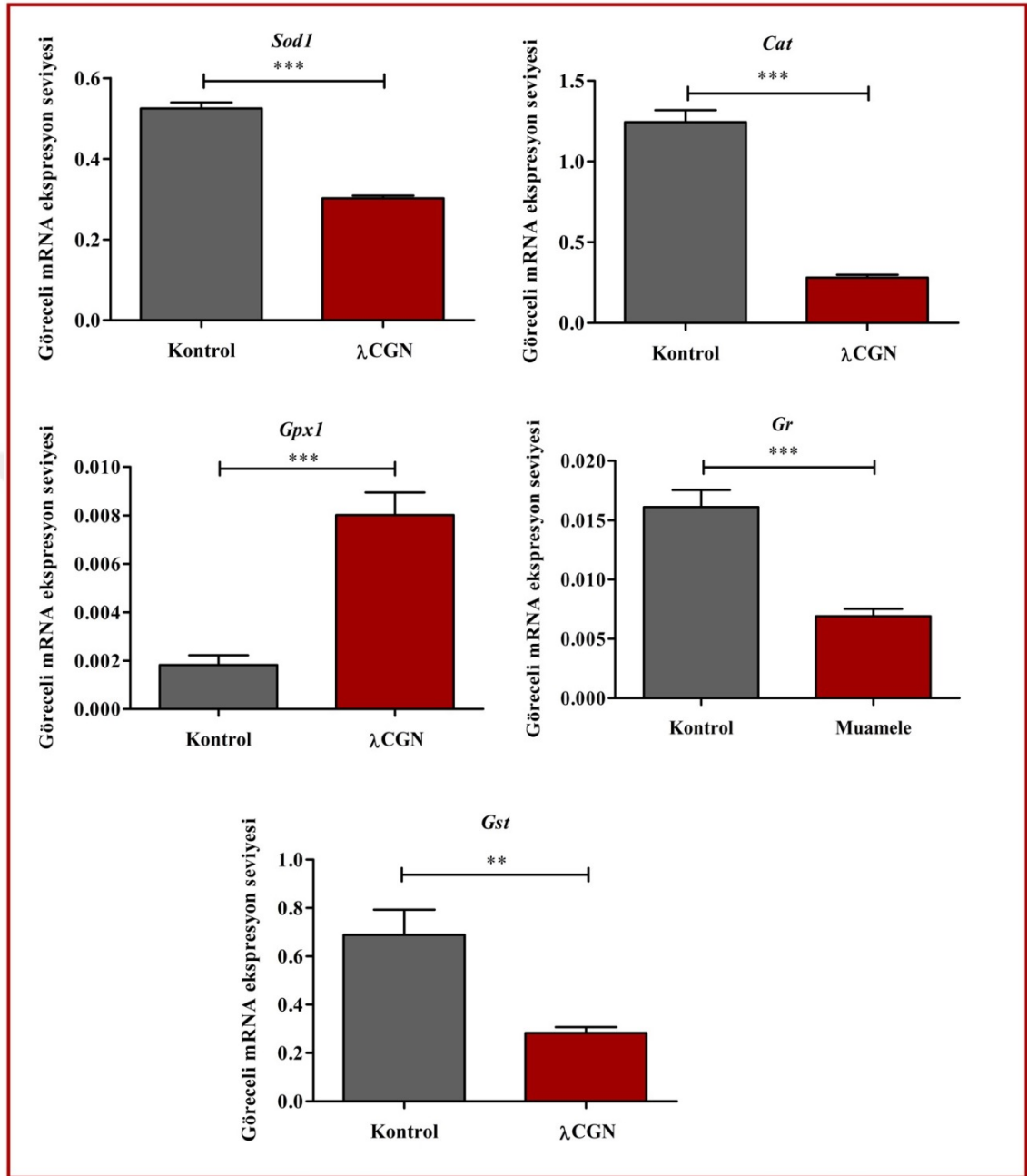
Demir metabolizması yolağında rol oynayan ve inflamasyon yolağı ile ilişkisi de bulunan Hepsidin antimikrobiyal peptit (*Hamp*) geninin mRNA ekspresyon seviyesinde, λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış gözlenmiştir ($p<0,01$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında *Hamp* geninin mRNA ekspresyon seviyesinin Real Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

4.2.3. Antioksidan sistem genlerinin (*Sod1*, *Cat*, *Gpx1*, *Gr* ve *Gst*) mRNA ekspresyon seviyeleri

Antioksidan sistem yolağında rol alan Süperoksit dismutaz-1 (*Sod1*) ($p<0,001$), Katalaz (*Cat*) ($p<0,001$), Glutasyon-disülfid redüktaz (*Gr*) ($p<0,001$) ve Glutasyon S-transferaz (*Gst*) ($p<0,01$) genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinde, λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalış gözlenmiştir. Glutasyon peroksidaz 1 (*Gpx1*) ($p<0,001$) geninin mRNA ekspresyon seviyesinde ise önemli derecede artış gözlenmiştir (Şekil 4.4).

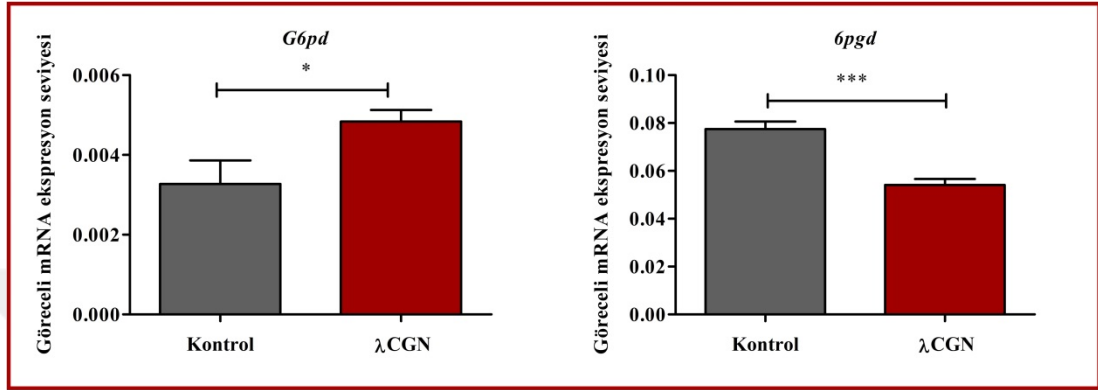


Şekil 4.4. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında *Sod1*, *Cat*, *Gpx1*, *Gr* ve *Gst* genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

4.2.4. Pentoz fosfat yolağı genlerinin (*G6pd* ve *6pgd*) mRNA ekspresyon seviyeleri

Hem pentoz fosfat yolağı hem de antioksidan sistem prosesinde rol alan Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (*G6pd*) geninin mRNA ekspresyon seviyesinde, λ -Carrageenan muamele

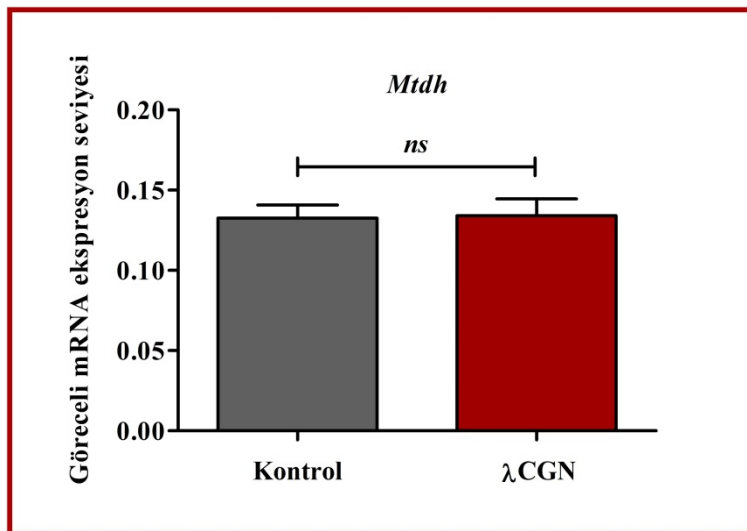
grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış gözlenirken ($p<0,05$), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (*6pgd*) geninin mRNA ekspresyon seviyesinde önemli derecede azalış gözlenmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında *G6pd* ve *6pgd* genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR yöntemiyle

4.2.5. Metadherin (*Mtdh*) geninin mRNA ekspresyonu

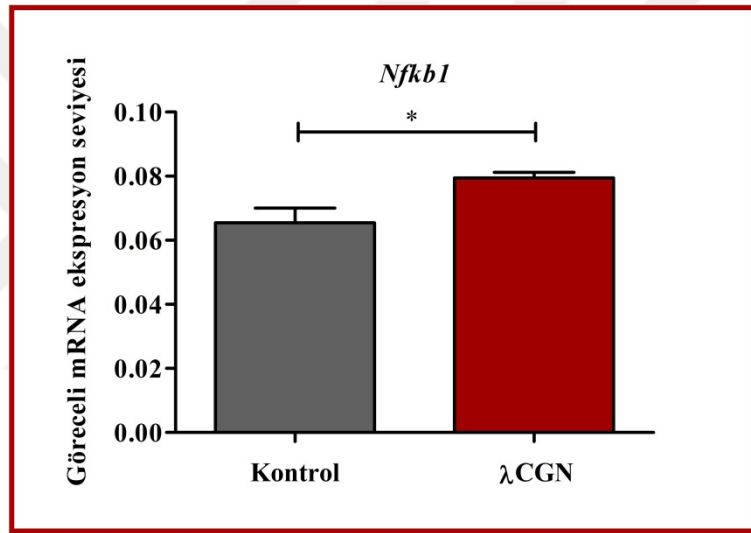
Metadherin (*Mtdh*) geninin mRNA ekspresyon seviyesinde, λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede bir değişim gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında *Mtdh* geninin mRNA ekspresyon seviyesinin Real Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

4.2.6. Nükleer faktör kappa B (*Nfkb1*) geninin mRNA ekspresyonu

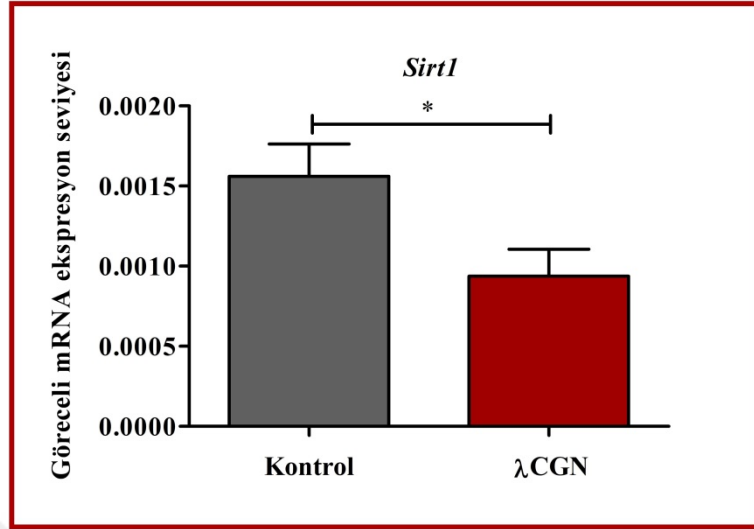
Nükleer faktör kappa B (*Nfkb1*) geninin mRNA ekspresyon seviyesinde, λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli seviyede bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında *Nfkb1* geninin mRNA ekspresyon seviyesinin Real Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

4.2.7. Sirtuin 1 (*Sirt1*) geninin mRNA ekspresyonu

Sirtuin 1 (*Sirt1*) geninin mRNA ekspresyon seviyesinde, λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli seviyede bir azalış gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.8).

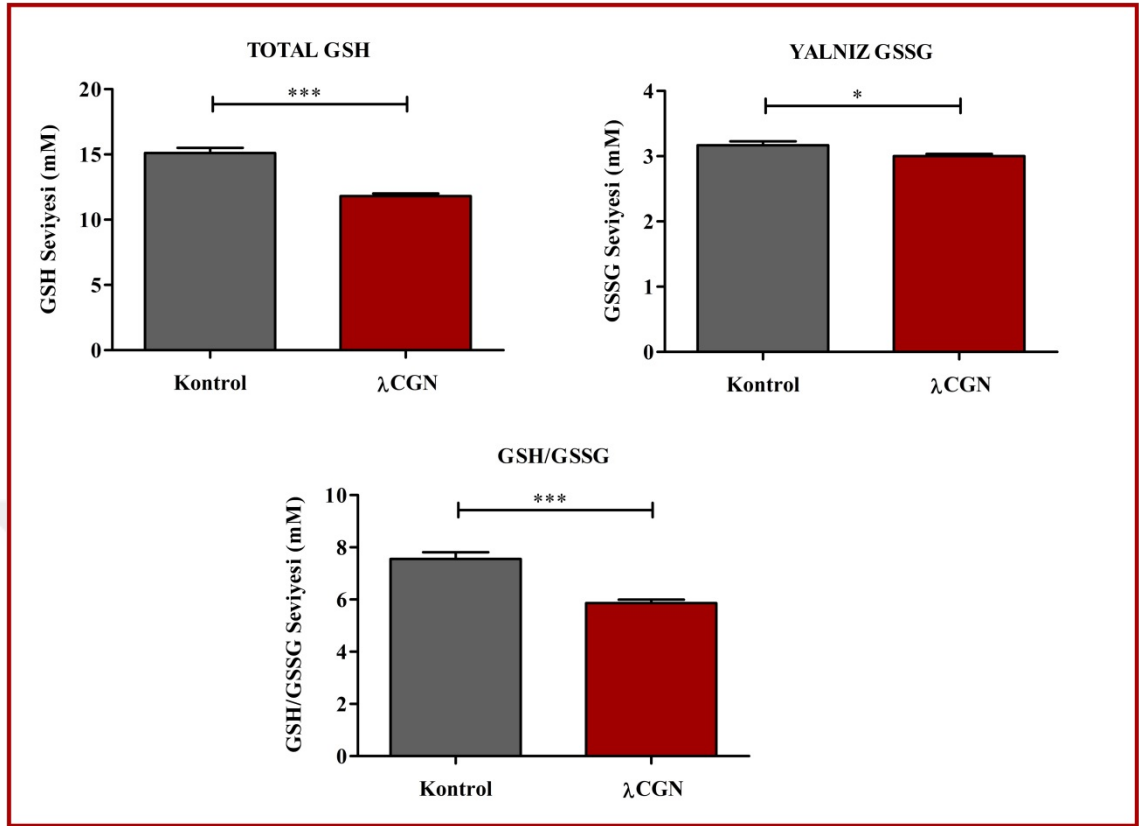


Şekil 4.8. Kontrol grubu ve λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında *Sirt1* geninin mRNA ekspresyon seviyesinin Real Time PCR yöntemiyle belirlenmesi

4.3. Antioksidan Bağıntılı Bazı Metabolitlerin Ölçüm Sonuçları

4.3.1. Total GSH, GSSG seviyeleri ve GSH/GSSG oranı

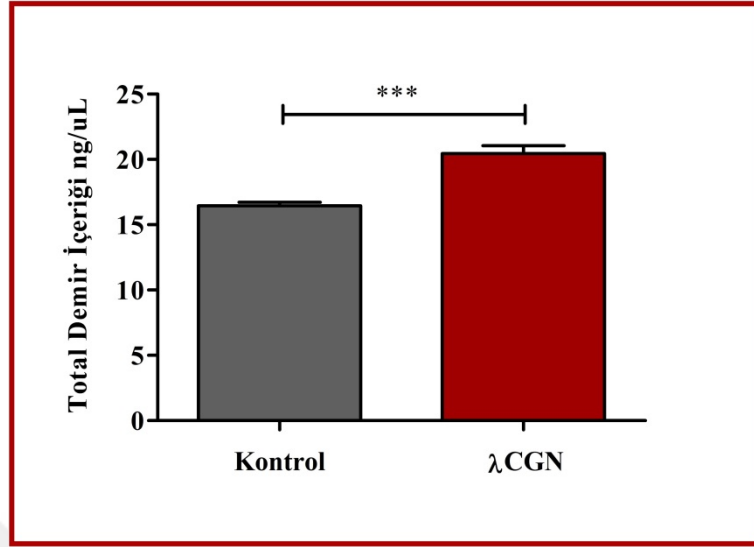
Total glutatyon (Total GSH) ($p < 0,001$), yükseltgenmiş glutatyon (Yalnız GSSG) ($p < 0,01$), ve indirgenmiş glutatyonun yükseltgenmiş glutatyona oranı (GSH/GSSG) ($p < 0,001$) seviyeleri λ -Carragenaan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli bir azalış göstermiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında Total GSH, GSSG ve GSH/GSSG metabolit seviyesinin belirlenmesi

4.3.2. Total demir seviyesi

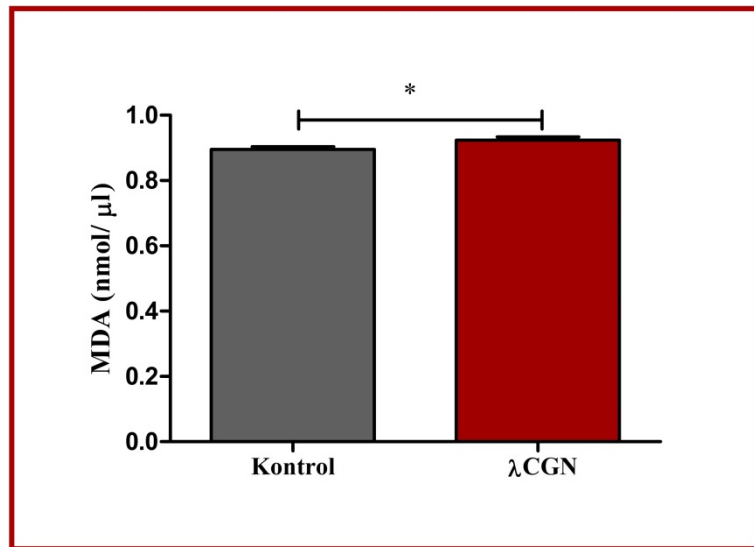
Total demir seviyesi, λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış göstermiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Kontrol grubu ve λ-Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında Total demir metabolit seviyesinin belirlenmesi

4.3.3. Malondialdehit (MDA) seviyesi

Lipit peroksidasyon belirteci olan malondialdehit seviyesi, λ-Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış göstermiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.11).

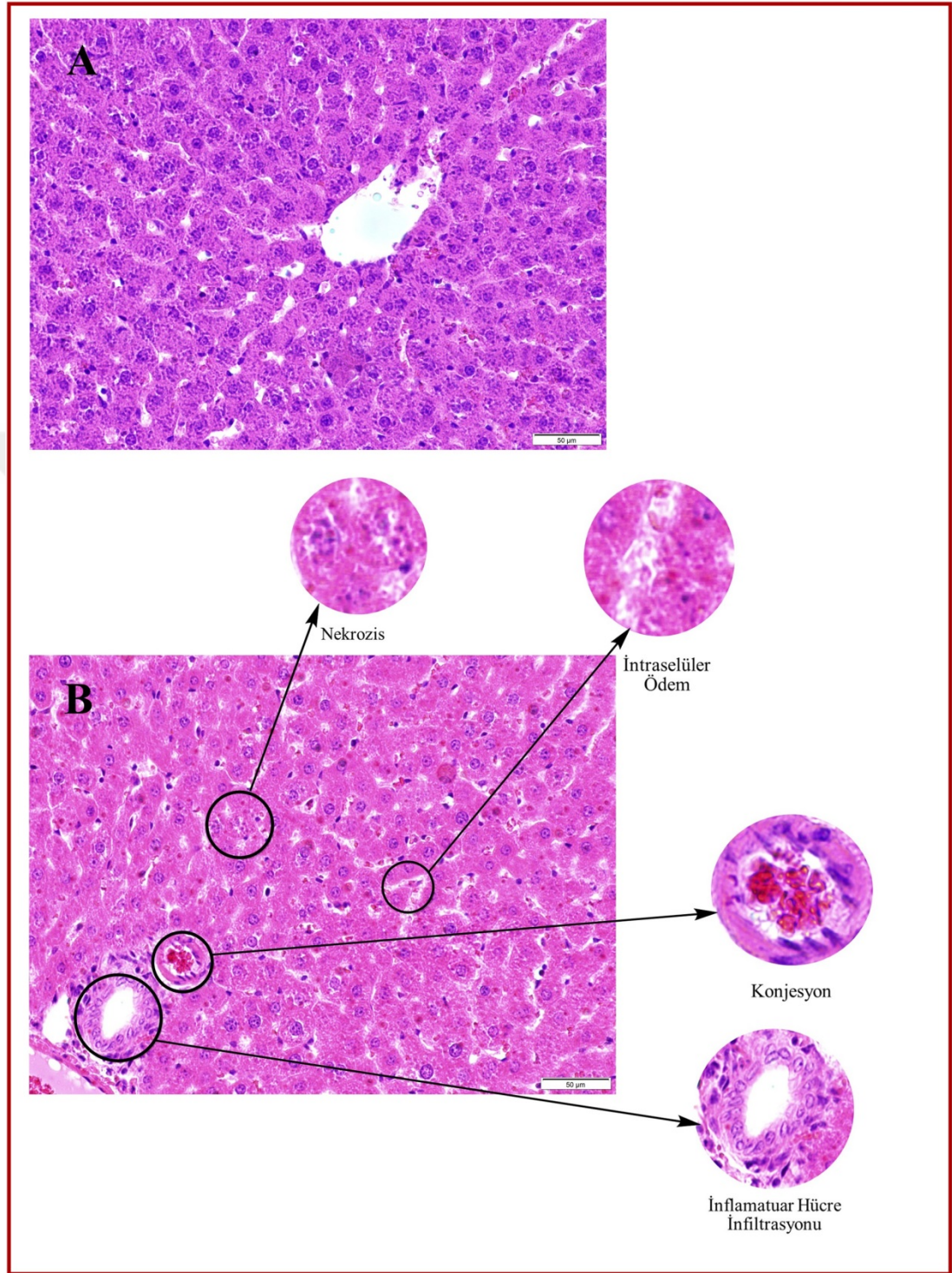


Şekil 4.11. Kontrol grubu ve λ-Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında Malondialdehit seviyesinin belirlenmesi

4.4. Histopatolojik Analizler

Hematoxylin&Eosin (H&E) boyama metoduyla incelenen kontrol ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer doku kesitlerinde siyah çember içinde kalan alanlarda (B) inflamatuvar hücre infiltrasyonu, konjesyon oluşumu, nekrozis ve intrasellüler ödem oluşumu gösterilmektedir (Şekil 4.12).



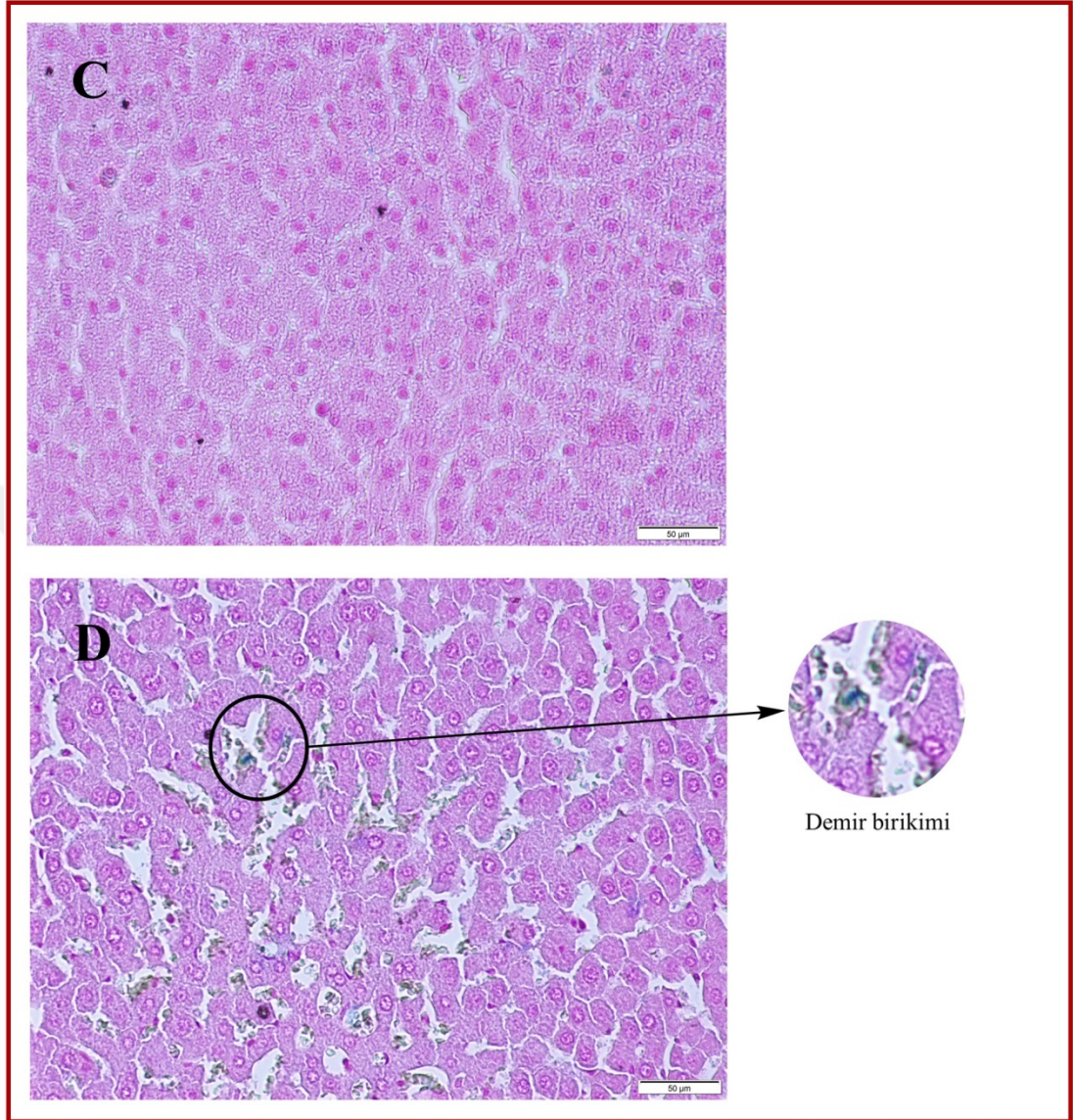


Şekil 4.12. Kontrol grubu (A) ve λ -Carrageenan muamele grubu (B) sıçan karaciğer dokularında histopatoloji görüntüleri 50 μ m ölçek (H&E)

Çizelge 4.2. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında Hematoxylin & Eosin (H&E) yöntemiyle histopatolojik hasar skorlarının belirlenmesi

Hasar Türü	Kontrol Skoru	Muamele Skoru				
İnflamatuar Hücre İnfiltrasyon Skoru	0	1	2	1	2	1
Konjesyon Skoru	0	2	1	1	1	2
İntrasellüler Ödem Skoru	0	1	1	1	2	1
Nekrozis Skoru	0	1	1	1	1	1

Perls' Prussian Blue metoduyla incelenen kontrol ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer doku kesitlerinde siyah çember içinde bulunan (D) ve mavi ile boyanan bölgeler Fe^{+3} birikimini belirtmektedir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Kontrol grubu (C) ve λ -Carrageenan muamele grubu (D) sıçan karaciğer dokularında Fe^{+3} birikimi histopatoloji görüntüleri 50 μ m ölçek (Perls' Prussian Blue)

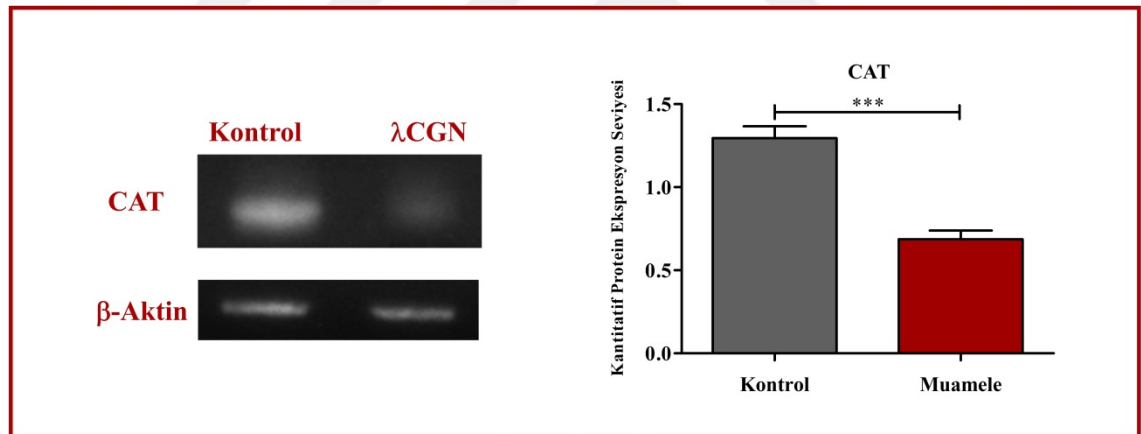
Çizelge 4.3. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında Perls' Prussian Blue yöntemiyle histopatolojik demir birikiminin kalitatif tayini

Demir Yükleme	Kontrol	Muamele
	Negatif	Pozitif

4.5. Kantitatif Western Blot Analizi

4.5.1. CAT proteininin kantitatif western blot analizi

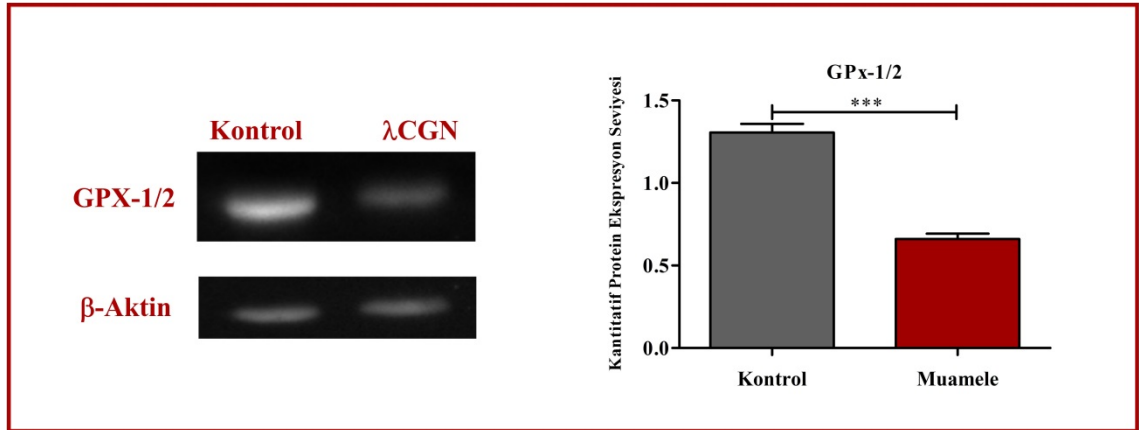
Katalaz (CAT) protein ekspresyonu seviyesinde, λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalış gözlenmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında CAT protein ekspresyon seviyesinin western blot yöntemiyle belirlenmesi

4.5.2. GPx proteininin kantitatif western blot analizi

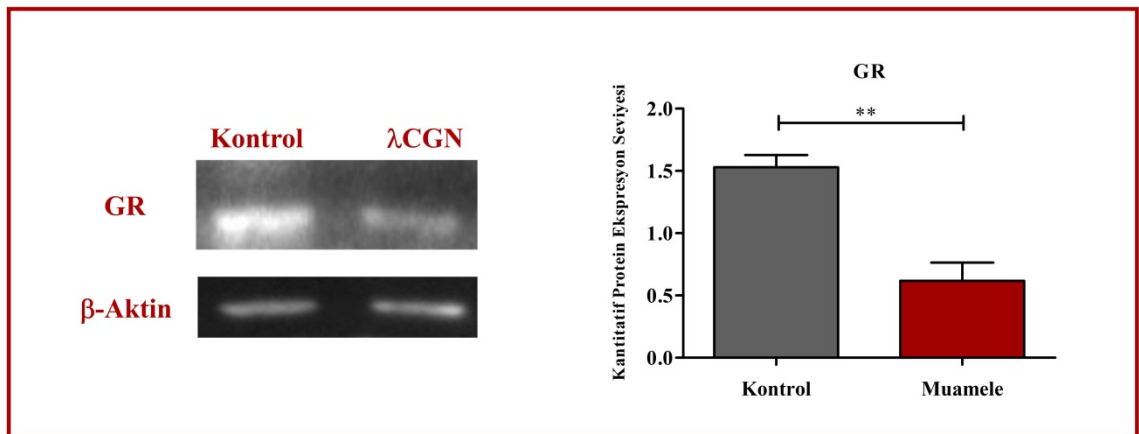
Glutatyon peroksidaz (GPx) protein ekspresyonu seviyesinde, λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalış gözlenmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında GPx protein ekspresyon seviyesinin western blot yöntemiyle belirlenmesi

4.5.3. GR proteininin kantitatif western blot analizi

Glutatyon redüktaz (GR) protein ekspresyonu seviyesinde, λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalış gözlenmiştir ($p < 0,01$) (Şekil 4.16).

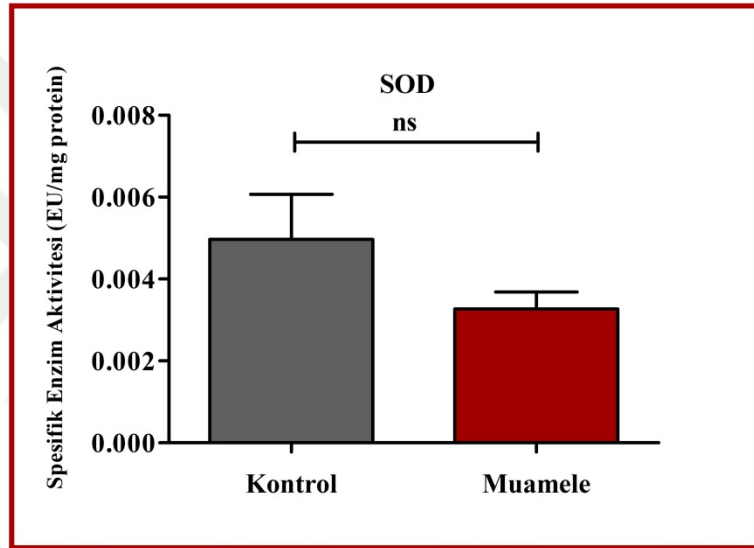


Şekil 4.16. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında GR protein ekspresyon seviyesinin western blot yöntemiyle belirlenmesi

4.6. Enzim Aktivitesi Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirme

4.6.1. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aktivite sonuçları

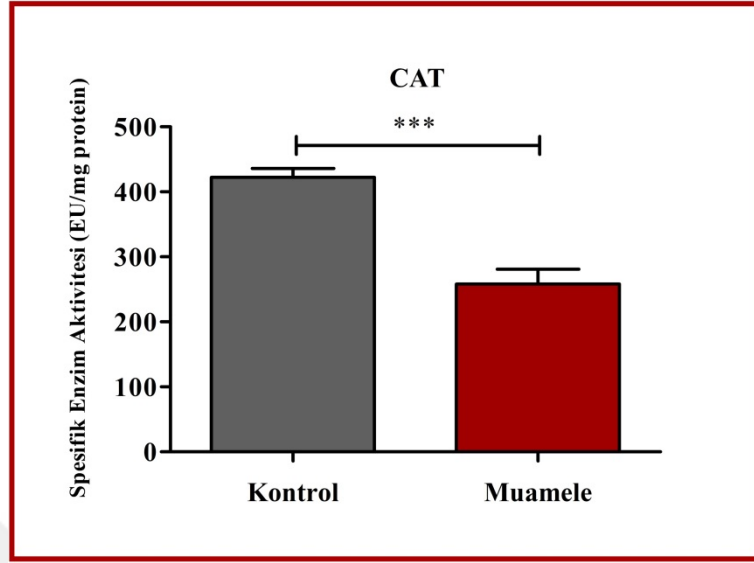
Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin aktivite seviyesi λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli olmayan azalış göstermiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında SOD enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi

4.6.2. Katalaz (CAT) enzimi aktivite sonuçları

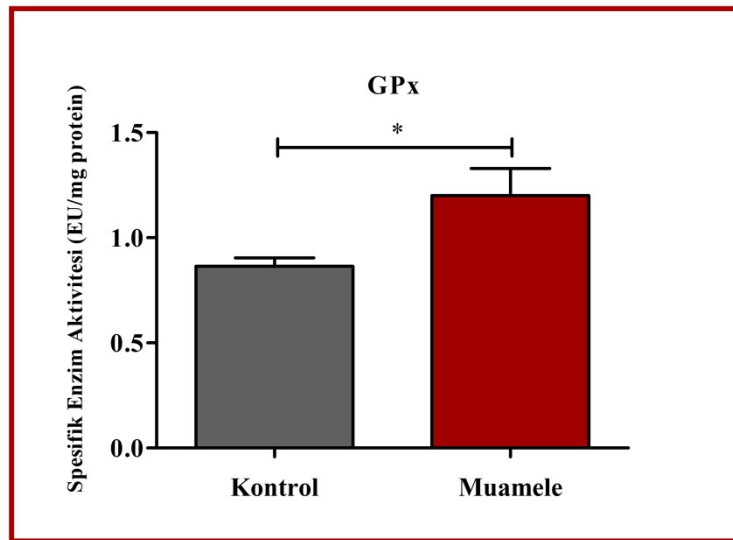
Katalaz (CAT) enziminin aktivite seviyesi λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalış göstermiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında CAT enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi

4.6.3. Glutasyon peroksidaz (GPx) enzimi aktivite sonuçları

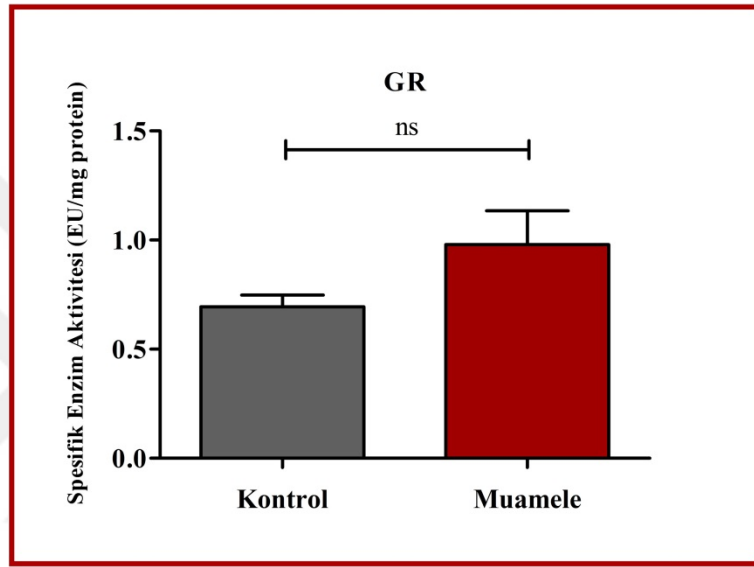
Glutasyon peroksidaz (GPx) enziminin aktivite seviyesi λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış göstermiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında GPx enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi

4.6.4. Glutatyon redüktaz (GR) enzimi aktivite sonuçları

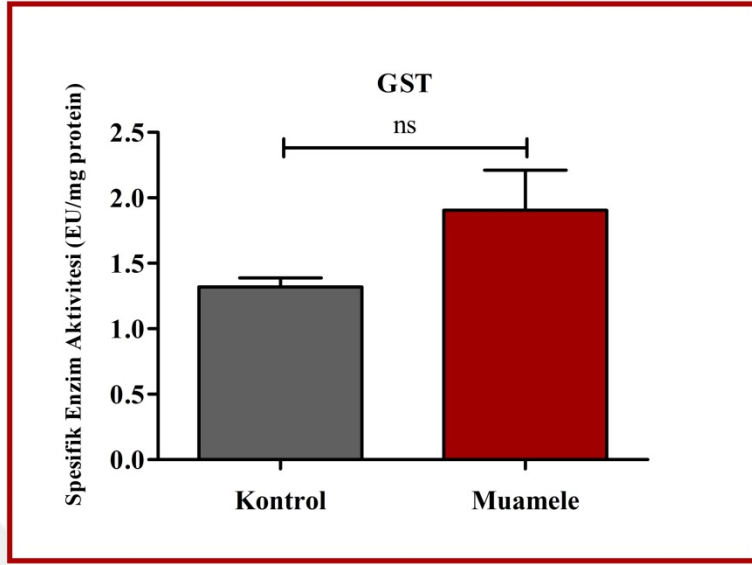
Glutatyon redüktaz (GR) enziminin aktivite seviyesi λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli olmayan artış göstermiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında GR enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi

4.6.5. Glutatyon S-transferaz (GST) enzimi aktivite sonuçları

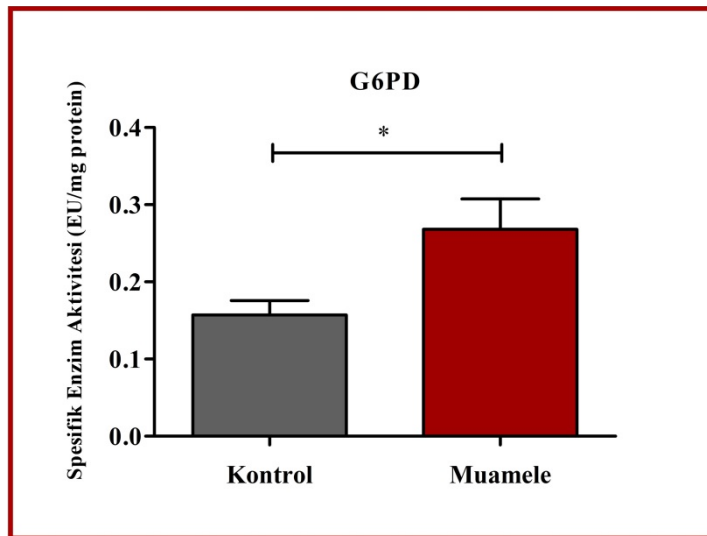
Glutatyon S-transferaz (GST) enziminin aktivite seviyesi λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli olmayan artış göstermiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında GST enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi

4.6.6. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi aktivite sonuçları

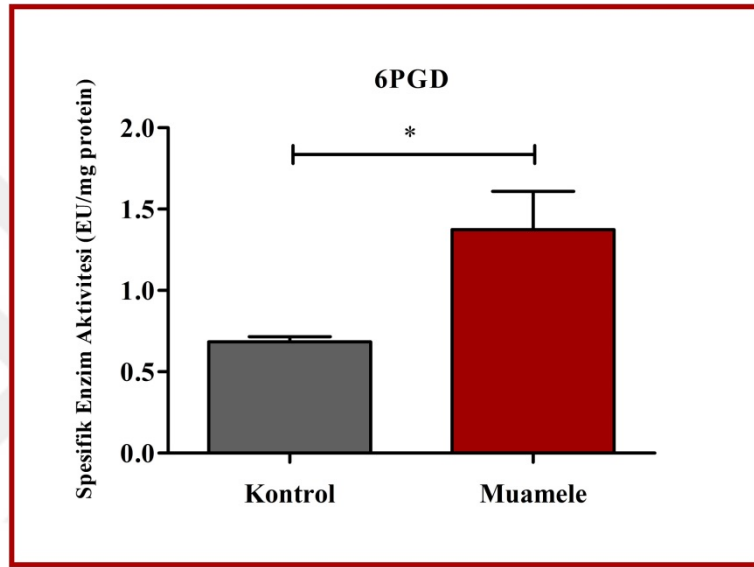
Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enziminin aktivite seviyesi λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış göstermiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında G6PD enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi

4.6.7. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) enzimi aktivite sonuçları

6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) enziminin aktivite seviyesi λ -Carrageenan muamele grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış göstermiştir ($p<0,01$) (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Kontrol grubu ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında 6PGD enzim aktivite seviyesinin belirlenmesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnflamasyon çeşitli endojen ve eksojen etkenler sonucu meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesinin, nükleik asit protein gibi hücrel makromoleküllere zarar vermesi ile çoğu hastalığın patolojik temelini oluşturmaktadır (Kocpinar 2015). Carrageenan'ın (CGN) insan kolonik epitelyal hücrelerinde Bcl10 aracılığıyla inflamasyon yollarını aktive ettiği saptanmıştır. Bu kaskadın aktivasyonu nükleer faktör κ B (NF κ B)'nin nükleer translokasyonunu indüklemekte ve hücrelerden interlökin-8 (IL-8) salınımını artırmaktadır (Bhattacharyya *et al.* 2008).

İnterlökin-6 (IL-6) ise normal fizyolojik ve hastalık durumlarında metabolik regülasyonu etkileyen pleiotropik sitokindir (Kamimura *et al.* 2003). Artan sistemik IL-6 konsantrasyonu tip 2 diyabet, adipoz dokulardan sitokin üretiminin temel kaynağı gibi çeşitli patofizyolojik durumlarla ilişkilidir. Ayrıca IL-6'nın insülin direncini meydana getirdiği ve glukoz homeostazisini bozduğu düşünülmektedir (Ellingsgaard *et al.* 2011).

Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- α), patojenlere maruz kalma ve çeşitli yaralanmalar sonucu makrofajlardan üretilip bölgesel ve sistemik inflamasyon için gerekli sitokin çeşididir. TNF- α 'daki lokal artış ateş, şişme, kızarıklık ve ağrıya sebep olabilmektedir. TNF ailesi diğer hücreleri aktive etmesi ve interlökin-1 (IL-1), yüksek mobilite grubu B1 (HMGB1) gibi sitokinleri, ROS, nitrik oksit türevleri (NOS), eikosanoidler gibi medyatörlerin salınımını sağlamasıyla inflamator yanıtı artırarak inflamasyon ve doku hasarı oluşturmaktadır. TNF'ler invazyon süresince inflamasyon ekspresyonunun tamamlanması için gereklidir ve sınırlı inflamasyon TNF'lerin aktivitesinin düşmesiyle karakterize olmaktadır (Tracey 2002).

Düşük miktardaki TNF'lerin seviyesi, patojenik organizmaların yayılmasını sınırlayarak savunma oluşturup, istila edici ajanlara koagüle olmasını düzenleyebilir ve hasarlı dokuların gelişimini uyarabilir. Tipik 'başarılı' bir inflamator yanıtta, TNF'lerin

salınımı sınırlıdır, koruyucu aktiviteleri baskındır ve salınımı sistemik şekilde gerçekleşmemektedir (Tracey 2002).

Bu çalışma ile inflamasyonun karaciğer dokusunda antioksidan sistem, karsinogenez, epigenetik mekanizmalar ve demir metabolizması üzerine etkisinin ayrıntılı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kontrol ve λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer dokularında çalışmalar yapılarak sonuçlar tartışılmıştır. Bu tez çalışmasında da Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanılarak steril tuz solüsyonunda hazırlanan 10 mg/kg λ -Carrageenan çözeltisi enjeksiyonundan 6-8 saat sonra inflamasyon marker olan IL-6 ve TNF- α 'nın gen ekspresyon seviyelerinde önemli derecede artış gözlenmiştir. Bunun sonucunda deneysel modellerde inflamasyon olduğu kanısına varılmıştır.

ROS seviyesindeki aşırı artış ya da antioksidan sistem yetersizliği sinyal iletim yolları, apoptozis ve hücrel bileşenlere zarar vererek oksidatif stresi meydana getirir (Dağdelen 2015). Circu *et al.* post-oksidanlara maruz kalma sonucu, GSH/GSSG redoks durumunda iyileşme olan hücrelerin apoptozisten kaçamadığını belirtmiştir. Hücre membranında apoptotik sinyal oluşumu ile GSH dışarı sızıntısı arasındaki bağlantı tam olarak anlaşılamamıştır. GSH sızıntısının ROS üretimi ile ilişkisi bilinmekte ve çoğu çalışmada ROS kaynaklı oksidatif hasarın apoptotik sinyal aktivasyonu ile bağlantılı olduğu da kanıtlanmıştır (Circu and Aw 2012). 2015 yılında yapılan tez çalışmasında inflamasyon durumunda fare böbrek dokularında lipid peroksidasyon belirteci olan MDA seviyesinde artış olduğu gözlemlenmiştir (Dağdelen 2015).

Bu tez çalışmasında GSH ve GSSG seviyesinde azalış olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan MDA tayini sonucu artış olduğu gözlenmiştir. GSH seviyesindeki azalış ve MDA seviyesindeki artış oksidatif stres oluşumunu belirtmekte olup, GSSG seviyesinde azalışın sistemin oksidatif hasara tepki oluşturduğu yönünde yorum olarak sunulabilir. Bunun yanı sıra doku hasarı oluşumu ve seviyesini belirlemek için yapılan Hematoxylin & Eosin (H&E) yöntemiyle yüksek seviyede olmasa da λ -Carrageenan muamele gruplarında doku hasarı olduğu gözlenmiştir.

ROS belirli seviyede, önemli fizyolojik şartların oluşumunda vücut için gereklidir (Li *et al.* 2015). İnflamatör hücreler arasıdonik asit, sitokinler ve kemokinler gibi çözülebilir medyatörler üretirler. Bu medyatörler NF- κ B, transkripsiyon 3 sinyal transdüser ve aktivatörü (STAT3), hipoksi kaynaklı faktör 1 alfa (HIF-1 α), aktivatör protein 1 (AP-1), nükleer faktör aktive T hücreleri, NF-E2 ilişkili faktör 2 (Nrf-2) gibi hücresel stres yanıtlarını oluşturan sinyal transdüksiyon yollarını aktive eder (Reuter *et al.* 2010). NF- κ B üzerinden sistein katepsin inhibisyonu tarafından etkilenen tümör nekrozis faktör (TNF), lipopolisakkarit (LPS) gibi hepatik hasar ve inflamasyonun fizyolojik efektörleri farklı karaciğer hücre tiplerinde analiz edilmiştir (de Mingo *et al.* 2016). Nrf2, NF- κ B ve AP-1 gibi önemli transkripsiyon faktörleri H₂O₂ bağımlı thiol rezidülerinin oksidasyonu ile aktive olmaktadır. Bu transkripsiyon faktörleri hücresel antioksidan kodlayan çeşitli genleri aktive edebilir. Böylece düşük ROS seviyesi, yüksek ROS seviyesinin üstünü örtebilir (Muriel and Gordillo 2016).

Bu tez kapsamında incelenen transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin gen ekspresyon seviyesinde artış meydana gelmesi sonucu karsinogenezin de dahil olduğu çeşitli hücresel sinyal yollarının aktive olabileceğini düşündürmektedir.

AEG-1, MTDH olarak da bilinmektedir ve tümör proliferasyonu, metastaz gibi mekanizmalarda rol almaktadır. Robertson ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada AEG-1 nakavt farelerin normal kontrol bireyleriyle aynı seviyede yüksek yağlı diyetle beslenmesine rağmen kilo artışı kaydedemedikleri saptanmıştır (Robertson *et al.* 2015). Bu tez çalışması sonucunda MTDH gen ekspresyon seviyesinde önemli bir değişime rastlanmamaktadır. Bundan dolayı akut inflamasyon yardımıyla çalışmamızdaki deneysel modelin tümör proliferasyonu ve metastaz gibi karsinogenezin ileri aşamalarına ulaşamadığı yorumu yapılabilir.

Dağdelen tarafından (2015) yılında yapılan tez çalışmasında BALB/c ırkı farelere 2 mg/kg LPS enjekte edilerek inflamasyon oluşturulmuştur (Dağdelen 2015). Elde edilen böbrek dokularında antioksidan sistemin moleküler seviyede etkilendiği gözlenmiştir. Ayrıca başka çalışmalarda etanol ve dimethoat karışımıyla muamele edilen fare

karaciğer dokularında sitokrom P450 ve lipid peroksidasyonunda artış, SOD, GPx, GR, GSH seviyelerinde ise azalış gözlemlendiğini belirlenmiştir (Babczynska *et al.* 2006; Li *et al.* 2015).

Xu ve arkadaşlarını çalışmalarında Cd kaynaklı ROS miktarındaki artışın, GSH seviyesinde azalışa sebep olduğu ve hücrede G6PD seviyesinin kadmiyuma karşı hassas olduğunu tespit etmiştir. G6PD ekspresyon seviyesi Cd konsantrasyonu ve muamele zamanına göre artış ya da azalış göstermiştir (Xu *et al.* 2003). Son zamanlarda G6PD'nin redoks imbalans kaynaklı apoptozisten korunma için önemli role sahip olduğunu belirtilmiştir. Glutasyon hücresel oksidatif hasara karşı koruma sağlar, apoptozisi inhibe eder, bu nedenle G6PD eksikliği olan bireylerin hücrelerinin DNA hasarı ve apoptozise karşı duyarlı olduğu düşünülmektedir. Efferth ve arkadaşları yaptıkları çalışmada G6PD eksikliği olan erkek bireylerin periferik mononükleer hücrelerinin (PBMC), sitostatik ilaçlar, gamma radyasyonu, veya glukokortikoidler gibi uyarılarla muamele edildiğinde sağlıklı erkek PBMC hücrelerinden daha fazla apoptotik oranlara sahip olduğunu gözlemlemiştir (Efferth *et al.* 2006). Lin ve arkadaşları (2015) tarafından G6PD knockdown kanser hücrelerinin, artan ROS seviyesi ve bununla birlikte azalan NADPH/NADP⁺ oranı incelenmiştir. Antioksidan ajan olan N-asetilsistein (NAC) uygulandığında lipojeniz seviyesinde düşük seviyede azalma olurken, ROS seviyesinde önemli derece azalma gözlenmiştir (Lin *et al.* 2015).

Bu tez çalışmasında da antioksidan sistem yolağına ait CAT'ın gen ve protein ekspresyon seviyeleri ile enzim aktivitesinde azalış gözlenmekte olup genomik ve proteomik seviyeler arasında korelasyon olduğu sonucuna varılmıştır. CAT seviyelerindeki korele azalış gözlenirken, SOD'un gen ekspresyon seviyesinde azalışa rastlanıp enzim aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmemiştir. GPx'in gen ekspresyon seviyesi ve enzim aktivitesinde artış olurken protein ekspresyon seviyesinde azalış gözlenmiştir. Bu korelasyon olmayan ilişkinin protein yarılanma süresi veya gen ekspresyon sonucunun henüz protein ekspresyonuna etki etmemiş olması gibi koşullardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. GR'nin gen ve protein ekspresyon seviyelerinde azalışa rastlanırken enzim aktivitesinde önemli bir değişim görülmemiştir.

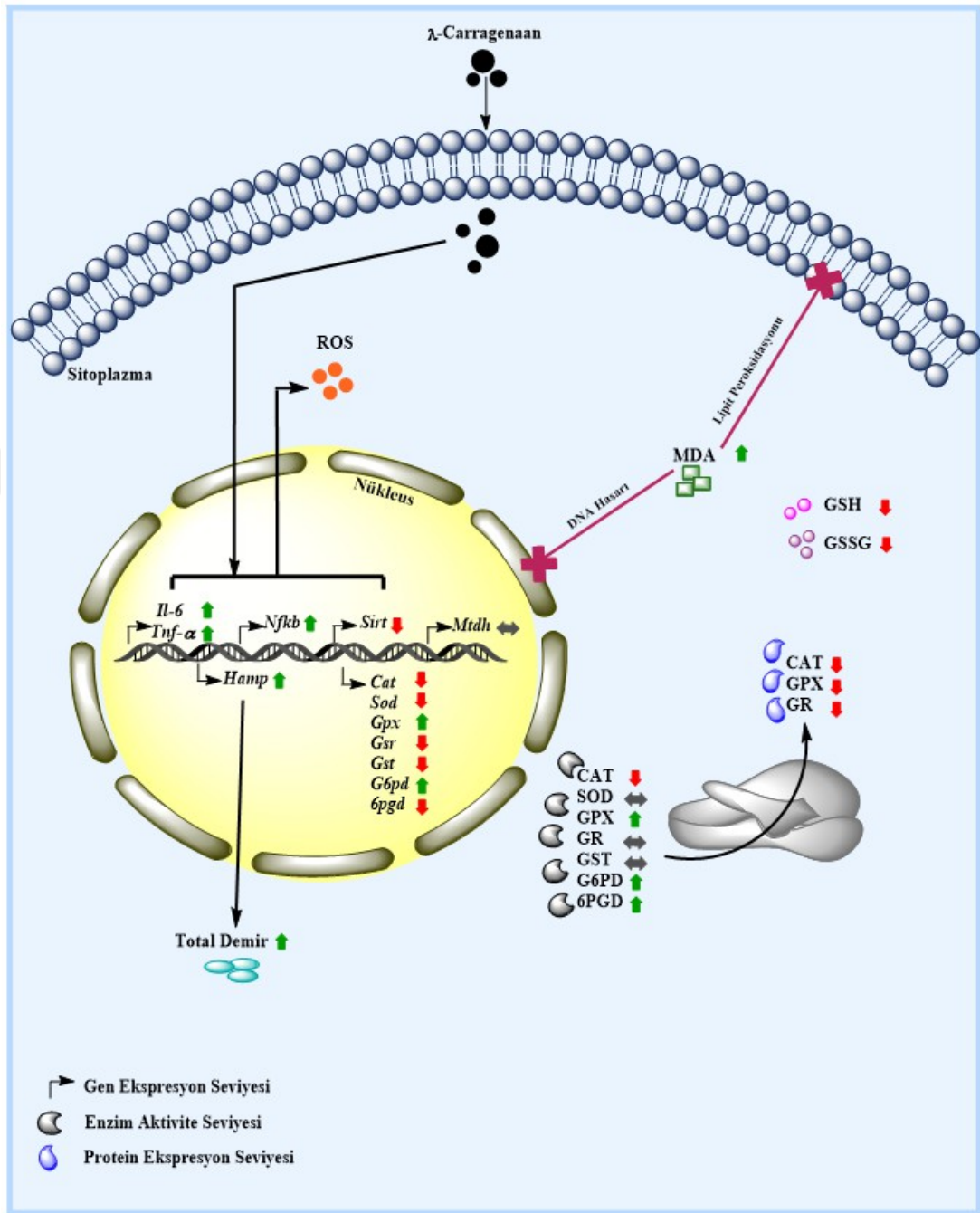
Detoksifikasyon mekanizmasına sahip olan GST'nin gen ekspresyon seviyesinde azalış görülürken, enzim aktivitesinde değişime rastlanmamıştır. Genel olarak bu yolaktaki gen, protein ve enzimatik aktivite azalışları ROS seviyesindeki artışın antioksidan sisteme baskın geldiğini düşündürmektedir. Ancak GPx'in gen seviyesindeki artış antioksidan savunma sisteminin bir noktada oksidatif strese karşı direnç gösterdiği söylenebilir. Bundan dolayı akut inflamasyonun aktif bir şekilde etki etmeye çalıştığı düşünülebilir.

Oksidatif pentoz fosfat yolağının (PPP) ilk enzimi G6PD'nin gen ekspresyon seviyesi ve enzim aktivitesinde korele olarak artış gözlenmiştir. G6PD seviyesinde azalışın hücrede hasar ve apoptozise karşı duyarlılık oluşturduğu bilindiğine göre, inflamasyon sonucu bu deney modelinde antioksidan sistemin G6PD üzerinden savunma oluşturduğu fikri öne sürülebilir. PPP yolağının diğer enzimi olan 6PGD'nin ise çeşitli kanser türlerinde upregüle olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada 6PGD'nin gen ekspresyon seviyesindeki azalış antioksidan sistemin savunma yönünü ortaya koyarken enzim aktivitesinde artış ise hücrenin ROS kaynaklı hasara duyarlılığını artırabileceğini düşündürmektedir.

Kromatin yapısını değiştirme işlemi histon asetiltransferaz ve deasetiltransferazlar tarafından gerçekleşen histon modifikasyonlarıyla sağlanmaktadır. HAT ve HDAC'lar tarafından kromatinlerin belli bölgelerinde histonların asetilasyona uğraması, o bölgede transkripsiyonel açıdan aktifleşme sağlarken, deasetile olması transkripsiyonel baskılanma oluştuğunu göstermektedir (Cakir 2016). Histon asetil gruplarını hidroliz eden Sirtuin'ler sınıf III HDAC ailesi içinde bulunmaktadırlar. SIRT1 tümör baskılayıcı özelliğinin yanında nörodejeneratif hastalıklar, obezite, tip 2 diyabet gibi hastalıklar üzerinde koruyucu etkiye sahiptir (Yang *et al.* 2007; Nogueiras *et al.* 2012; Nakagawa and Guarente 2014). Hepatik SIRT1 glikoz, lipid ve kolesterol homeostazisini regüle eden çeşitli transkripsiyon faktörlerini kontrol eder. A de Mingo *et al.* (2016) karaciğer-spesifik SIRT1 nakavt farelerde hepatik steatoz oluşumu gerçekleştiğini gözlemlemiştirlerdir. İndirgenmiş inflamasyon sonucu obez bireylerde kilo kaybının, karaciğer ve adipoz dokularda Sirtuin ekspresyonunu önemli derecede artırdığı tespit

edilmiştir. İnflamasyona ilişkin olarak, NF- κ B SIRT1'in hedefi olarak tanımlanmıştır (de Mingo *et al.* 2016). Bu tez çalışmasında SIRT1'in gen ekspresyon seviyesinde azalış belirlenmiştir. Bu durum deney modellerinde tümör oluşumunun gerçekleşebileceğini ve histopatolojik doku hasar analizi sonuçlarını destekleyebildiğini göstermektedir. Aynı zamanda SIRT1 gen ekspresyonundaki azalış karsinogenez mekanizmasının MTDH yerine SIRT1 üzerinden gerçekleşebileceği, hücre döngüsünün, apoptozis ve proliferasyon mekanizmalarının bozulmuş olabileceği düşüncesini destekleyebilir. Buna ek olarak Jeong *et al.* SIRT3 nakavt fare pankreas dokusunda demir birikimi meydana geldiğini böylece SIRT3 eksikliğinin toksik etki oluşturabileceğini belirtmiştir (Jeong *et al.* 2015). Normal koşullarda hücrede demir homeostazisi kritik öneme sahiptir. ROS oluşumu sonucu bozulan demir homeostazisi, kanser gelişimine sebep olabilmektedir. Çeşitli çalışmalar da kolorektal, karaciğer, böbrek, akciğer ve mide kanserleri ile yüksek demir seviyesi arasında ilişki olduğunu ortaya koymuştur.

Hepsidin, vücudun demir homeostazisini sağlayan ve salınımı karaciğerde gerçekleşen polipeptit hormondur. İnflamasyon durumunda makrofajlardan sitokinler JAK/STAT yolağını aktive ederek Hepsidin ekspresyonunu uyarmaktadır (Richardson *et al.* 2009; Darshan *et al.* 2010; Jeong *et al.* 2015). Bu tez çalışmasında Hepsidin gen ekspresyon seviyesinde, hücresel total demir içeriği seviyesinde artış olduğu gözlenmiştir. Buna ek olarak histopatolojik Perls' Blue yöntemiyle dokuda demir birikiminin kalitatif olarak varlığı ortaya konmuştur.



Şekil 5.1. Akut inflamasyonun antioksidan sistem ve çeşitli yollar üzerine etkisinin şematize edilmesi

Sonuç olarak; bu tez kapsamında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- I. λ -Carrageenan muamele edilen sıçan gruplarında IL-6 ve TNF- α gen ekspresyonlarında artış gözlemlenmesiyle inflamasyon modelinin oluştuğu gösterildi.
- II. İnflamasyon oluşum sonucu ROS artışı ve oksidatif stres belirteci olan GSH, GSSG ve MDA seviyelerinde önemli derecede değişiklikler görüldü. GSH ve GSSG seviyelerinde azalış gözlenirken, MDA seviyesinde artış belirlendi.
- III. Doku hasarı oluşumunu belirlemek amacıyla H&E metoduyla histopatolojik analizler yapıldı. Bu analiz sonucunda λ -Carrageenan muamele grubu sıçan karaciğer doku kesitlerinde oksidatif stres oluşumunu da destekleyen doku hasarının meydana geldiği belirlendi.
- IV. İnflamasyona yanıt olarak antioksidan savunma sistemi üyelerinin kantitatif gen ve protein ekspresyon seviyeleri ve enzim aktiviteleri incelendi. SOD gen seviyesinde azalış gösterirken enzim aktivitesi göstermedi. CAT gen, protein ekspresyon seviyelerinde ve enzim aktivitesinde korele azalış gösterdi. GPx gen ekspresyon seviyesi ve enzim aktivitesinde artış, protein ekspresyonunda ise azalış gözlemlendi. GR gen ve protein seviyesinde azalış gösterirken enzim aktivitesinde değişiklik gözlenmedi. GST gen seviyesinde azalış ortaya çıkarken enzim aktivitesinde değişikliğe rastlanmadı. Oksidatif pentoz fosfat yolağı enzimlerinden G6PD gen seviyesi ve enzim aktivitesinde korele artış gösterirken, bu yolağın diğer enzimi olan 6PGD'nin gen ekspresyon seviyesinde azalış gözlemlendi ancak enzim aktivitesinde artış ortaya çıktı. Bunun sonucunda inflamasyona bağlı olarak oksidatif stres yolağının bazı kısımlarında antioksidan sistemin yetersiz kaldığı bazı kısımlarda ise homeostazinin bozulmaması için bir yanıt oluşturulduğu saptandı.
- V. İnflamasyonun antioksidan sistem ve ilişkili mekanizmalar üzerine etkisinin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi için karsinogenez, epigenetik mekanizmalar ve demir homeostazisi yolağı gibi ek çalışmalar yapıldı.
- VI. Karsinogenez yolağında rol alan ve birçok sinyal yolağını aktifleştirebilen transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin gen ekspresyon seviyesinde artış gözlemlendi. Karsinogeneze sebep olan MTDH'nin gen ekspresyon seviyesinde ise değişikliğe rastlanmadı. İnflamasyon yolağı dahilinde epigenetik mekanizmalar içerisinde yer alan ve hücrede kansere karşı koruma etkisine sahip olan histon deasetilaz üyesi SIRT'in gen ekspresyon seviyesinde azalış olduğu görüldü. Bu durum karsinogenezin MTDH yerine SIRT üzerinden ilerleyebileceğini düşündürülebilir.

VII. Bu yolaklarla ilişkili demir homeostazisi mekanizmasında rol alan *Hamp* gen ekspresyon seviyesi ve hücrel demir içeriğinde önemli derecede artış gözlemlendi. Ayrıca bu sonuçlara korele olarak Perls' Prussian Blue yöntemiyle λ -Carragenaan muamele grubu sıçan karaciğer doku kesitlerinde demir birikimi histopatolojik olarak gösterildi.



KAYNAKLAR

- Anonymous. (2016). "Inflammation." from <https://en.wikipedia.org/wiki/Inflammation>.
- Babczynska, A., G. Wilczek and P. Migula (2006). "Effects of dimethoate on spiders from metal pollution gradient." *Sci Total Environ* 370(2-3): 352-359.
- Bakala, H., M. Hamelin, J. Mary, C. Borot-Laloi and B. Friguet (2012). "Catalase, a target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging." *Biochim Biophys Acta* 1822(10): 1527-1534.
- Bhattacharyya, S., P. K. Dudeja and J. K. Tobacman (2008). "CARRAGEENAN-INDUCED NF κ B ACTIVATION DEPENDS ON DISTINCT PATHWAYS MEDIATED BY REACTIVE OXYGEN SPECIES AND HSP27 OR BY BCL10." *Biochimica et biophysica acta* 1780(0): 973-982.
- Birben, E., U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum and O. Kalayci (2012). "Oxidative Stress and Antioxidant Defense." *The World Allergy Organization journal* 5(1): 9-19.
- Borthakur, A., S. Bhattacharyya, A. N. Anbazhagan, A. Kumar, P. K. Dudeja and J. K. Tobacman (2012). "Prolongation of carrageenan-induced inflammation in human colonic epithelial cells by activation of an NF κ B-BCL10 loop." *Biochim Biophys Acta* 1822(8): 1300-1307.
- Bradley, J. R. (2008). "TNF-mediated inflammatory disease." *J Pathol* 214(2): 149-160.
- Brown, D. M. and E. Ruoslahti (2004). "Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis." *Cancer Cell* 5(4): 365-374.
- Budak, H. K., E.F.; Gönül, N.; Çakır, Ş.N.; Bastem, A. (2016). Western Blot Tekniği.
- Budak, H., H. Ceylan, E. F. Kocpinar, N. Gonul and O. Erdogan (2014). "Expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in oxidative stress induced by long-term iron toxicity in rat liver." *J Biochem Mol Toxicol* 28(5): 217-223.
- Cakir, S. N. (2016). Tip60 Geninin Fare Karaciğer Dokusundaki İnflamasyon Yolağı Üzerine Etkisinin Gen ve Protein Seviyesinde Araştırılması, Atatürk Üniversitesi.
- Circu, M. L. and T. Y. Aw (2012). "Glutathione and modulation of cell apoptosis." *Biochim Biophys Acta* 1823(10): 1767-1777.
- Crespo, J., A. Cayon, P. Fernandez-Gil, M. Hernandez-Guerra, M. Mayorga, A. Dominguez-Diez, J. C. Fernandez-Escalante and F. Pons-Romero (2001). "Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients." *Hepatology* 34(6): 1158-1163.
- Dağdelen, B. (2015). İnflamasyonun Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Fare Böbrek Dokusunda Transkriptomik ve Proteomik Seviyede Araştırılması, Atatürk Üniversitesi.
- Dahiru, D. and O. Obidoa (2008). "Evaluation of the Antioxidant Effects of Ziziphus Mauritiana Lam. Leaf Extracts Against Chronic Ethanol-Induced Hepatotoxicity in Rat Liver." *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines* 5(1): 39-45.
- Darshan, D., D. M. Frazer, S. J. Wilkins and G. J. Anderson (2010). "Severe iron deficiency blunts the response of the iron regulatory gene Hamp and pro-

- inflammatory cytokines to lipopolysaccharide." *Haematologica* 95(10): 1660-1667.
- de Mingo, A., E. de Gregorio, A. Moles, N. Tarrats, A. Tutusaus, A. Colell, J. C. Fernandez-Checa, A. Morales and M. Mari (2016). "Cysteine cathepsins control hepatic NF-kappaB-dependent inflammation via sirtuin-1 regulation." *Cell Death Dis* 7(11): e2464.
- Delcuve, G. P., D. H. Khan and J. R. Davie (2012). "Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors." *Clin Epigenetics* 4(1): 5.
- Deng, H., Z. Zhou, W. Tu, H. Huang and D. Tian (2013). "AEG1 induces COX-2 expression via activation of NF-kB and AP-1 in hepatoma HepG2 cells." *Chinese-German J Clin Oncol* Vol. 12: 3.
- Ear, T. and P. P. McDonald (2008). "Cytokine generation, promoter activation, and oxidant-independent NF-kB activation in a transfectable human neutrophilic cellular model." *BMC Immunology* 9: 14-14.
- Efferth, T., S. M. Schwarzl, J. Smith and R. Osieka (2006). "Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase for oxidative stress and apoptosis." *Cell Death Differ* 13(3): 527-528; author reply 529-530.
- Ellingsgaard, H., I. Hauselmann, B. Schuler, A. M. Habib, L. L. Baggio, D. T. Meier, E. Eppler, K. Bouzakri, S. Wueest, Y. D. Muller, A. M. Hansen, M. Reinecke, D. Konrad, M. Gassmann, F. Reimann, P. A. Halban, J. Gromada, D. J. Drucker, F. M. Gribble, J. A. Ehses and M. Y. Donath (2011). "Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells." *Nat Med* 17(11): 1481-1489.
- Ercal, N., H. Gurer-Orhan and N. Aykin-Burns (2001). "Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage." *Curr Top Med Chem* 1(6): 529-539.
- Gerner, R. R., V. Wieser, A. R. Moschen and H. Tilg (2013). "Metabolic inflammation: role of cytokines in the crosstalk between adipose tissue and liver." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 91(11): 867-872.
- Gerschman, R., D. L. Gilbert, S. W. Nye, P. Dwyer and W. O. Fenn (1954). "Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common." *Science* 119(3097): 623-626.
- Ghezzi, P. (2011). "Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung." *International Journal of General Medicine* 4: 105-113.
- Ham, M., J. W. Lee, A. H. Choi, H. Jang, G. Choi, J. Park, C. Kozuka, D. D. Sears, H. Masuzaki and J. B. Kim (2013). "Macrophage glucose-6-phosphate dehydrogenase stimulates proinflammatory responses with oxidative stress." *Mol Cell Biol* 33(12): 2425-2435.
- Hatada, E. N., A. Nieters, F. G. Wulczyn, M. Naumann, R. Meyer, G. Nucifora, T. W. McKeithan and C. Scheidereit (1992). "The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(6): 2489-2493.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." *Cell* 132(3): 344-362.
- Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." *Nature* 444(7121): 860-867.

- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill and B. M. Spiegelman (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance." *Science* 259(5091): 87-91.
- Iskusnykh, I. Y., T. N. Popova, A. A. Agarkov, M. Pinheiro de Carvalho, A. and S. G. Rjevskiy (2013). "Expression of Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase and Level of Free Radical Processes under Toxic Hepatitis in Rats." *Journal of Toxicology* 2013: 9.
- Jaenisch, R. and A. Bird (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." *Nat Genet*.
- Jeong, S. M., J. Lee, L. W. Finley, P. J. Schmidt, M. D. Fleming and M. C. Haigis (2015). "SIRT3 regulates cellular iron metabolism and cancer growth by repressing iron regulatory protein 1." *Oncogene* 34(16): 2115-2124.
- Kamimura, D., K. Ishihara and T. Hirano (2003). "IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149: 1-38.
- Khuda, II, N. Koide, A. S. Noman, J. Dagvadorj, G. Tumurkhuu, Y. Naiki, T. Komatsu, T. Yoshida and T. Yokochi (2009). "Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) is induced by lipopolysaccharide as toll-like receptor 4 (TLR4) ligand and regulates TLR4 signalling." *Immunology* 128(1 Suppl): e700-706.
- Kocpinar, E. F. (2015). Tip60 Geninin Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Karaciğer Spesifik Tip60 Nakavt Farelerde Araştırılması Atatürk Üniversitesi.
- Kovacic, P., R. S. Pozos, R. Somanathan, N. Shangari and P. J. O'Brien (2005). "Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships." *Curr Med Chem* 12(22): 2601-2623.
- Legube, G. and D. Trouche (2003). "Regulating histone acetyltransferases and deacetylases." *EMBO Rep* 4(10): 944-947.
- Li, S., H.-Y. Tan, N. Wang, Z.-J. Zhang, L. Lao, C.-W. Wong and Y. Feng (2015). "The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 16(11): 26087-26124.
- Lin, R., S. Elf, C. Shan, H. B. Kang, Q. Ji, L. Zhou, T. Hitosugi, L. Zhang, S. Zhang, J. H. Seo, J. Xie, M. Tucker, T. L. Gu, J. Sudderth, L. Jiang, M. Mitsche, R. J. DeBerardinis, S. Wu, Y. Li, H. Mao, P. R. Chen, D. Wang, G. Z. Chen, S. J. Hurwitz, S. Lonial, M. L. Arellano, H. J. Khoury, F. R. Khuri, B. H. Lee, Q. Lei, D. J. Brat, K. Ye, T. J. Boggon, C. He, S. Kang, J. Fan and J. Chen (2015). "6-Phosphogluconate dehydrogenase links oxidative PPP, lipogenesis and tumour growth by inhibiting LKB1-AMPK signalling." *Nat Cell Biol* 17(11): 1484-1496.
- Mallikarjuna, K., K. R. Shanmugam, K. Nishanth, M. C. Wu, C. W. Hou, C. H. Kuo and K. S. Reddy (2010). "Alcohol-induced deterioration in primary antioxidant and glutathione family enzymes reversed by exercise training in the liver of old rats." *Alcohol* 44(6): 523-529.
- Matos, M. F., D. M. Lourenço, C. M. Orikaza, C. P. Gouveia and V. M. Morelli (2012). "Abdominal Obesity and the Risk of Venous Thromboembolism Among Women: A Potential Role of Interleukin-6." *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 11(1): 29-34.

- Medzhitov, R. (2008). "Origin and physiological roles of inflammation." *Nature* 454(7203): 428-435.
- Morgan, M. J. and Z. G. Liu (2011). "Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling." *Cell Res* 21(1): 103-115.
- Moron, M. S., J. W. Depierre and B. Mannervik (1979). "Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver." *Biochim Biophys Acta* 582(1): 67-78.
- Moschen, A. R., C. Molnar, S. Geiger, I. Graziadei, C. F. Ebenbichler, H. Weiss, S. Kaser, A. Kaser and H. Tilg (2010). "Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha expression." *Gut* 59(9): 1259-1264.
- Muriel, P. and K. R. Gordillo (2016). "Role of Oxidative Stress in Liver Health and Disease." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 9037051.
- Nakagawa, T. and L. Guarente (2014). "SnapShot: sirtuins, NAD, and aging." *Cell Metab* 20(1): 192-192.e191.
- Nanji, A. A., K. Jokelainen, M. Fotouhinia, A. Rahemtulla, P. Thomas, G. L. Tipoe, G. L. Su and A. J. Dannenberg (2001). "Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(6): G1348-1356.
- Nemeth, E. and T. Ganz (2006). "Regulation of iron metabolism by hepcidin." *Annu Rev Nutr* 26: 323-342.
- Newson, J., M. Stables, E. Karra, F. Arce-Vargas, S. Quezada, M. Motwani, M. Mack, S. Yona, T. Audzevich and D. W. Gilroy (2014). "Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity." *Blood* 124(11): 1748-1764.
- Nobrega-Pereira, S., P. J. Fernandez-Marcos, T. Brioché, M. C. Gomez-Cabrera, A. Salvador-Pascual, J. M. Flores, J. Vina and M. Serrano (2016). "G6PD protects from oxidative damage and improves healthspan in mice." *Nat Commun* 7: 10894.
- Nogueiras, R., K. M. Habegger, N. Chaudhary, B. Finan, A. S. Banks, M. O. Dietrich, T. L. Horvath, D. A. Sinclair, P. T. Pfluger and M. H. Tschoop (2012). "Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism." *Physiol Rev* 92(3): 1479-1514.
- Park, J., H. K. Rho, K. H. Kim, S. S. Choe, Y. S. Lee and J. B. Kim (2005). "Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity." *Mol Cell Biol* 25(12): 5146-5157.
- Park, J., S. S. Choe, A. H. Choi, K. H. Kim, M. J. Yoon, T. Suganami, Y. Ogawa and J. B. Kim (2006). "Increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipocytes stimulates oxidative stress and inflammatory signals." *Diabetes* 55(11): 2939-2949.
- Petersen, A. M. and B. K. Pedersen (2005). "The anti-inflammatory effect of exercise." *J Appl Physiol* (1985) 98(4): 1154-1162.
- Popa, C., M. G. Netea, P. L. van Riel, J. W. van der Meer and A. F. Stalenhoef (2007). "The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk." *J Lipid Res* 48(4): 751-762.

- Reuter, S., S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi and B. B. Aggarwal (2010). "Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?" *Free radical biology & medicine* 49(11): 1603-1616.
- Richardson, D. R., D. S. Kalinowski, S. Lau, P. J. Jansson and D. B. Lovejoy (2009). "Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents." *Biochim Biophys Acta* 1790(7): 702-717.
- Ridnour, L. A., J. S. Isenberg, M. G. Espey, D. D. Thomas, D. D. Roberts and D. A. Wink (2005). "Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(37): 13147-13152.
- Robertson, C. L., J. Srivastava, A. Siddiq, R. Gredler, L. Emdad, D. Rajasekaran, M. Akiel, X. N. Shen, F. Corwin, G. Sundaresan, J. Zweit, C. Croniger, X. Gao, S. Ghosh, P. B. Hylemon, M. A. Subler, J. J. Windle, P. B. Fisher and D. Sarkar (2015). "Astrocyte Elevated Gene-1 (AEG-1) Regulates Lipid Homeostasis." *J Biol Chem* 290(29): 18227-18236.
- Ropero, S. and M. Esteller (2007). "The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer." *Mol Oncol* 1(1): 19-25.
- Sarkar, S., P. Yadav, R. Trivedi, A. K. Bansal and D. Bhatnagar (1995). "Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues." *J Trace Elem Med Biol* 9(3): 144-149.
- Serhan, C. N. (2014). "Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology." *Nature* 510(7503): 92-101.
- Shanmugam, K. R., K. Mallikarjuna and K. S. Reddy (2011). "Effect of alcohol on blood glucose and antioxidant enzymes in the liver and kidney of diabetic rats." *Indian Journal of Pharmacology* 43(3): 330-335.
- Stanton, R. C. (2012). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival." *IUBMB Life* 64(5): 362-369.
- Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto (2014). "IL-6 in inflammation, immunity, and disease." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(10): a016295.
- Tangvarasittichai, S. (2015). "Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus." *World Journal of Diabetes* 6(3): 456-480.
- Tilg, H. and A. M. Diehl (2000). "Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis." *N Engl J Med* 343(20): 1467-1476.
- Tracey, K. J. (2002). "The inflammatory reflex." *Nature* 420(6917): 853-859.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.
- Vallabhapurapu, S. and M. Karin (2009). "Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system." *Annu Rev Immunol* 27: 693-733.
- Wang, Y. P., L. S. Zhou, Y. Z. Zhao, S. W. Wang, L. L. Chen, L. X. Liu, Z. Q. Ling, F. J. Hu, Y. P. Sun, J. Y. Zhang, C. Yang, Y. Yang, Y. Xiong, K. L. Guan and D. Ye (2014). "Regulation of G6PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress." *Embo j* 33(12): 1304-1320.
- Xu, J., D. Maki and S. R. Stapleton (2003). "Mediation of cadmium-induced oxidative damage and glucose-6-phosphate dehydrogenase expression through glutathione depletion." *J Biochem Mol Toxicol* 17(2): 67-75.

- Yang, S. R., J. Wright, M. Bauter, K. Seweryniak, A. Kode and I. Rahman (2007). "Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF-kappaB in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292(2): L567-576.
- Yang, W., B. Burkhardt, L. Fischer, M. Beirow, N. Bork, E. C. Wönne, C. Wagner, B. Husen, K. Zeilinger, L. Liu and A. K. Nussler (2015). "Age-dependent changes of the antioxidant system in rat livers are accompanied by altered MAPK activation and a decline in motor signaling." *EXCLI Journal* 14: 1273-1290.
- Yoo, B. K., L. Emdad, Z. Z. Su, A. Villanueva, D. Y. Chiang, N. D. Mukhopadhyay, A. S. Mills, S. Waxman, R. A. Fisher, J. M. Llovet, P. B. Fisher and D. Sarkar (2009). "Astrocyte elevated gene-1 regulates hepatocellular carcinoma development and progression." *J Clin Invest* 119(3): 465-477.

ÖZGEÇMİŞ

Erzurum, Horasan ilçesi'nde 10.11.1992 yılında doğdu. İlk ve orta öğrenimini Başöğretmen İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Erzurum Mecidiye Anadolu Lisesi'nde 2006-2007 yılları arasında ve Erzurum Merkez Anadolu Lisesi'nde 2007-2010 yılları arasında lise öğrenimini tamamladı. Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü 2011-2015 tarihleri arasında bitirirerek aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Genetik Bilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Eylül 2015'de başlayıp Ağustos 2017'de bitirdiği yüksek lisans programındaki tüm laboratuvar çalışmalarını Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Genetik Araştırma Laboratuvarı, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji ABD Laboratuvarı, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'da yapmıştır.