

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**TAURİN'İN ENDOTOKSİN ARACILIKLI eNOS, iNOS,
MPO ve KSANTİN OKSİDAZ EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

YASEMİN AKTAŞ ÖZTÜRK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nurten Türközkan

ANKARA
Ocak 2011

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**TAURİN'İN ENDOTOKSİN ARACILIKLI eNOS, iNOS,
MPO ve KSANTİN OKSİDAZ EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

YASEMİN AKTAŞ ÖZTÜRK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nurten Türközkan

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2004-15 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA
Ocak 2011

KABUL VE ONAY



TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü BİYOKİMYA Anabilim Dalı'nda PROF.DR. NURTEN TÜRKÖZKAN danışmanlığında YASEMİN AKTAŞ ÖZTÜRK tarafından hazırlanan "TAURIN IN ENDOTOKSİN ARACILIKLI eNOS, İNOS MPO VE KSANTİN OKSİDAZ EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ" konulu tez savunmasını yapmak üzere 24.01/2011 tarihinde saat 12.30'da Anabilim Dalı Başkanlığında toplanan jüri yapılan tez savunma sınavı sonucunda Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinin 33(1) maddesi gereğince, tezin,

☒ Oybirliği

☐ Oyçokluğu ile,

☒ Başarılı olduğuna,

☐ Düzeltilmesine,

☐ Reddine, karar vermiştir.

Gereğini Saygılarımızla arz ederiz.

Tez hakkında Düzeltme veya Red kararının gerekçeleri

Başkan

PROF.DR. HATİCE PAŞAOĞLU

Asıl

PROF.DR. NURTEN TÜRKÖZKAN

Asıl

PROF.DR. AYŞE BİLGİHAN

Asıl

PROF.DR. FERDA PERÇİN

Asıl

DOÇ.DR. HALİL YAMAN(GATA)

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller	IV
Tablolar	VI
Semboller ve Kısaltmalar	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnflamasyon	4
2.1.1 Akut İnflamasyon	4
2.1.2 Kronik İnflamasyon	5
2.1.3 Lökositlerin İnflamasyondaki Rolü	6
2.1.4 İnflamasyonun Kimyasal Aracıları	6
2.2. Endotoksemi	7
2.2.1 Endotoksin	7
2.2.2 Endotokseminin Oluşumu	8
2.3 Serbest Radikaller	9
2.3.1 Serbest Oksijen Radikalleri	10
2.3.2 Serbest Nitrojen Radikalleri (Reaktif Nitrojen Türleri)	16
2.4. Taurin	20
2.4.1 Taurinin de-novo sentezi	21
2.4.2 Taurin transportu	23
2.4.3 Taurinin Antioksidan Etkisi	23
2.4.4 Taurinin Kalp ve Beyin Üzerine Etkileri	25
2.5 PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	26
2.5.1 PZR Tekniğinin Gelişimi	26
2.5.2 PZR Tekniğinin Temelleri	27
2.5.3 RT-PZR (Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	29
2.6 RNA (Ribonükleik asit)	31
2.6.1 RNA Konsantrasyonunun ve Kalitesinin Değerlendirilmesi	31

2.6.2 RNA Molekülünün İntaklığının Belirlenmesi	31
3. GEREÇLER ve YÖNTEM	33
3.1 GEREÇLER	33
3.1.1 Kullanılan Deney Hayvanları	33
3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.1. 3 Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	34
3.2 YÖNTEMLER	34
3.2.1 Deney Hayvanlarının Hazırlanması	35
3.2.2 RNA İzolasyonu	36
3.2.3 RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi	41
3.2.4 RNA Molekülünün Elektroforezi	42
3.2.5 cDNA Sentezi Öncesi RNA Örneklerinin DNase ile Muamelesi	44
3.2.6 cDNA Sentezi	44
3.2.7 Primer Dizaynı	46
3.2.8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	60
4. BULGULAR	68
4.1 RNA örneklerinin formaldehit agaroz jelde görüntülenmesi	68
4.2 RT-PZR Sonuçları	70
4.2.1 GAPDH enziminin karaciğer, kalp, beyin ve böbrek doku örneklerinde kontrol, endotoksin, taurin ve endotoksin+taurin gruplarına ait RT-PZR sonuçları	70
4.2.2 eNOS enziminin karaciğer, kalp, beyin ve böbrek doku örneklerinde kontrol, endotoksin, taurin ve endotoksin+ taurin gruplarına ait RT-PZR sonuçları	75
4.2.3 iNOS enziminin karaciğer, kalp, beyin ve böbrek doku örneklerinde kontrol, endotoksin, taurin ve endotoksin+ taurin gruplarına ait RT-PZR sonuçları	79
4.2.4 XO enziminin karaciğer, kalp, beyin ve böbrek doku örneklerinde kontrol, endotoksin, taurin ve endotoksin+ taurin gruplarına ait RT-PZR sonuçları	83

4.2.5 MPO enziminin karaciğer, kalp, beyin ve böbrek doku örneklerinde kontrol, endotoksin, taurin ve endotoksin+ taurin gruplarına ait RT-PZR sonuçları	87
5. TARTIŞMA	92
6. SONUÇ	105
7. ÖZET	106
8. SUMMARY	107
9. KAYNAKLAR	108
10. ÖZGEÇMİŞ	127
11. TEŞEKKÜR	128

ŞEKİLLER

Şekil 1: Lipopolisakkaritin Yapısı	8
Şekil 2: Serbest oksijen radikallerinin oluşum mekanizmaları	11
Şekil 3: Nitrik Oksit Sentezi	18
Şekil 4: Taurinin molekül yapısı	20
Şekil 5: Taurinin biyosentez yolları	22
Şekil 6: RNA izolasyon işleminin aşamaları	39
Şekil 7: eNOS geni için primer 3 sonucu	49
Şekil 8: iNOS geni için primer 3 sonucu	52
Şekil 9: GAPDH geni için primer 3 sonucu	54
Şekil 10: MPO geni için primer 3 sonucu	56
Şekil 11: XO geni için primer 3 sonucu	59
Şekil 12: eNOS PZR koşulları	60
Şekil 13: iNOS PZR koşulları	62
Şekil 14: GAPDH PZR koşulları	63
Şekil 15: MPO PZR koşulları	65
Şekil 16: XO PZR koşulları	66
Şekil 17: Karaciğer RNA örneklerinin formaldehit-agaroz jel görüntüsü	68
Şekil 18: Kalp RNA örneklerinin formaldehit-agaroz jel görüntüsü	69
Şekil 19: Beyin RNA örneklerinin formaldehit-agaroz jel görüntüsü	69
Şekil 20: Böbrek RNA örneklerinin formaldehit-agaroz jel görüntüsü	70
Şekil 21: Karaciğer GAPDH geni PZR ürünlerinin jel görüntüsü	71
Şekil 22: Kalp GAPDH geni PZR ürünlerinin jel görüntüsü	72
Şekil 23: Beyin GAPDH geni PZR ürünlerinin jel görüntüsü	73
Şekil 24: Böbrek GAPDH geni PZR ürünlerinin jel görüntüsü	74
Şekil 25: Karaciğer eNOS genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	75
Şekil 26: Kalp eNOS genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	76
Şekil 27: Beyin eNOS genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	77

Şekil 28: Böbrek eNOS genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	78
Şekil 29: Karaciğer iNOS genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	79
Şekil 30: Kalp iNOS genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	80
Şekil 31: Beyin iNOS genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	81
Şekil 32: Böbrek iNOS genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	82
Şekil 33: Karaciğer XO genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	83
Şekil 34: Kalp XO genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	84
Şekil 35: Beyin XO genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	85
Şekil 36: Böbrek XO genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	86
Şekil 37: Karaciğer MPO genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	87
Şekil 38: Kalp MPO genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	88
Şekil 39: Beyin MPO genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	89
Şekil 40: Böbrek MPO genine ait RT- PZR ürünlerinin jel görüntüsü	90

TABLÖLAR

Tablo 1: İnflamasyonda rol alan kimyasal araçılar	7
Tablo 2: Örnek Listesi	40
Tablo 3: RNA örneklerinin spektrofotometrik analiz sonuçları	41
Tablo 4: RNA örneklerinin dilüsyon hesaplamaları	45
Tablo 5: eNOS primer sekansları	49
Tablo 6: iNOS primer sekansları	52
Tablo 7: GAPDH primer sekansları	54
Tablo 8: MPO primer sekansları	56
Tablo 9: XO primer sekansları	59
Tablo 10: eNOS PZR reaksiyon bileşenleri	61
Tablo 11: iNOS PZR reaksiyon bileşenleri	62
Tablo 12: GAPDH PZR reaksiyon bileşenleri	64
Tablo 13: MPO PZR reaksiyon bileşenleri	65
Tablo 14: XO PZR reaksiyon bileşenleri	67
Tablo 15: RT-PZR sonuçlarının karşılaştırmalı olarak özeti	91

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

cDNA	:	Komplementer DNA
CDO	:	Sistein Dioksijenaz
CSAD	:	Sistein Sülfirik Asit Dekarboksilaz
COX2	:	Siklooksijenaz-2
E. coli	:	Escherichia coli
FA	:	Formaldehit Agaroz
GAPDH	:	Gliseraldehit 6 fosfat Dehidrojenaz
GMP	:	Guanozin monofosfat
H ₂ O ₂	:	Hidrojen peroksit
HOCl	:	Hipokloröz asit
İp	:	İntraperitoneal
IL-1	:	İnterlökin-1
LPB	:	Lipid Bağlayıcı Protein
LOS	:	Lipooligosakkarit
LPS	:	Lipopolisakkarit
MPO	:	Myeloperoksidaz
mRNA	:	Messenger RNA
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO	:	Nitrik oksit
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz
eNOS	:	Endotelyal NOS, NOS-III
nNOS	:	Nöronal NOS, NOS-I
iNOS	:	İndüklenebilir NOS, NOS-II
PAF	:	Plaketalet aktive edici faktör
PGE ₂	:	Prostaglandin E ₂
PLA ₂	:	Fosfolipaz A ₂
PMNL	:	Polimorfonükleer Lökositler
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-PZR	:	Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA	:	Ribon�kleikasit
rRNA	:	Ribozomal RNA
RNS	:	Reaktif nitrojen türleri
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
TauCl	:	Taurin kloramin
TLR4	:	Toll-benzeri resept�r 4
TNF	:	T�m�r Nekroz Faktör
XDH	:	Ksantin Dehidrojenaz
XO	:	Ksantin Oksidaz
XOR	:	Ksantin Oksidoredüktaz
μL	:	Mikrolitre
$\text{O}_2^{\cdot-}$	:	Süperoksit anyonu
ONOO^-	:	Peroksinitrit anyonu
$\text{OH}^{\cdot}$	:	Hidroksil radikali
3-NT	:	3-Nitrotirozin
mmol	:	Milimol
mM	:	Milimolar
nm	:	Nanometre
nM	:	Nanomolar
μg	:	Mikrogram
μl	:	Mikrolitre
pmol	:	Pikomol
kDa	:	Kilodalton

1. GİRİŞ

Endotoksemi genel olarak organizmanın verdiği sistemik inflamatuvar bir cevaptır ve multiple organ fonksiyon bozukluğuna neden olur. Endotoksin (LPS: lipopolisakkarit) uygulanmasından sonra görülen doku harabiyeti LPS'nin direkt etkisi sonucu veya hücrelerin cevap olarak salgıladıkları inflamatuvar araçlar ve nötrofil infiltrasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır.^{1,2}

Nitrik oksit (NO) ve süperoksit (O_2^-) gibi reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin sistemik inflamasyonda ortaya çıkan hücresel harabiyette merkezi bir rol oynadıkları bildirilmektedir.^{3,4} NO, Nitrik oksit sentazlar (NOS) aracılığı ile oluşmaktadır. Üç tip NOS tanımlanmıştır. Endotelial NOS (eNOS veya NOS-III) ve nöronal NOS (nNOS veya NOS-I) katalizi ile fizyolojik şartlarda az miktarda NO oluşurken, indüklenbilir NOS (iNOS veya NOS-II) aracılığıyla inflamasyonda çok miktarda NO meydana gelmektedir.^{5,6,7} Deneysel endotoksemide iNOS aktivitesi artarken eNOS aktivitesinin azaldığı ve bunun sonucunda glomerular filtrasyonun azaldığı ve böbrek fonksiyonlarının bozulduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar iNOS'un endotoksemi patolojisinde önemli rol oynadığını önermişlerdir.^{8,9}

Araştırmacılar enfekte edilen hayvanlarda ksantin oksidaz (XO) ekspresyonunu araştırmışlardır. LPS uygulanan deney hayvanlarında uygulama sonrası oluşan O_2^- radikalinin kaynağı vasküler XO enzimidir ve bu enzimin ekspresyonu endotoksemide hızla artmaktadır.^{10,11,12} İnflamasyona cevap olarak dokularda biriken nötrofiller myeloperoksidaz (MPO) enzimi salınımı ile doku harabiyeti patojenitesine katkıda bulunmakta ve MPO ölçümü nötrofil infiltrasyonu için önemli bir marker olarak kullanılmaktadır. Ayrıca nötrofiller ve endotel hücreleri NO oluşturan 2 büyük kaynak olarak kabul edilmektedir.^{13,14} LPS verilmesinden sonra nötrofiller ve sitokinlerin aktivasyonu sonucu serbest oksijen ve nitrojen

türleri olduğu ve bunların endotoksin fizyopatolojisinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. iNOS ve MPO'nun inflamasyon bölgesinde reaktif nötrofiller tarafından eksprese edilen oksidan enzimler olduğu rapor edilmiştir. Araştırmalar, enfeksiyona sitokin ve diğer proinflamatuvar ajanlara cevap olarak ksantin dehidrojenaz - ksantin oksidaz (XDH-XO) dönüşümünün hızlandığını ve yine reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu ve nötrofil infiltrasyonunun arttığını ortaya koymuşlardır.^{14,15}

Diğer taraftan taurin memeli dokularında en çok bulunan ve başta inflamasyon olmak üzere bir dizi hücresel fonksiyonları düzenleyen bir amino asittir. Karaciğerde taurin konsantrasyonunun travma ve endotoksemi gibi patolojik şartlarda azaldığı gösterilmiştir.^{16,17} İn vivo çalışmalarda NO miktarının hücrelerde taurin taşıyıcılarının aktivitesini arttırdığı ve hücre içine taurin girişinin hızlandığı bildirilmiştir.¹⁸ Yine, taurinin güçlü bir antibakteriyel özelliğe sahip olduğu ve polimorfonükleer lökositlerde (PMNL) fagositik ve respiratuvar burst aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir.^{19,20}

Araştırmacılar kalp kası harabiyetine neden olan ve iskemi reperfüzyon gibi patolojilerde oluşan serbest oksijen radikalleri için taurinin güçlü ve nonspesifik scavenger (süpürücü) olduğunu deneysel olarak ratlarda göstermişlerdir. Diğer taraftan gerek in vivo gerekse invitro yapılan çalışmalarda endotoksinlerin endotel harabiyetine neden olduğu ve taurinin doğal olarak bulunan bir antioksidan kabul edildiği ve endotoksin aracılıklı bu endotel harabiyetine karşı koruyucu rol oynadığı bulunmuştur.¹⁹

Bu konuda daha önce yapılan in vivo araştırmalarda endotoksin uygulanan koblarda taurinin karaciğer, PMNL, böbrek, dalak ve beyin dokularında farklı etkileri gözlenmiştir. Ancak taurinin bu dokulardaki ilgili enzim ekspresyonları üzerine etkisi incelenmemiştir.

Bu çalışmada, endotoksin aracılıklı karaciğer, böbrek, kalp ve beyin doku harabiyetinde rol oynayan iNOS, eNOS, MPO ve XO enzim ekspresyonları üzerine taurinin etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 01/2004-15 proje numarası ile desteklemiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnflamasyon

İnflamasyon; çeşitli endojen ve ekzojen uyaranlar sonucu oluşturulan lokal zedelenmeye karşı canlı dokunun geliştirdiği kompleks bir reaksiyondur. İlk defa M.S. I. yüzyılda Celsus tarafından tanımlanmıştır.²¹ İnflamasyon hem hücre zedelenmesini ortadan kaldıran hem de hasar sonucu oluşan nekrotik hücre ve dokuları ortamdaki uzaklaştırarak dokunun yeniden yapılanmasını sağlayan fizyopatolojik bir süreçtir. Bu lokal zedelenme, vasküler ve hücrel yanıtla neden olarak plazmadan ve lokal hücrelerden çok sayıda değişik inflamatuvar mediatörlerin salgılanmasına yol açar. İnflamasyona neden olan uyaranlar arasında travma, cerrahi girişimler, infeksiyöz ajanlar ve toksik ürünleri, aşırı soğuk ve sıcak, toksik kimyasal maddeler, immün cevap ve doku iskemisi sayılabilir.^{21,22,23} Yine *Escherichia coli* (*E. coli*) gibi gram-negatif bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan ve "endotoksin" olarak da adlandırılan LPS, sıçan ve farelere uygulandığında inflamasyona neden olmaktadır.²⁴

İnflamasyon akut ve kronik olmak üzere 2 başlık altında incelenebilir:

2.1.1 Akut İnflamasyon

Akut inflamasyon kısa sürede gelişir ve birkaç dakika ile birkaç gün sürebilir. Kızarıklık, ısı artışı, şişme ve fonksiyon kaybı ile ortaya çıkarak çeşitli vasküler ve hücrel değişikliklere neden olur.^{21,22,25}

Vasküler değişiklikler; kısa süreli vazokonstriksiyon ve kan akımı azalması ile başlar ve bunu arteriol ve venüllerdeki dilatasyon ve

kan akımındaki artış takip eder. Lokal kan akımı artışı kızarıklık ve ısı artışına neden olur. Kan akımı artışı damar içi hidrostatik basıncı artırır. Küçük damarlarda görülen permeabilite artışına bağlı olarak damar dışı dokulara proteinden zengin sıvı çıkışı olur ve bu da zedelenme bölgesinde ödeme neden olur.⁶ Doku aralığındaki bu sıvı birikimi, toksik bileşiklerin dilue edilmesine, zedeleyici ajanın izolasyonu ve nötralizasyonu için lökositlerin, antikorların ve kompleman faktörlerinin inflamasyon bölgesine taşınmasına neden olur.^{21,22}

2.1.2 Kronik İnflamasyon

Haftalar, aylar hatta yıllar süren aktif inflamasyon ve iyileşme sürecini içeren inflamasyon tipidir. Vasküler değişiklikler, ödem ve önemli miktarda nötrofil infiltrasyonu ile karakterizedir.^{21,26} Kronik inflamasyonda makrofajlar, lenfositler ve plazma hücreleri ana rol oynarlar. Sitokinler, bakteriyel endotoksinler ve akut inflamasyon sırasında oluşan mediatörler tarafından makrofajlar aktive edilirler. Aktive makrofajlar tarafından salınan çeşitli mediatörler doku hasarı, angiogenez ve fibrozis oluştururlar. ROS ve NO bu mediatörlerin en önemlilerindendir.

Kronik inflamasyonda rol alan lenfositler, adezyon molekülleri ve kemokinler aracılığıyla inflamasyon bölgesine göç ederler. Burada makrofajlar ile birbirlerini devamlı suretle aktive ederek bir inflamasyon odağı oluştururlar. B lenfositlerin aktivasyonu sonucu oluşan plazma hücreleri ise antijenlere ve değişen doku bileşenlerine karşı antikor oluştururlar.^{27,28,29}

2.1.3 Lökositlerin İnflamasyondaki Rolü

Başta nötrofil ve monositler olmak üzere lökositlerin birikimi inflamatuvar reaksiyonun en önemli özelliğidir. Akut inflamasyonun hemen başında inflamasyon bölgesinde yoğun bir lökosit birikimi olur. İlk 6–24 saatte nötrofiller daha baskın olarak bulunurken, 24–48 saat içinde monositler baskın hale gelir.^{26,30} Kandaki nötrofil miktarı normalde $\mu\text{l}'$ de 4000–5000 iken inflamasyonda 15000-25000'e çıkar. Buna “nötrofili” denir.^{31,32} Lökositler inflamasyon bölgesinde bulunan mikroorganizmaları öldürüp, nekrotik dokuyu ve yabancı antijenleri parçalayıp kimyasal mediyatörleri serbestleştirirler. Bu savunma yanıtının amacı inflamasyonu tetikleyen nedeni ortadan kaldırmak veya etkisizleştirmek veya doku onarımına yardımcı olmak olsa da doku hasarına da yol açar.³⁰

İnflamasyona bağlı olarak lökositlerdeki değişiklikler;

- 1) Marjinasyon,
- 2) Adhezyon,
- 3) Kemotaktik uyarıya doğru migrasyon,
- 4) Fagositoz ve intrasellüler degradasyon
- 5) Lökosit ürünlerinin ekstrasellüler salınımı olarak sıralanabilir.³²

Fagositoz; serbest radikal oluşumunun sorumlu olduğu oksidatif mekanizmalar ve çoğu lökosit granüllerinden salınan bakterisid etkili sitokinlerin rol aldığı oksidatif olmayan mekanizmaların birlikte çalıştığı bir biyokimyasal süreçtir.

2.1.4 İnflamasyonun Kimyasal Aracıları

İnflamasyon semptomlarından ve doku hasarından, plazma ve hücrel kaynaklı araçlar sorumludur. Plazma kökenli araçların (kininler, kompleman ve pıhtılaşma faktörleri) öncüleri proteolitik bir

yıkılma sonucu aktifleşirler. Hücresel araçlar ise genellikle hücre içindeki granüllerde gerektiğinde salınmak üzere hazır bulunurlar veya uyarıya yanıt olarak sentezlenirler.

Bu kimyasal araçlar şu şekilde listelenebilir:

Tablo 1: İnflamasyonda rol alan kimyasal araçlar

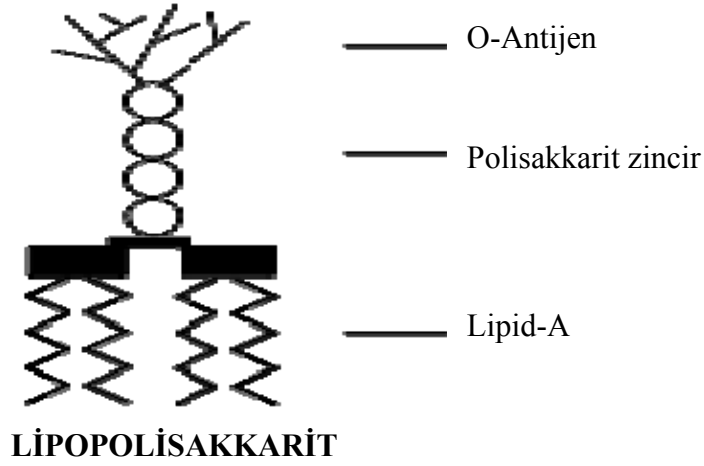
Vazoaktif Aminler	Plazma Proteazları	Eikazanoitler	Sitokinler	NO ve ROS
Histamin Serotonin	Pıhtılaşma sistemi Kinin sistemi P maddesi Kompleman sistemi	Prostaglandinler Prostasiklinler Tromboksanlar	İnterlokın-1 (IL-1) TNF- α TNF- β İnterferon- γ (IFN- γ) Kemokinler (özellikle IL-8)	

Bu araçlar fosfolipaz A₂ (PLA₂), COX2 ve iNOS enzimlerinin transkripsiyonunu artırarak PAF, PGE₂, LT'ler ve NO'nun sentezini uyarırlar. Nötrofil birikimi ve aktivasyonunu stimule ederler. IL-1 ve TNF hipotalamusdaki damar endotel hücrelerinde PGE₂ sentezini artırarak inflamasyonda görülen ateşe neden olurlar. İnterferon ise antiviral aktiviteye sahiptir. Antiinflamatuvar sitokinler (IL-4, IL-10 ve IL-13) ise B lenfositleri aktive ederler ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskırlar. Sağlıklı kişilerde proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler arasında bir denge vardır.^{33,34,35}

2.2. Endotoksemi

2.2.1 Endotoksin

Endotoksin; bakterial lizis sırasında açığa çıkan yapısal bakteri komponentleridir. Endotoksinlere örnek çeşitli gram (-) bakterilerin hücre duvarında bulunan LPS veya lipo-oligo-sakkarit (LOS) gösterilebilir.



Şekil 1: Lipopolisakkaritin Yapısı

LPS; bir polisakkarit zincirinden ve toksik etkiden sorumlu olan Lipid A olarak bilinen bir lipid biriminden oluşur. Endotoksinler yaklaşık 10 kDa büyüklüğündedir ve yapısındaki polisakkarit zincir bakteriler arasında değişkenlik gösterir.³⁶

2.2.2 Endotokseminin Oluşumu

Organizma endotoksinlerle karşılaştığında endotoksemi gelişir. Organizma endotoksinlere karşı antikor üretir fakat bu antikorlar değişken olan polisakkarit zincirine karşı oluşturulduğu için geniş endotoksin grupları için koruyucu olamazlar. Ateş, düşük kan basıncı, inflamasyon ve koagülasyonun aktive olması endotokseminin belirtileri arasında sayılabilir.

İnsanlarda endotoksemi mekanizması şöyledir: LPS serumda lipid bağlayıcı proteine (LPB) bağlanarak hücre membranında yer alan CD14'e transfer edilir. CD14 ise LPS'yi Toll-benzeri reseptör (TLR4) ile ilişkili olan MD2'ye aktarır. CD14 ve TLR4 ise makrofajlar gibi çeşitli bağışıklık sistemi hücrelerinde bulunur ve endotoksik şoka neden

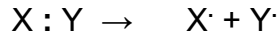
olan proinflatuvar sitokinlerin ve NO'nun salınımını uyaran sinyalleri başlatır.³⁷

2.3 Serbest Radikaller

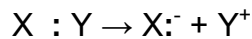
Atomlar; proton ve nötronlardan oluşan pozitif yüklü bir çekirdek ve çekirdeğin etrafında bulunan negatif yüklü elektronlardan oluşur. Elektronlar hem partikül, hem de dalga özelliğine sahip olup, çekirdek etrafında ışık hızı ile hareket ederler. Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunan atom, molekül veya iyonlardır. Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, serbest radikaller taşıdıkları eşleşmemiş elektron nedeniyle yüksek kimyasal reaktiviteye sahiptirler.^{38,39}

Serbest radikal oluşturan 3 mekanizma tanımlanmıştır^{39,40}

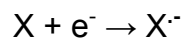
1) Kovalent bağlı bir molekülün homolitik bölünmesi sonucu oluşan 2 parçada ortak elektronlardan birer tanesinin kalması sonucu oluşur. Enerji gerektirir.



2)Kovalent bağlı bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi sonucu oluşur.



3) Bir moleküle tek bir elektron eklenmesi ile oluşur.



Serbest radikaller elektriksel olarak + yüklü, - yüklü veya nötral olabilirler ve oksidan veya redüktan olarak rol oynayabilirler.⁴⁰ İki serbest radikalin birbiri ile reaksiyona girmesi sonucu radikal olmayan bir bileşik ortaya çıkar. Fakat bir serbest radikal, radikal olmayan bir yapıyla reaksiyona girerse başka bir serbest radikal oluşur ve buna radikallerin zincir reaksiyonu denir.⁴¹

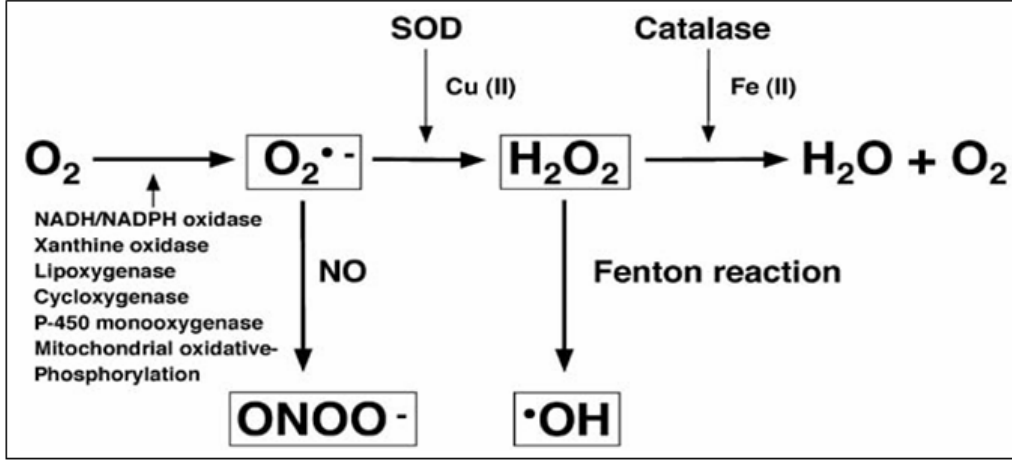
2.3.1 Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri oksijen atomu içeren serbest radikallerdir. Normal şartlarda biyolojik sistemlerde oksijenin %98'i mitokondriyal sitokrom oksidaz varlığında 4 elektron alarak suya indirgenir.



Bu indirgenme sırasında kısmi redüksiyon ile süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$) ve peroksinitrit (ONOO^-) gibi ROS'lar da oluşur.⁴²

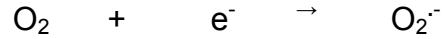
ROS'lar; aerobik hücrelerde normal metabolizma sırasında moleküler oksijenden üretilirler ve hücre sinyal iletiminde önemli rolleri vardır. Fakat radikal miktarı normal düzeylerin üzerine çıktığında hücre yapısına zarar vermeye başlar, hatta hücre ölümüne neden olabilir ve oksidatif stres olarak adlandırılan tablo ortaya çıkar. Oksijen atomu 8 elektron içerir ve dış yörüngesinde bulunan 2 elektron eşleşmemiştir. Oksijenin bu özelliği diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlar. ROS'lar şok ve iskemi-reperfüzyon hasarında inflamasyon aracılığıyla görev yaparlar.^{42,43}



Şekil 2: Serbest oksijen radikallerinin oluşum mekanizmaları

Serbest oksijen radikallerinin başlıcaları şunlardır;

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) : Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan $O_2^{\bullet-}$ radikal anyonu meydana gelir.

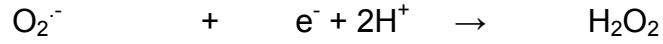
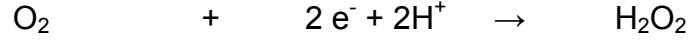


Oksijenin yüksek miktarlarının hasar yapıcı etkisine, bu radikalın oluşumunun artması aracılık eder ve bu mekanizma oksijen toksisitesinin süperoksit teorisi olarak adlandırılır.³⁸ $O_2^{\bullet-}$, yarı ömrü oldukça uzun bir serbest radikal olmakla birlikte, oluşuktan sonra bulunduğu yerden çevreye dağılma yeteneğinin düşük olması nedeniyle tek başına direkt etkisi fazla değildir.

Asıl önemi H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. $O_2^{\bullet-}$ anyonu hem orta derecede oksitleyici hem de iyi derecede redükleyici özelliğe sahiptir.⁴³

Hidrojen peroksit (H_2O_2) : Oksijen molekülünün ortamda bulunan diğer moleküllerden iki elektron alarak indirgenmesi veya $O_2^{\bullet-}$ radikalinin bir

elektron alması sonucu peroksit oluşur. Bu moleküle iki hidrojen atomunun katılmasıyla H₂O₂ meydana gelir.



Serbest Oksijen Radikali Oluşumunda Enzimlerin Rolü

Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden birisi ksantin oksidazdır.

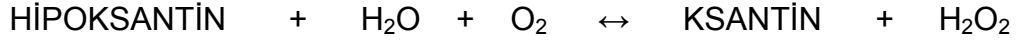
Ksantin Oksidaz (XO)

Ksantin oksidoredüktaz (XOR) enzimi; molibden hidroksilaz flavoprotein ailesinin üyesidir. Aynı gen tarafından kodlanan ksantin oksidaz (XO, EC 1.2.3.2) ve ksantin dehidrojenaz (XDH, EC1.1.1.204) olarak 2 formu bulunur. Bu 2 form birbirine dönüşebilir. Bu dönüşüm 2 şekilde olabilir.^{44,45,46,47}

1) Reversible dönüşüm: ısıtma ile veya subüniteler arasında sülfidril (SH-) gruplarının oksidasyonu ilerleyip disülfid bağları oluşunca dehidrojenaz aktivitesi ortadan kalkar ve XO formu oluşur.

2) Irreversible dönüşüm: XDH'den 20kDa büyüklüğünde bir polipeptidin uzaklaştırılması ile irreversible XO oluşur. Mitokondriyal intermembran alandaki bir proteazın bu dönüşüme neden olduğu düşünülmektedir.

XO, pürin metabolizmasının son 2 basamağını katalizlerken serbest radikal oluşumuna da aracılık ederler.⁴⁸



Bu reaksiyonlar sonucunda ROS oluşturmaları (Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit) nedeniyle klinik olarak önemlidir.

Biyolojik Önemi

Enzimin temel fonksiyonu pürin yıkımının son 2 basamağını katalizlemektir. Pürin katabolizmasının hız kısıtlayıcı enzimidir. Ayrıca, ince barsakta demir absorpsiyonu ve karaciğerde demir mobilizasyonu üzerinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Sülfidril gruplarının oksidasyonunda görev alan enzim yine nitratların nitritlere ve NO'ya indirgenmesini katalizler.^{46,49,50,51}

XO'nun en önemli fonksiyonlarından birisi de mikrobisidal etkisidir. XOR'lerin invivo olarak bakteriyel enfeksiyonlara cevapta aktive olduğu biliniyor. Bu işleve enzimin serbest radikal oluşturabilme kapasitesi aracılık etmektedir. Süperoksit ve XO'nun nitrit varlığında oluşturduğu peroksinitrit güçlü bir bakterisidal ajandır. Enzimin bakterisidal etkisi anne sütünde bulunmasını da açıklamaktadır. Akut faz cevabında salınan sitokinlerin XOR aktivitesini uyardığı tespit edilmiştir. Bu uyarım transkripsiyon düzeyinde olur. İnsan XOR geninin 5' bölgesinde IL-6, TNF- α , IF- γ ve IL-1 için uyarım bölgelerinin bulunması bu görüşü desteklemektedir.⁵² XOR enzimi kendi ürünleri, ürik asit, süperoksit, hidrojen peroksit, tarafından inhibe edilir. Yine iskemi reperfüzyon hasarının erken evresinde NO ve süperoksitten oluşan peroksinitrit de XOR aktivitesini inhibe eder.⁵³

İskemi-reperfüzyon hasarında, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar, hipertansiyon, ateroskleroz, akciğer kanseri, tip II diyabet gibi klinik tablolarda da plazma XO düzeylerinin arttığı görülmüş.^{54,55,56,57}

Serbest Oksijen Radikali Oluşumunda Lökositlerin Rolü

Lökositlerin en önemli özelliği inflamasyon bölgesine taşınarak orada enfeksiyona karşı hızlı ve etkin bir yanıt oluşturmalarıdır.⁵⁸ Fagositoz ve degranülasyon ile birlikte lökositin metabolik aktivitesi birdenbire artar. Glukoz kullanımı, laktik asit yapımı, fosfolipid yıkımı ve yapımı artmıştır. O₂ kullanımı büyük ölçüde artar. Fagositler sindirim enzimlerinden başka bakterisid maddelerde taşırlar ve bakterilerin çoğalıp fagositlere zarar vermesine meydan vermeden yok edilmesini sağlarlar. Nötrofil granülleri *myeloperoksidaz* (MPO) adı verilen bir enzim taşırlar. Bu enzim lökositlerden başka vücudun hiçbir hücresinde yoktur.⁵⁹ Bu savunma sisteminin güçlü bir şekli MPO- H₂O₂ ve halojen kofaktörleri içeren mekanizmadır.

Myeloperoksidaz (MPO)

Myeloperoksidaz ([EC 1.11.1.7](#)); nötrofil ve monositlerde lokalize olmuş nötrofillerdeki proteinlerin büyük bir kısmını oluşturan 144 kD ağırlığında, glikozile proteinden oluşmuş bir peroksidaz enzimidir. Nötrofillerin azurofilik granüllerinde depolanır. MPO'nun yapısında bulunan hem grubu, mukus gibi nötrofillerden zengin salgılara yeşil rengini verir. 2 hafif zincir ve prostetik hem grubuna bağlı 2 ağır zincirden oluşur.⁶⁰ MPO proteinini kodlayan gen 17. kromozomda yerleşmiştir. (17q23.1).

Özellikle nötrofiller ve monositler, respiratuar burst sırasında içerdikleri MPO enzimi aracılığıyla O₂⁻'in dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksiti (H₂O₂), Cl⁻ (klorid) iyonu ile birleştirilerek güçlü bir anti bakteriyel

ajan olan HOCl'e dönüştürür. HOCl lökositlerde üretilen ve mikrobisid etkiye sahip en önemli oksidandır. Bu mekanizma doku harabiyeti, inflamasyon ve kanser, ateroskleroz, Alzheimer gibi ciddi hastalıklarda oldukça önemlidir. Ayrıca, H₂O₂ kullanarak tirozini tirozil radikaline oksitler. HOCl ve tirozil radikalleri nötrofiller tarafından bakteri ve diğer patojenleri öldürmek için kullanılan sitotoksinlerdir.^{61,62}

Respiratuar Burst (Solunumsal Patlama)

Fagositik hücrelerin bir situmulusla karşılaştıklarında, gösterdikleri bir dizi koordine metabolik olay "respiratuar burst" olarak adlandırılmaktadır. Bu olaylar fagositik hücrelerin oksijene bağımlı öldürücü fonksiyonlarını içermektedir.^{63,64,65}

Respiratuar burstte artmış dört aktivite bulunmaktadır. Bunlar:

1. O₂ alımı
2. H₂O₂ oluşumu
3. Heksozmonofosfat yolunun aktivitesi
4. O₂⁻ üretimi

Bakterisidal uyaranlara maruz kalındığında fagositlerin stimülasyonu sonucu hücrenin O₂ tüketiminde belirgin bir artış görülür. Respiratuar burstteki en önemli olay ise süperoksit üretimidir. Fagositoz için kullanılan oksidasyon ajanları MPO, O₂⁻ ve H₂O₂' den oluşur. Oluşan O₂⁻, süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle katalize olur. Bu sistem yolu ile bakterilerin yok edilmesi için çeşitli mekanizmalar kullanılır. Bakteri hücre duvarının halojenizasyonu sonucu bütünlüğünü kaybetmesi bunlardan birisidir. Yine buna yardımcı diğer bir mekanizma ise MPO sisteminin aminoasitleri dekarboksile ederek onları aldehit, CO₂ ve NH₃'a çevirmesidir.^{66,67} Bu mekanizmada bakteri hücre duvarının aminoasit bileşenleri yıkılır ve hücre ölür ya da serbest aminoasitler dekarboksile

olarak organizma bu reaksiyonda oluşan toksik aldehitler tarafından öldürülür. Yine de ilk mekanizmanın daha geçerli olduğu bilinmektedir.⁶³

MPO sisteminin bakterisidal etkisi konusunda en son hipotez singlet oksijen (1O_2) mekanizmasıdır. Singlet oksijen teorisinde ise normal atmosferik oksijenden farklı olarak iki oksijen çekirdeği etrafındaki elektron dağılımı farklı olan bir yapı söz konusudur. Bu değişim molekülün kimyasal özelliklerine farklılıklar katar ve değişik reaktivite gösterir. OH^- gibi ilişkide olduğu biyolojik yapılarda farklılık yapar. Bu olayın fagosit işlevi açısından açıklanması ise şöyledir: MPO reaksiyonu ile oluşan $HOCl^-$, H_2O_2 ile birleşerek singlet oksijeni oluşturur.

PMNL'lerde fagositosis ve degranülasyon ile birlikte glukoz kullanımı sonucu özellikle heksoz monofosfat yolu hızlanır, NADPH üretimi artar. NADPH oksidaz kataliziyle oksijenden süperoksit oluşur. Bu oksidasyonunun artması şant aktivasyonunu ifade eder. Oluşan süperoksit ise H_2O_2 oluşturur. Oluşan H_2O_2 ve granülde var olan MPO-halojenlerin varlığında; MPO- H_2O_2 -Halid antimikrobal sistemini oluşturur. Bu sistemin oluşumu için, H_2O_2 'nin varlığı ve bu H_2O_2 'nin granül MPO'ını serbest bıraktırdığı belirtilmiştir. Halojenlerin, MPO ile okside edilerek; hipobromik asit, hipoklorik asit, hipoiyodik asit oluşturduğu ve kuvvetli okside edici bileşiklerinde sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir. MPO- H_2O_2 sistemi vaküoler sahada aktiftir. Sitoplazmada glutatyon ve katalaz sistemleriyle inaktifleştirilir.⁶⁸

2.3.2 Serbest Nitrojen Radikalleri (Reaktif Nitrojen Türleri)

Biyolojik sistemler yapılarında +1'den +5'e kadar değişen farklı oksidasyon durumlarındaki azot atomu bulunduran çeşitli azot oksitlere sıklıkla maruz kalırlar. Oksidasyon durumları guanido azot ile nitrat

arasında bir ara metabolit olan bu azot oksitlere *Reaktif Nitrojen Türleri* adı verilir.⁶⁹

Başlıca reaktif nitrojen türleri şöyledir.

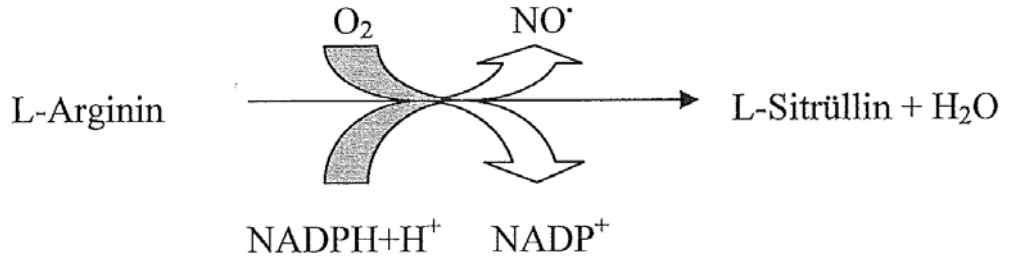
-Nitrik Oksit (Azot Monoksit)	NO
-Azot Dioksit	NO ₂ ⁻
-Nitröz Asit/Nitrit	HNO ₂ / NO ₂ ⁻
-Nitrik Asit/Nitrat	HNO ₃ / NO ₃ ⁻
-Nitrozil Katyonu	NO ⁺
-Nitrozil Anyonu	NO ⁻
-Diazot Tetraoksit	N ₂ O ₄
-Diazot Trioksit	N ₂ O ₃
-Peroksinitrit	ONOO ⁻
-Peroksinitröz Asit	ONOOH
-Nitril (Nitronyum) Katyonu	NO ₂ ⁺
-Nitril (Nitronyum) Klorür	NO ₂ Cl

Nitrik Oksit (NO)

Nitrik Oksit (Nitrojen Monoksit); organizmada oluşan reaktif nitrojen türlerinin en önemlisidir. Oksidasyon basamağı +2'dir. NO; inorganik, renksiz, oksijen varlığında suda çözünebilen non-stabil bir gazdır. Eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle radikal özelliği taşır. Sıvı ortamlarda serbestçe difuze olabilir ve hücre membranlarından rahatça geçebilir. Oksijen varlığında hızlıca nitrit ve nitrata dönüşerek inaktive olur.⁷⁰

NO Sentaz (NOS)

NO; nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından NADPH ve oksijen varlığında L-arjinin'in L-sitrulin'e oksidasyonu sırasında sentezlenmektedir.⁷¹



Şekil 3: Nitrik Oksit Sentezi

Nitrik Oksit Sentaz (NOS) ([EC 1.14.13.39](#)); yaklaşık 140 kDa molekül ağırlığında bir enzimdir. Substrat olarak yarı esansiyel bir aminoasit olan L-arjinini kullanır ve oksijen varlığında ürün olarak NO ve L-sitrulin oluşur. Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ise kofaktör olarak kullanılır. NO, suda çözünebilen, renksiz, stabil bir gazdır. Sulu çözeltideki yarılanma ömrü 0.1–10 saniye kadardır. NO, birçok biyolojik olayda hayati önemi olan bir hücresel sinyal molekülüdür.^{71,72}

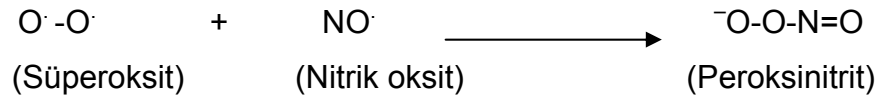
NOS enziminin nöronal NOS (nNOS, NOS I), endotelial NOS (eNOS, NOS III) ve indüklenabilir NOS (iNOS, NOS II) olmak üzere 3 farklı izoformu bulunmaktadır. nNOS ve eNOS normal şartlarda sabit düzeylerde, konstitutif olarak üretildikleri için yapısal NOS olarak tanımlanmaktadır. iNOS sentezi ise çeşitli uyaranlar tarafından uyarılabilmektedir.⁷³

Yapısal NOS'ların aktivitesi hücre içi Ca^{+2} seviyelerinden etkilenmektedir. Pikomolar düzeyde NO oluşumuna neden olurlar. iNOS ekspresyonu ise Ca^{+2} bağımsızdır, büyük miktarlarda NO oluşturur (nanomolar) ve aktivitesi daha uzun sürelidir. Yapısal NOS'lar tarafından oluşturulan az miktarda NO nörotransmisyon ve vazodilatasyon gibi fizyolojik olaylarda rol alır. iNOS ise trombositler, akciğer ve ince barsak hücreleri gibi bazı hücre tiplerinde eksprese edilmesine karşılık normalde

inaktiftir. Ancak bazı hücreler LPS, TNF, IFN- γ gibi proinflatuvar ajanlar tarafından aktive edildiklerinde iNOS aktivitesi uyarılmaktadır.^{74,75,76}

NO'nun birçok etkisi siklik GMP (Guanozin monofosfat) üreten guanilat siklaz enzimi aracılığı ile gerçekleşir. cGMP artışı hücre içi Ca düzeyinin azalmasına neden olacak olaylar zincirinin tetiklenmesine neden olarak vazodilatasyon, kalp kasının gevşemesi ve trombosit agregasyonunun inhibisyonuna neden olur.^{71,77,78}

NO, süperoksit anyonu ile etkileşerek peroksinitrit (ONOO⁻) oluşturur.



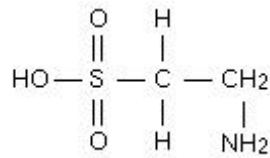
Normal hücresel koşullarda ONOO⁻ oluşumu sınırlıdır. Peroksinitrit nükleik asit, lipid ve proteinler üzerine toksik etkisi olan potent bir oksidandır. Peroksinitrit ve parçalanma ürünleri lipid peroksidasyonu, bazı moleküllerin nitrozilasyonu ve sodyum kanal inhibisyonuna neden olarak hücre hasarına yol açabilir. Bunlardan *3-Nitrotirozin (3-NT)*, ONOO⁻'nin serbest ya da protein yapısında bulunan tirozin amino asitini nitratlaması sonucu oluşur. ONOO⁻'nin fizyolojik pH'da kısa bir yarı ömre sahip olması nedeniyle, dokulardaki ve vücut sıvılarındaki 3-NT'nin varlığı, ONOO⁻ üretiminin spesifik bir göstergesi olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır.^{79,80,81}

NO serbest radikal olması nedeniyle yüksek derecede reaktiftir ve çeşitli yapılar ile etkileşebilmektedir. NO, kanda nitrit ve nitrate metabolize olur. Kandaki NO'nun dayanıklı olan metaboliti nitrattır. NO, ayrıca aminoasit ve proteinlerdeki tiyol (-SH) grupları ile etkileşerek nitrozotiyol (-S-NO) bileşikleri şeklinde depolanabilmektedir.

NO'nun ayrıca serbest radikal yakalayıcısı ve hücre koruyucusu olduğu düşünülmektedir. NO'nun inflamasyon sırasında oluşan vazodilatasyon, değişen damar geçirgenliği, lökosit göçü ve aktivasyonunda rolü olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, iNOS aktivasyonu ile üretilen aşırı NO, moleküler oksijen veya diğer serbest radikallerle reaksiyona girerek sitotoksik etkilere de yol açmaktadır.⁸² iNOS, endotel hücreleri, makrofajlar ve farklı parenkimal hücreler tarafından eksprese ve aktive edilmektedir. LPS ve IFN- γ ile uyarılan makrofajların iNOS mRNA'sını 2 saat sonra eksprese ettikleri gösterilmiştir.

2.4. Taurin

Taurin (2-aminoetansülfonik asit); metiyonin ve sistein metabolizmasından türeyen yarı esansiyel bir amino asittir. Protein sentezinde kullanılmaz. Diğer amino asitlerden farklı olarak karboksil grubu (-COOH) yerine bir sülfonik asit grubuna (-SO₃H) sahiptir.^{83,84}



Şekil 4: Taurinin molekül yapısı

Taurin memeli dokularının temel hücre içi aminoasitidir ve genellikle milimolar konsantrasyonlarda bulunur. Doğal antioksidan olarak kabul edilir. Retina, lökositler, trombositler, beyin, kalp, iskelet kası ve

karaciğer gibi aşırı miktarda serbest radikal üreten dokularda daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Safra asitlerinin konjugasyonu, detoksifikasyon, membran stabilizasyonu, üreme, bağışıklık, hücre büyüme ve farklılaşmasının kontrolü, apoptozisin kontrolü, hücrel Ca^{++} seviyesinin düzenlenmesi, osmoregülasyon, merkezi sinir sistemi ve retinanın gelişimi gibi önemli biyolojik fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir. Düşük taurin düzeylerinin retinal dejenerasyon, kardiyomiyopati, büyüme ve gelişmenin gecikmesi ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle son yıllarda, antioksidan aktivitesine dair çalışmalar büyük önem kazanmıştır.^{85,86}

Hücre içi taurin havuzu 3 şekilde sağlanır;

- 1) Diyetle direk taurin alımı
- 2) Taurinin karaciğer, beyin ve diğer alternatif dokular tarafından de-novo sentezi
- 3) Böbrekten reabsorbsiyonu^{87,88}

2.4.1 Taurinin de-novo sentezi

Taurinin biyosentezi esas olarak beyin ve karaciğerde, metiyonin ve sistein metabolizmasının bir bölümünde gerçekleşir. Taurinin doğrudan sisteinden ya da metiyoninin sisteine dönüşümü yoluyla sentezi için birkaç olası mekanizmadan söz edilebilir.(şekil 5)

Bunlar;

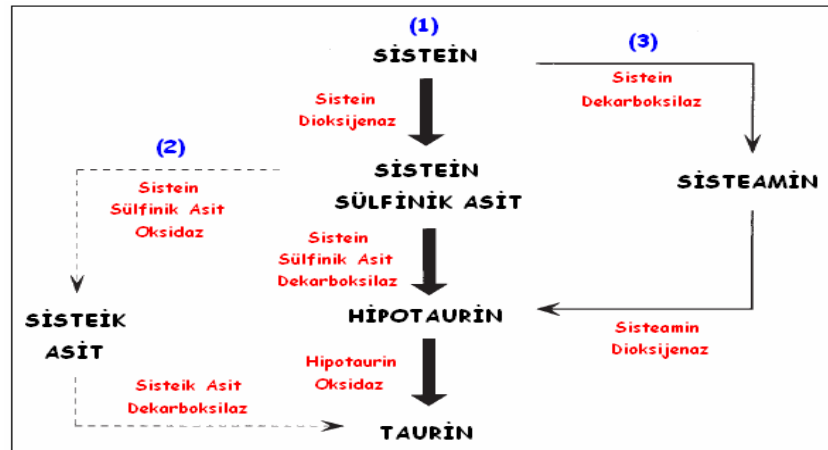
- (1) Sisteinin, sistein sülfonik asite oksidasyonu, oluşan sistein sülfonik asitin hipotaurine dekarboksilasyonu ve hipotaurinin oksitlenerek taurini oluşturması (Bu yol *Sistein Sülfonat Yolu* olarak adlandırılır),

(2) Sisteinin, sistein sülfirik asite oksidasyonu, ardından sisteik asitin oluşumu ve taurine dekarboksilasyonu,

(3) Sisteinin dekarboksilasyonu ile oluşan sisteaminin hipotaurine, hipotaurinin ise taurine oksidasyonu'dur.^{86,87,89,90}

Taurin biyosentezinin hız kısıtlayıcı enzimleri, sistein sülfinat yolunda, sisteinin, sistein sülfirik asite oksidasyonunu sağlayan *Sistein Dioksijenaz (CDO)* ile sistein sülfirik asiti hipotaurine dönüştüren *Sistein Sülfirik Asit Dekarboksilaz (CSAD)*'dır. CDO ve CSAD, temel olarak karaciğerde lokalize olmuşlardır. Ancak böbrek, testisler, beyinde glial hücreler (özellikle astrositler) gibi alternatif taurin sentez bölgeleri olabilecek ekstrahepatik dokularda da tanımlanmışlardır.

Hücre içi taurin konsantrasyonları, hız kısıtlayıcı enzimler olarak CDO ve CSAD'nın ekspresyon düzeyi ve regülasyonuna bağlıdır. Taurini oksitleyebilme yeteneğine sahip olmadıkları için, ökaryotlarda taurinin ileri metabolizması yoktur ve enerji kaynağı olarak kullanılmaz. Bakteriler ise taurini, kükürt, azot, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaktadırlar.^{88,91,92}



Şekil 5: Taurinin biyosentez yolları

2.4.2 Taurin transportu

Taurin, hidrofilik özellikte olması sebebiyle membranlardan geçemez ve tüm dokulara taşıyıcı proteinler olan *Taurin Transporter (TauT)*'ları aracılığıyla aktif olarak taşınır. Taurinin biyolojik etkilerinin çoğu, hücresel konsantrasyonuna bağlıdır ve bu konsantrasyonun kontrol edilmesinde, taurin biyosentezinin yanı sıra ekstraselüler ortamdan taurin taşınmasını sağlayan TauT'lerin de büyük rolü bulunmaktadır. Bir taurin molekülünün hücre membranından taşınabilmesi için, en az 2 Na⁺ ve 1 Cl⁻ iyonuna gereksinim duyulur.^{87,88,93} Taurin, böbrek, dalak, karaciğer tarafından kalp ve kasa göre daha hızlı alınır. Kalp, akciğer, dalak, kas, beyin ve bağırsakta ise uzun süre kalır.^{93,94,95,96,97}

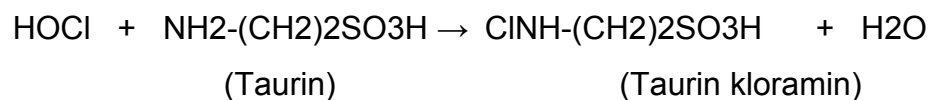
2.4.3 Taurinin Antioksidan Etkisi

Taurinin en önemli fonksiyonlarından biri hipokloröz asit (HOCl) gibi klorlanmış oksidanlara karşı dokuları korumaktır. İnflamatuvar şartlarda uyarılmış olan fagositlerde, özellikle PMNL'de, artan O₂ kullanımı ve enzim aktivasyonunu takiben O₂⁻, H₂O₂, HOCl, NO gibi oksidanların üretiminde önemli bir artış meydana gelir. *Solunumsal patlama (respiratory burst)* olarak adlandırılan bu süreçte, PMNL tarafından fagosit edilmiş olan işgalci mikroorganizmalar, üretilen bu toksik ürünlerin etkisiyle yok edilir.⁹⁸

PMNL'nin primer lizozomal granüllerinde yer alan bir hem enzimi olan MPO, solunumsal patlama zincirinin son aşamasında H₂O₂ ile Cl⁻ iyonu arasındaki reaksiyonu katalizleyerek HOCl'yi oluşturur. HOCl, PMNL'nin başlıca oksidanı olup, TNF-α, IL-2, IL-6 gibi sitokinlerin ve çeşitli büyüme faktörlerinin sentez ve salınımını uyarır. Aynı zamanda, aminlerle (-NH₂) ve sülfhidril gruplarıyla (-SH) çok hızlı reaksiyona girebilme özelliği sayesinde mikroorganizma membranlarının -NH₂ ve -SH

gruplarını okside ederek, denatürasyonuna sebep olur. Bununla birlikte, HOCl'nin oluşumu dokular için hem yararlı hem de zararlı bir olaydır. Çünkü HOCl'nin toksisitesi sadece mikroorganizma membranları ile sınırlı değildir ve konak dokuda inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunu takiben oluşan hasarda önemli bir rol oynamaktadır. HOCl, karbonhidratları, nükleik asitleri, peptit ve amino asitleri direk oksitleyebilir ve aminlerle reaksiyonu sonucu *N-kloraminler* olarak adlandırılan sekonder klorlayıcı ajanların oluşumuna sebep olur. N-kloraminler, HOCl'ye göre daha az reaktif ve daha uzun ömürlü oksidanlardır ancak çoğu stabil değildir ve kolaylıkla deamine ve/veya dekarboksile olarak toksik aldehytleri oluşturabilirler.^{98,99,100,101}

Taurin inflamatuvar hücrelerin sitozollerinde MPO yoluyla üretilen HOCl ile reaksiyona girerek daha stabil, daha uzun ömürlü (yarı ömrü 18 saat) ve daha az toksik olan *taurin kloramin (TauCl/N-klorotaurin)*'i oluşturur. TauCl, b-amino asit yapısına sahip olması nedeniyle N-kloraminler içinde en stabil olanıdır ve HOCl ile reaksiyonu esnasında diğer aminlerde olduğu gibi toksik aldehitler oluşmaz.^{99,102}



Taurinin, PMNL tarafından üretilen HOCl'nin bir kısmını nötralize ederek TauCl oluşturur. TauCl'nin de HOCl gibi bakterisidal, fungisidal, virüsidal ve vermisidal etkileri olduğu için konak savunmasında herhangi bir zayıflamaya yol açmaz. Bu sayede TauCl, bir taraftan nötrofillerin mikrobisidal aktivitelerini sürdürmelerine, diğer taraftan da konak doku hasarının en aza indirgenmesine yardımcı olur.^{103,104}

TauCl'nin aynı zamanda güçlü bir immünregülatördür. Aktive fagositler tarafından salınan sitokinler ve eikozanoidler gibi bazı proinflamatuvar medyatörler konak dokuya nötrofil göçünü başlatır. TauCl, fagositler tarafından bu proinflamatuvar medyatörlerin sentez ve salınımını, transkripsiyonel ve post-translasyonel mekanizmalarla düzenler. Güçlü bir inflamatuvar sitokin ileticisi olan nükleer faktör-(kappa) B aktivasyonunu baskılar.^{88,93,101}

Aynı zamanda TauCl, fagositik hücrelerde iNOS transkripsiyonunu, O_2^- ve iNOS aktivasyonu ile oluşan NO üretimini de inhibe etmektedir.¹⁰⁵ Ekzojen taurin uygulamasının TauCl oluşumunu güçlü bir şekilde arttırdığı, TauCl'nin PMNL'de O_2^- üretimini makrofajlarda PGE2, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α ve NO'nun üretimini inhibe etmek suretiyle inflamasyonda önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir.^{105,106,107,108}

2.4.4 Taurinin Kalp ve Beyin Üzerine Etkileri

Kalpteki serbest amino asitlerin yaklaşık %60'ını oluşturan taurin, kalbi, nötrofillerin indüklediği reperfüzyon hasarından ve oksidatif stresten korur. Hücre içi Ca^{+2} seviyesini düzenleyerek, hücre ölümüne ve miyokardiyal hasara sebep olabilecek Ca^{+2} düzensizliğine karşı kalp kasını korur. Kan basıncının düşürülmesinde etkilidir.^{86,92} MSS'de ise hücre göçünü etkilediği, sinirsel iletimi düzenlediği ve beyin gelişimini hızlandırdığı bildirilmiştir.^{109,110}

2.5 PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

2.5.1 PZR Tekniğinin Gelişimi

PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu); bir DNA parçasından milyonlarca kopya oluşturmak için geliştirilmiş bir tekniktir. James D. Watson ve Francis Crick tarafından 1953 yılında DNA heliks yapısının aydınlatılmasını takip eden yıllarda araştırmacılar DNA replikasyon mekanizması üzerine odaklanmış ve bu alanda birçok araştırmacıya Nobel ödülü kazandıran gelişmeler olmuştur.^{111,112} Arthur Kornberg ilk defa 1957 yılında DNA Polimeraz enzimini tanımlamıştır.¹¹³ Thomas D. Brock ise 1969 yılında yellowstone ulusal parkından yeni bir bakteri türü izole etmiş ve *Thermus aquaticus* olarak isimlendirmiştir.¹¹⁴ Bu bakteri yüksek sıcaklıklara dayanıklı enzimlerin kaynağı olarak ileriki yıllarda PZR tekniğinin gelişmesinde büyük bir adım olacaktır. Bu günkü PZR tekniğinin ilk adımları 1971 yılında atılmaya başlanmıştır. Kjell Kleppe ilk kez kısa DNA fragmentlerini primerler ve DNA Polimeraz enzimi kullanarak in vitro ortamda 4 kat çoğaltmayı başarmıştır.¹¹⁵ *Thermus aquaticus*' dan 1976 yılında DNA Polimeraz enzimi izole edilmiş ve bu enzimin 75 C° üzerinde bile aktivitesini sürdürebildiği tespit edilmiş. Frederick Sanger ve arkadaşları ise 1977 yılında bir oligonükleotid primer, DNA polimeraz ve modifiye edilmiş nükleotid kaynağı kullanan bir sekanslama metodu yayınladılar.¹¹⁶ Aslında 1980'li yılların başında PZR tekniği için gerekli tüm bileşenler değişik araştırmacılar tarafından aydınlatılmıştı. Bütün bu bileşenleri derleyip bu günkü PZR tekniğini sunan isim ise 1984 yılında Kary Mullis oldu ve bu buluşu ile 1993 yılında kimya alanında nobel ödülü almaya hak kazandı.

2.5.2 PZR Tekniğinin Temelleri

Tekniğin temeli tekrarlayan ısıtma ve soğutma aşamalarını içeren bir ısı döngüleme sistemine dayanır. Metot kısaca herhangi bir canlıya ait bir DNA molekülünün belli bir bölgesinin baz dizisine spesifik oligonükleotid primerler tarafından ısıya dayanıklı bir polimeraz enzimi eşliğinde çoğaltılmasıdır.¹¹⁷

PZR reaksiyonu 3 aşamadan oluşur¹¹⁸:

Denatürasyon: Yüksek ısıda komplementer bazlar arasındaki hidrojen bağlarının yıkılması sonucu DNA çift iplikçığının birbirinden ayrılması. Bu aşama genellikle 93-95 C°'lerde gerçekleşir.

Annealing: Oligonükleotid primerlerin DNA ipliği üzerinde kendisine komplementer olan bölgeyi bulup bağlandığı aşamadır. Annealing sıcaklığı her primer için spesifikdir ve primerlerin baz dizisine göre değişir.

Extension (Uzama): Taq polimeraz enziminin oligonükleotid primerlerin 3' ucuna deoksinükleotidleri eklemesi ile yeni oluşan DNA iplikçığının uzamasıdır. Polimerizasyon 5'→3' yönünde devam eder. Polimerizasyon şu şekilde olur; önce yeni ipliğin yapısına girecek olan bazın, kalıp iplikteki baz ile uygunluğu kontrol edilir, bu uyum sağlandıktan sonra, birinci nükleotidin 3' OH grubu ile ikinci nükleotidin 5' P grubu arasında, gama ve beta fosfatların ayrılması ile fosfodiester bağı oluşur ve dinükleotid meydana gelir. Bu şekilde polinükleotid zinciri uzatılarak polimerizasyon tamamlanır. Genellikle 72 C°'de gerçekleşir.

Bu 3 aşamanın ardarda 20-40 kez tekrarlanması sonucu tek bir DNA molekülünden milyarlarca kopya üretilir.

Bir PZR reaksiyonu çeşitli komponentler gerektirir. Bunlar¹¹⁸:

- Çoğaltılmak istenen canlıya ait *DNA örneği*
- DNA üzerindeki hedef bölgeye uygun *primer çifti*
- *DNA polimeraz enzimi*
- *Deoksinükleozid trifosfatlar (dNTP)*
- DNA polimeraz enziminin aktivitesi ve stabilitesi için uygun kimyasal ortamı sağlayan *tampon çözelti*
- *Divalent katyonlar*, (magnezyum veya mangan iyonları); genellikle Mg^{+2} kullanılır,
- Monovalent katyon olarak *potasyum iyonları*

PZR genellikle 0.2–0.5 ml’lik reaksiyon tüpleri içerisinde 10–200 µl bir reaksiyon hacmi içinde gerçekleştirilir. Isı döngüleyici cihazlar reaksiyonun gerekli sıcaklıkta gerçekleşmesini sağlar. Tüplerin kapak kısmında sıvı yoğunlaşması önlemek için ısıtmalı kapaklı tipleri vardır.

1984 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmesinin ardından PZR tekniği çeşitli tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında artık yaygın olarak kullanılan vazgeçilmez bir teknik olmuştur. Genlerin fonksiyonel analizi, kalıtsal hastalıkların tanısı; genetik parmak izlerinin belirlenmesi (adli bilimler ve babalık testi uygulamaları), bulaşıcı hastalıkların tanısı uygulandığı alanlara örnek olarak verilebilir. Değişik amaçlar için kullanılmak üzere geliştirilmiş çeşitli PZR tipleri mevcuttur.

Bunlar;

- Allel spesifik PZR
- Asimetrik PZR
- Hot-start PZR
- Nested PZR
- Multipleks PZR

- Kantitatif PZR
- Reverse Transkriptaz PZR
- Touchdown PZR
- Real time PZR

2.5.3 RT-PZR (Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

RNA birçok fonksiyonu olan bir biyolojik makro moleküldür. DNA' dan ifadelenen messenger RNA, protein sentezi için kalıp görevi görür. Bir organizmadaki genler sabit olmakla beraber mRNA miktarı değişik koşullar altında o genlerin nasıl ifadelendiğinin göstergesidir. RNA miktarının çeşitli tekniklerle incelenebilmesi organizmanın gen ifade profilinin saptanması açısından önemlidir.

RT-PZR, gen ifadelerinin varlığı veya karşılaştırılmalı analizi için kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. Bu teknikte bir genin ekspresyon ürünü olan mRNA'lar analiz için kullanılır. DNA polimeraz yalnızca DNA üzerinden aktivasyon gösterebildiği için öncelikle RNA'nın DNA molekülüne çevrilmesi gerekir. mRNA, retroviruslardan izole edilen reverse transkriptaz enzimi ile cDNA'ya (komplementer DNA) çevrildikten sonra bu cDNA'nın PZR ile amplifikasyon işlemine RT-PZR denir. PZR ürünü agaroz jelde yürütülür ve elde edilen bantın yoğunluğu, her dokuda ifade edildiği bilinen kontrol genlerinin (house keeping genler) ifadesi ile karşılaştırılır. Bu yöntem semikantitatif RT-PZR olarak isimlendirilir. Bu yöntem genellikle herhangi bir genin bir dokuda ifade edilip edilmediğinin veya ifadedeki değişikliğin kantitatif analizi için kullanılır.¹¹⁹

RT-PZR tekniği 4 ana basamak içerir. Bunlar;

1) Reverse Transkripsiyon: RNA molekülü reverse transkriptaz enzimi ve primerler kullanılarak cDNA'ya çevrilir.

2) ift zincirli DNA'nın 95C°'de denaturasyonu: iki zincir birbirinden ayrılarak daha düşük sıcaklıklarda primerlerin bağlanmasına izin verir.

3) Annealig (primer bağlanması): Primerlerin bağlanma sıcaklığı tamamen primer dizisinin içeriği tarafından belirlenir. Bu fark, A-T bazları arasında 2, G-C bazları arasında 3 hidrojen bağı olmasından kaynaklanır. Bağlanma sıcaklığı olarak genellikle primer Tm'lerinin 5 derece altı seçilir.

4) DNA uzaması: Hedef bölgeye bağlanan primerlerin ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi tarafından genellikle 72C°'de uzatılması ile yeni DNA zincirinin sentezlenmesidir.

Reverse transkriptaz enzimi; RNA bağımlı DNA polimeraz olarak da bilinir. Normal transkripsiyonda DNA'nın RNA'ya transkripsiyon işlemi ters yönden yürüten enzimdir. Tek zincirli RNA'yı tek ve çift zincirli DNA'ya dönüştürür. Reverse transkriptaz enzimi ilk defa Wisconsin niversitesinde Howard Temin ve eř zamanlı olarak MIT' de David Baltimore tarafından 1970 yılında keşfedildi ve bu iki araştırmacı 1975 yılında nobel dl almaya hak kazandılar.

RT-PZR'nin başarısını etkileyen en önemli faktör RNA molekülünün kalitesi ve saflığıdır. RT-PZR aşamasına geçmeden önce izole edilen RNA molekülünün konsantrasyonu, kalitesi ve saflığı çeşitli yöntemlerle değerlendirilir.

2.6 RNA (Ribon kleikasit)

RNA; birçok fonksiyonu olan bir biyolojik makro moleküldür. DNA'dan ifadelenen messenger RNA, protein sentezi için kalıp görevi görür. Bir organizmadaki genler sabit olmakla beraber mRNA miktarı değişik koşullar altında o genlerin nasıl ifadelendiğinin göstergesidir. RNA miktarının çeşitli tekniklerle incelenebilmesi organizmanın gen ifade profilinin saptanması açısından  onemlidir. DNA ile karşılaştırıldığında RNA daha non-stabildir. Ribon kleazlar, RNA  zerine etki ederek RNA'nın parçalanmasına neden olur.

2.6.1 RNA Konsantrasyonunun ve Kalitesinin Değerlendirilmesi

RNA miktarı ve kalitesi spektrofotometrede 260nm ve 280nm'de yapılan absorbans ölçümleri ile belirlenir. 260nm dalga boyunda elde edilen 1 absorbans değeri 44  g/mL RNA ya eşittir. A_{260} / A_{280} ise RNA'nın saflığını ve kalitesini belirler. Saf bir RNA  rneğinin A_{260} / A_{280} değeri 1.9-2.1 civarında olmalıdır.

* $A_{260}=1 \rightarrow 40 \mu\text{g/ml RNA}$

RNA Konsantrasyonu: $= 40 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{dilüsyon faktörü}$

*Saf RNA; A_{260}/A_{280} oranı 1.9–2.1

2.6.2 RNA Molekülünün İntaklığının Belirlenmesi

DNA ile karşılaştırıldığında RNA daha non-stabildir. Ribon kleazlar RNA  zerine etki ederek RNA'nın parçalanmasına neden

olur. RNA molekülünün intaklığı total RNA'nın denature edici jelde yürütülmesi ve etidyum bromid boyaması ile değerlendirilir. Jel görüntüsünde 18S ve 28S ribozomal RNA bantlarının görünüşleri net ve 28S rRNA bantının 18S rRNA bantının yaklaşık 2 katı yoğunlukta olması beklenir. Smear görünümü oluşturmuş örnekler muhtemelen degradasyona uğramışlardır ve RT-PZR için uygun kalıp değildir.¹²⁰

3. GEREÇLER ve YÖNTEM

Çalışmalar; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı ve GenArt Tüp Bebek ve Üreme Biyoteknolojisi Merkezinde yapılmıştır.

3. 1 GEREÇLER

3. 1. 1 Kullanılan Deney Hayvanları

GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi Deney Hayvanları kısmından sağlanan, ağırlıkları 300 – 500gr arasında değişen (ortalama 500gr) ve her iki cinsten olmak üzere toplam 40 adet kobay bu çalışmalarda kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce, hayvanlar herhangi bir enfeksiyondan korumak amacıyla bir hafta boyunca ayrı bir yerde, özel bakıma alındılar. Sakrifiye edilene kadar hayvanların diyetlerine ve sularına dikkat edildi.

3. 1. 2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- LPS (Escherichia coli LPS serotype 0111:B4) (Sigma)
- Taurin (Sigma)
- RNA izolasyon kiti (Qiagen)
- RNase-free su (Qiagen)
- Proteinaz K (Qiagen)
- Etanol (Sigma)
- Deoxyribonuclease I (Invitrogen)
- cDNA Synthesis Kit (Finnzymes)
- Agaroz (Roche)
- Taq Polimeraz (Fermentas)

- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)
- dNTP (Fermentas)
- MgCl₂ (Fermentas)
- Proteinaz K (Qiagen)

3. 1. 3 Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Homojenizatör (Potter S; Braun Biotech)
- Hassas Terazı (Precisa)
- Su Banyosu(Nüve)
- Ultrasantrifüj (Beckmann)
- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)
- Thermalcycler (Applied Biosystem)
- Jel elektroforez Sistemi (Biogen)
- Güç Kaynağı
- Jel Görüntüleme Sistemi (Thermo)

3. 2 YÖNTEMLER

Bu çalışmada; deney hayvanları uygun şekilde hazırlandıktan sonra anestezi altında sakrifiye edilerek karaciğer, kalp, beyin ve böbrek dokuları uygun şekilde alındıktan sonra -80 C^o de dondurularak saklanmıştır. Bu dokulardan RNA izolasyonları yapılmıştır. RNA örnekleri cDNA'ya çevrilerek iNOS, eNOS, MPO ve XO genlerinin ekspresyon değişiklikleri RT-PZR yöntemi ile incelenmiştir. GAPDH geni ekspresyonu ise kontrol gen olarak değerlendirilmek üzere incelenmiştir.

3. 2. 1 Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Bu çalışmalarda her bir grupta 10 adet olacak şekilde 4 ayrı kobay grubu oluşturuldu. Her gruba aşağıdaki işlemler yapıldı.

Kontrol Grubu:

Enjeksiyonun uygulanması esnasında oluşan stres bazı biyokimyasal parametrelerin değişimine yol açabileceği düşüncesiyle, kontrol grubu hayvanlara da aynı stresi oluşturma amacıyla, steril serum fizyolojik intraperitoneal (ip) olarak enjekte edildi. Serum fizyolojik enjeksiyonundan 6 saat sonra hayvanlar ketamin (60 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) intramuskuler (im) anestezisi altında sakrifiye edilerek, karaciğer, kalp, beyin ve böbrek dokuları alındı. Serum fizyolojik ile yıkanarak ayrı ayrı paketlenip etiketlenilerek -80 C^o'de dondurularak saklandı.

Taurin Grubu:

Sadece taurinin kontrol hayvanları üzerindeki etkisini görmek amacıyla taurin grubu oluşturuldu. Bu gruba 300mg/kg dozda taurin ip olarak enjekte edildi.¹⁹ Taurin enjeksiyonu öncesinde, taurinin suda iyice eritilmesine ve enjeksiyon sırasında 37 C^o ye getirilerek uygulanmasına dikkat edildi. Taurin enjeksiyonundan 6 saat sonra hayvanlar ketamin (60 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) im anestezisi altında sakrifiye edilerek, karaciğer, kalp, beyin ve böbrek dokuları alınarak serum fizyolojik ile yıkanarak ayrı ayrı paketlenip etiketlenilerek -80 C^o de dondurularak saklandı.

Endotoksemi Grubu:

Bu gruptaki hayvanlara 4 mg/kg LPS (*Escherchia coli* 0111:B4) ip olarak verildi.²⁰ Enjeksiyondan 6 saat sonra hayvanlar ketamin (60 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) im anestezisi altında sakrifiye edilerek, karaciğer, kalp, beyin ve böbrek dokuları alındı ve serum fizyolojik ile yıkanarak ayrı ayrı paketlenip etiketlenilerek -80 C°'de dondurularak saklandı.

Taurin + Endotoksemi Grubu:

Bu gruptaki hayvanlara önce taurin, taurin grubundaki ile aynı şartlarda uygulandı ve bu uygulamadan hemen sonra kanda aynı anda maksimum konsantrasyona ulaşmaları beklendiği için endotoksin verildi. 6 saat sonra hayvanlar ketamin (60 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) im anestezisi altında sakrifiye edilerek, karaciğer, kalp, beyin ve böbrek dokuları alınarak serum fizyolojik ile yıkanarak ayrı ayrı paketlenip etiketlenilerek saklanmak üzere -80 C°'de donduruldu.

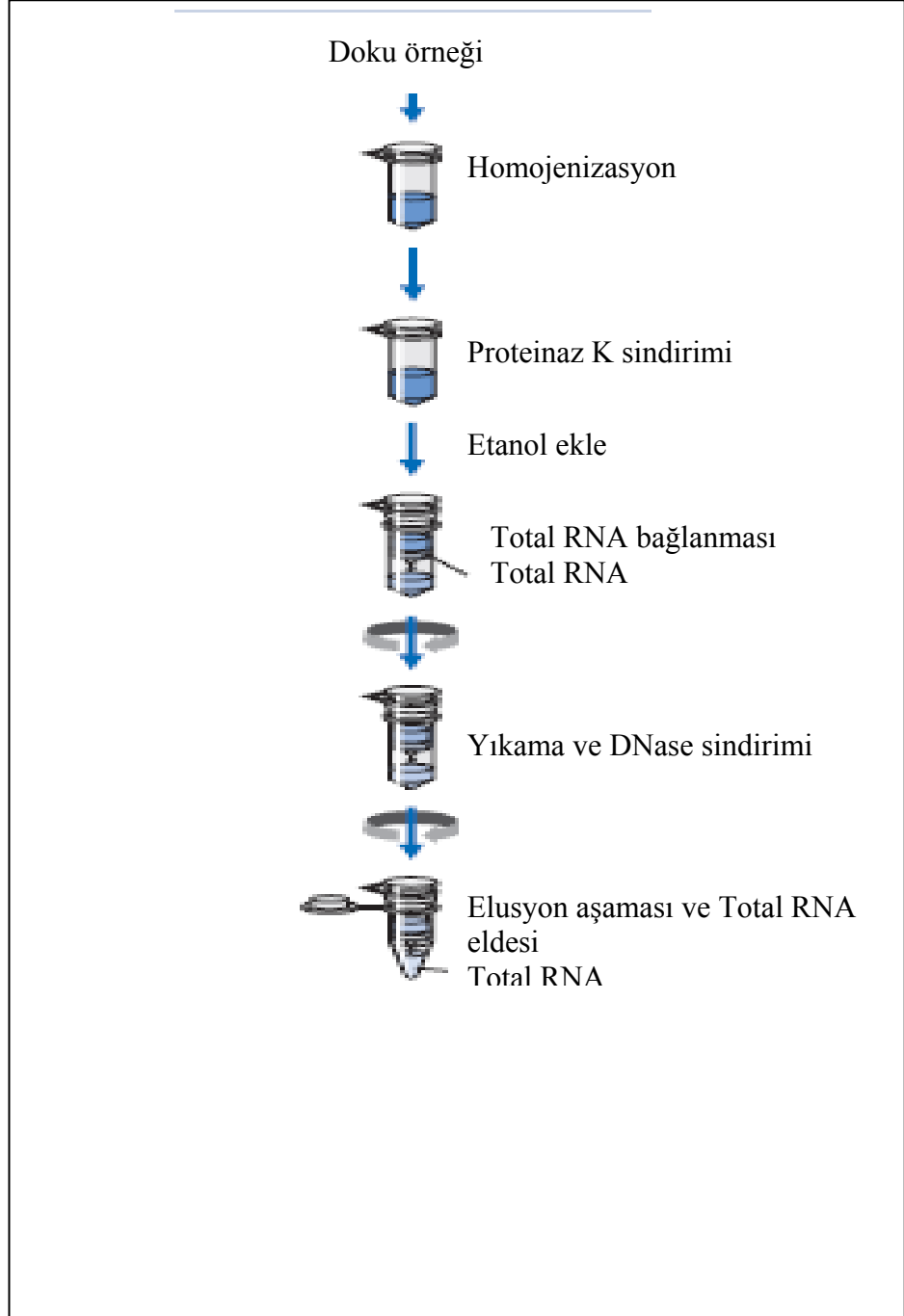
3. 2. 2 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için fibröz dokulardan RNA izolasyonu için de uygun olan QIAGEN RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (74704) kullanıldı. Her doku ve örnekleme grubundan, içinden en iyi 1 tanesini seçmek amacıyla 2'şer adet örnek kullanıldı. RNA izolasyonu için şu aşamalar izlendi:

- 1) Dondurulmuş Karaciğer, Kalp, Böbrek ve Beyin doku örnekleri ayrı ayrı 30mg'ı aşmayacak şekilde tartıldı ve homojenize edilmek üzere steril cam homojenizasyon tüpünün içerisine koyuldu.

- 2) 300 µl RLT tamponu eklenerek doku örneği en yüksek devirde homojenizatörde (*Potter S; Braun Biotech*) 40 saniye homojenize edildi.
- 3) Lizata 590 µl RNase-free su eklendi. 10 µl proteinaz K eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı.
- 4) 55 C°'lık su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
- 5) 10,000 x g' de, 20–25 C°'de 3 dakika santrifüj edildi.
- 6) Süpernatant, pellete dokunulmadan yeni bir 1,5 ml'lik ependorf tüpe alındı.
- 7) 450 µl %96'lık etanol eklendi ve pipetlenerek iyice karıştırıldı.
- 8) Yaklaşık 700 µl olan lizat, 1,5 ml'lik tüpe yerleştirilmiş olan spin kolona eklenerek 8000 x g' de, 20–25 C°'de 15 saniye santrifüj edildi.
- 9) Çökelti dökülerek atıldı ve tekrar 8000 x g' de, 20–25 C°'de 15 saniye santrifüj edildi.
- 10) Çökelti dökülerek atıldı ve spin kolona 350 µl RW1 tamponu eklendi.
- 11) 8000 x g' de, 20–25 C°'de 15 saniye santrifüj edilerek membranın yıkanması sağlandı.
- 12) Çökelti atıldı.

- 13) İçine 10 µl DNase-I eklenmiş olan 80 µl RDD tamponu spin kolona eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 14) Spin kolona 350 µl RW1 tamponu eklenerek 8000 x g' de, 20–25 C°de 15 saniye santrifüj edildi.
- 15) ökelti atıldı.
- 16) 500 µl RPE tamponu eklenerek 8000 x g' de, 20–25 C° de 15 saniye santrifüj edildi.
- 17) ökelti atıldı.
- 18) Tekrar 500 µl RPE tamponu eklenerek 8000 x g' de, 20–25 C°de 15 saniye santrifüj edildi.
- 19) Spin kolon yeni, temiz bir tüp içerisine yerleştirildi.
- 20) Direkt olarak spin kolon membranı üzerine denk gelecek şekilde 30 µl RNase-free su eklendi.
- 21) Elusyon aşaması için 8000 x g' de, 20–25 C° de 1 dakika santrifüj edildi.
- 22) Tekrar 30 µl RNase-free su eklenerek 8,000 x g' de, 20–25 C° de 1 dakika santrifüj edildi.
- 23) Spin kolon atıldı, tüp içerisinde biriken RNA örneği uygun şartlarda saklandı.



Şekil 6: RNA izolasyon işleminin aşamaları

Tablo 2: Örnek Listesi

ÖRNEK NO	DOKU	
1	Karaciğer	Kontrol (1)
2	Karaciğer	Kontrol (2)
3	Karaciğer	Endotoksin (1)
4	Karaciğer	Endotoksin (2)
5	Karaciğer	Taurin (1)
6	Karaciğer	Taurin (2)
7	Karaciğer	Taurin + Endotoksin (1)
8	Karaciğer	Taurin + Endotoksin (2)
9	Kalp	Kontrol (1)
10	Kalp	Kontrol (2)
11	Kalp	Endotoksin (1)
12	Kalp	Endotoksin (2)
13	Kalp	Taurin (1)
14	Kalp	Taurin (2)
15	Kalp	Taurin + Endotoksin (1)
16	Kalp	Taurin + Endotoksin (2)
17	Beyin	Kontrol (1)
18	Beyin	Kontrol (2)
19	Beyin	Endotoksin (1)
20	Beyin	Endotoksin (2)
21	Beyin	Taurin (1)
22	Beyin	Taurin (2)
23	Beyin	Taurin + Endotoksin (1)
24	Beyin	Taurin + Endotoksin (2)
25	Böbrek	Kontrol (1)
26	Böbrek	Kontrol (2)
27	Böbrek	Endotoksin (1)
28	Böbrek	Endotoksin (2)
29	Böbrek	Taurin (1)
30	Böbrek	Taurin (2)
31	Böbrek	Taurin + Endotoksin (1)
32	Böbrek	Taurin + Endotoksin (2)

3. 2. 3 RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi ve Örneklerin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik analizleri, Shimadzu UV–1601 spektrofotometre ile 260 ve 280nm’ de yapılan absorbans ölçümleri ile gerçekleştirildi. Öncelikle içerisinde 250 µl su bulunan küvet ile sıfırlama yapıldıktan sonra 5 µl RNA örneği 245 µl PZR suyu ile 1/50 oranında dilue edilerek absorbans ölçümleri gerçekleştirildi.

Nükleik asitlerin yapısındaki bazlarda bulunan N, UV ışığını 260 nm’ de absorbe eder. Konsantrasyon arttıkça, absorbe edilen ışık miktarı artar.

Tüm hesaplamalar, 1 A260 ünite RNA = 40 µg/µl esasına göre yapıldı.

Tablo 3: RNA örneklerinin spektrofotometrik analiz sonuçları

Örnek NO	A 260	A 280	A260/280	Dilüsyon Katsayısı	RNA/A260	Konsantrasyon
1	0,302	0,161	1,875776	50	40 µg/ml	0,604 µg/ml
2	0,355	0,181	1,961326	50	40 µg/ml	0,710 µg/ml
3	0,289	0,156	1,852564	50	40 µg/ml	0,578 µg/ml
4	0,446	0,235	1,897872	50	40 µg/ml	0,892 µg/ml
5	0,430	0,223	1,928251	50	40 µg/ml	0,860 µg/ml
6	0,480	0,242	1,983471	50	40 µg/ml	0,960 µg/ml
7	0,452	0,237	1,907172	50	40 µg/ml	0,906 µg/ml
8	0,313	0,178	1,758426	50	40 µg/ml	0,626 µg/ml
9	0,112	0,059	1,898305	50	40 µg/ml	0,224 µg/ml
10	0,128	0,064	2	50	40 µg/ml	0,256 µg/ml
11	0,127	0,064	1,984375	50	40 µg/ml	0,254 µg/ml

12	0,04	0,013	3,076923	50	40 µg/ml	0,080 µg/ml
13	0,122	0,059	2,067796	50	40 µg/ml	0,244 µg/ml
14	0,155	0,079	1,962025	50	40 µg/ml	0,310 µg/ml
15	0,144	0,07	2,057143	50	40 µg/ml	0,288 µg/ml
16	0,089	0,048	1,854166	50	40 µg/ml	0,178 µg/ml
17	0,06	0,029	2,068966	50	40 µg/ml	0,120µg/ml
18	0,078	0,038	2,052631	50	40 µg/ml	0,156 µg/ml
19	0,072	0,037	1,945945	50	40 µg/ml	0,144 µg/ml
20	0,045	0,025	1,8	50	40 µg/ml	0,090 µg/ml
21	0,062	0,033	1,878787	50	40 µg/ml	0,124 µg/ml
22	0,075	0,040	1,875000	50	40 µg/ml	0,150 µg/ml
23	0,073	0,034	2,147058	50	40 µg/ml	0,146 µg/ml
24	0,044	0,023	1,913043	50	40 µg/ml	0,088 µg/ml
25	0,052	0,027	1,925926	50	40 µg/ml	0,104 µg/ml
26	0,020	0,009	2,222222	50	40 µg/ml	0,040 µg/ml
27	0,072	0,037	1,945945	50	40 µg/ml	0,144 µg/ml
28	0,024	0,011	2,181818	50	40 µg/ml	0,048 µg/ml
29	0,033	0,018	1,833333	50	40 µg/ml	0,066 µg/ml
30	0,138	0,074	1,864865	50	40 µg/ml	0,276 µg/ml
31	0,058	0,028	2,071429	50	40 µg/ml	0,116 µg/ml
32	0,119	0,062	1,919355	50	40 µg/ml	0,238 µg/ml

3. 2. 4 RNA Molekülünün Formaldehit Agaro Jelde Elektroforezi

İzolasyonu yapılan total RNA örnekleri spektrofotometrik olarak analizleri yapıldıktan sonra Formaldehit Agaroz (FA) denatüre edici jelle yüklenerek elektroforez edildi ve etidyum bromid boyaması ile ultraviyole ışıkta görüntülendi. Ökaryotik organizmaların RNA moleküllerine has 28S ve 18S rRNA bantlarının görüntülenmesi, RNA

örneğin kalitesi ve intaklığı hakkında bilgi vericidir. Görüntüleme ve Spektrofotometrik incelemeler sonucunda ileriki aşamalarda kullanılacak RNA örnekleri seçildi.

Formaldehit Agaroz (FA) jel hazırlanması (1,2%) :

1,2 gr agaroz

10 ml 10x FA tampon solüsyonu

RNase free su ile 100 ml' ye tamamlanır.

Isıtıcı blok üzerinde ısıtılarak agarozun homojen olarak erimesi sağlanır. Yaklaşık 65 C°' ye soğuduğunda içerisine 1,8 ml %37 (12,3 M) formaldehit ve 1 µl 10 mg/ml ethidium bromid eklenir. Karıştırıldıktan sonra jel tablasına dökülür. Jel katılaştıktan sonra kuyulara yüklenen örnekler 1x FA jel yürütme solüsyonu içerisinde elektroforez edilir.

- 10x FA jel tampon solüsyonu (pH 7,0)

200 mM MOPS

50 mM sodyum asetat

10 mM EDTA

- 1x FA jel yürütme solüsyonu

100 ml 10x FA jel tampon solüsyonu

20 ml 37% (12,3 M) formaldehit

880 ml RNase-free su

- Yükleme için RNA örneği hazırlanması

2 µl 5x RNA yükleme boyası

8 µl RNA örneği

karıştırılıp, 65C°' de 3–5 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sonrası hemen buz üzerine alınarak jele yüklenir.

3. 2. 5 cDNA Sentezi Öncesi RNA Örneklerinin DNase Enzimi İle Muamelesi

RNA örnekleri RT-PZR öncesi DNA kontaminasyonu sebebiyle yanlış sonuç elde edilmesini önlemek amacıyla DNA'yı parçalayan DNase enzimi ile muamele edilmiştir. Bu amaçla Invitrogen, Deoxyribonuclease I, Amplification Grade 1 U/μl (Cat. No. 18068-015) enzimi kullanılmıştır ve izlenen prosedür şöyledir:

1 μg RNA örneği üzerine;

1 ml 10 X DNase I reaksiyon tamponu (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl) , 1 μL DNase I, Amp Grade, 1 U/μl eklenir ve RNase free su ile 10 μl' ye tamamlanır.

Tüpler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilir. Enzimi inaktive etmek için 1 μL, 25 mM EDTA eklenerek 65 C°'de 10 dakika inkübe edilir.

3. 2. 6 cDNA Sentezi

Bu amaçla, DyNAmo™ cDNA Synthesis Kit (FINNZYMES) kullanılmıştır. cDNA sentezi için her örnekten 100 ng kullanılmıştır. Bu amaçla, örnekler son konsantrasyonları 20 ng/ml olacak şekilde dilue edilmişlerdir.

Tablo 4: RNA örneklerinin dilusyon hesaplamaları

Örnek no	Örnek konsantrasyon (µg/ml)	Örnek (µl)	Su (µl)	Final volüm (µl)	Final konsantrasyon (ng/µl)
2	0,710	2,8	97,2	100	20
4	0,892	2,3	97,3	100	20
6	0,960	2	98	100	20
7	0,906	2,2	97,8	100	20
10	0,256	7,8	92,2	100	20
11	0,254	7,9	92,1	100	20
14	0,310	6,4	92,6	100	20
15	0,288	7	93	100	20
18	0,156	12,8	87,2	100	20
20	0,090	22	78	100	20
21	0,124	16	84	100	20
23	0,146	13,6	86,4	100	20
25	0,104	19	81	100	20
27	0,144	13,8	86,2	100	20
30	0,276	7,2	92,8	100	20
32	0,238	8,4	91,6	100	20

Reaksiyon Karışımı (1 Reaksiyon)

2X RT Buffer	10 µL
Random Hexamer (300ng/ µL)	1 µL
M-MuLV RNase H ⁺ reverse transcr.	2 µL
RNA(20 ng/µl)	5 µL
Rnase free H ₂ O	2 µL

Reaksiyon Aşamaları

Aşama 1

Primer Uzama 25 C° 10 dak.

Aşama 2

cDNA Sentezi 40 C° 40 dak.

Aşama 3

Terminasyon 85 C° 5 dak.

Terminasyon aşamasında enzim, bir sonraki aşamada PZR reaksiyonunu etkilememesi amacıyla yüksek ısıda inaktive edilir. Sentezlenen cDNA'lar -20 C° de saklanır.

3. 2. 7 Primer Dizaynı

Genlere ait primer çiftleri, genlerin spesifik bölgeleri hedeflenerek Primer 3 (v.0. 4. 0.) primer dizayn programı kullanılarak tarafımızdan dizayn edilmiş ve dizayn edilen primerler Alpha DNA (Montreal, Quebec) firması tarafından sentezlenmiştir.¹²¹

eNOS primer dizaynı

Endotelyal NOS proteinine ait mRNA sekansı gen data bankasından sağlanmıştır.¹²²

gi|4769080:2-3622 (NOS3) mRNA, complete cds

```
ATGGGCAACTTGAAGAGTGTGGGCCAGGAGCCCGGGCCACCTTGCGGTCTGGGGCTGGGGCTGGGCCTGG
GACTGTGTGGCAAGCAGGGCCAGCCTCTCCAGCACCAGTGTGTCAGCATCGGAACCCACTCGAGCACCATC
ATCTCCACCTCTGCCCCTGCCAGCACCAGAACACAGCCCTCCGCTCACCCGGCTCCAGAAGGGCCCAAG
TTCCCTCGAGTGAAGAACTGGGAGGTGGGCAGCATTGCCTACGACACCCTCAGTGCCAGGCTCAGCAGG
ACGGGCCCTGCACCCCAAGACGCTGCCTGGGTCCCTCGTATTTCCAAGGAACTACAAGGCCGGCCCTC
CCAGTCCCCTCTGCCTCAGGAACAGCTGCTGGGTGAGGCCAGGGACTTCATCAACCAGTACTACAGCTCC
ATCAAGAGGAGTGGCTCCCAGGCCCATGAGCTTCGGGTGTCAGGAGGTGGAGGCTGAGGTGGTAGCCACAG
GAACGTACCAGCTCCGAGAGAGCGAGCTGGTGTGGAGCCAAACAGGCCTGGCGCAACGCCCCCGCTG
TGTGGGCCGGATCCAGTGGGGAAGCTGCAGGTGTTTGACGCCCGGGACTGCAGGTCAGCACAGGAGATG
TTCACTTACATCTGCAACCACATCAAGTATGCCACGAACCGGGGCAACCTCCGCTCGGCCATCACAGTGT
TCCCGCAGCGCTTCCCGGGCCGTGGAGACTTCCGCATCTGGAACAGCCAGCTAATACGCTACGCCGGCTA
CAGGCAGCAGGACGGCTCGGTGCGGGGAGACCCGCAATGTGGAGATCACAGAGCTCTGCGTGCAGCAC
GGCTGGACCCCGGGAACGGCCGCTTCGACGTGCTGCCCTGCTGCTGCAGGCCCCGACGAGCCCCCTG
AACTCTTCACTCTGCCCCCGAGCTGGTCCCTGGAGGTGCCCTGGAGCACCCGACGTTGGAATGGTTCGC
TGCCCTGGGCTGCGCTGGTATGCCCTCCCTGCCGTTTCCAACATGCTGCTGGAGATTGGGGGCTGGAG
TTCCCCGCGTCCCTTTTAGCGGCTGGTACATGAGCAGTGAGATTGGCATGAGGAACTTCTGTGACCCGC
ACCGCTACAACATCCTGGAGGACGTGGCTGTCTGCATGGACCTGGACACCCGCACCACCTCGTCCCTGTG
GAAAGACAAGGCAGCAGTGGAGATTAACGTGGCTGTGCTGCACAGTTACCAGCTGGCCAAAGTGACCATT
GTGGACCACCATGCTGCCACAGCCTCCTTCATGAAGCACCTGGAGAATGAGCAGAAGGCCCGGGGTGGTT
GCCCTGCGGACTGGGCTGGATTGTACCACCATCTCAGGCAGCCTCACTCCTGTCTTCCATCAGGAAAT
GGTCAACTATTTCTGTCCCTGCTTTCCGCTACCAGCCAGACCCCTGGAAGGGGAGTGGAACCAAGGGC
ACCGGCATCACCAGGAAGAAGACCTTCAAGGAAGTAGCCAACGCGGTGAAGATCTCCGCTCGCTCATGG
GCACGGTGATGGCTAAGCGGGTGAAGGCCACCATCCTGTACGGCTCTGAGACCGGCCGGGCCAGAGCTA
TGCACAGCAGCTGGGGAGGCTCTTCCGGAAGGCCTTCGATCCCCGGGTCTGTGCATGGATGAGTATGAT
GTGGTGTCCCTGGAGCACGAGACACTGGTATTGGTGGTGACCAGCACCTTTGGGAATGGGGATCCTCCAG
AGAATGGAGAGAGTTTTGCAGCCGCCCTGATGGAGATGTCTGGCCCTACAACAGCTCCCCTCGGCCAGA
GCAGCACAAGAGCTACAAAATCCGCTTCAACAGTGTGTCTGCTCAGACCCACTAGTGACTTCTTGGAGG
CGGAAGAGGAAGGAGTCCAGTAACACAGACAGTGCGGGGGCCCTGGGCACCCCTAGGTTCTGCGTGTGTTG
GGCTGGGCTCCCGGGCNTACCCACACTTCTGTGCCTTCGCCCGGGCGGTGGACACAAGGCTGGAGGAACT
GGGTGGGAGCGTCTACTGCAGCTGGTCCAAGGTGACGAGCTATGCGGCCAGGAAGAAGCCTTCCGTGGC
TGGGCCAGGCGGCTTTCCAGGCCGCTGTGAGACTTTCTGTGTGGGTGAGGATGCCAAGGCCGCGCCA
AGGACATATTCAGCCCCAAATGCAGCTGGAAGCGCCAGCGGTACCGGCTGAGTACCCAGGCCAGGGCCT
GCAGTTGTTGCCAGGCCTGATCCATGTGCACAGGCGCAAGATGTTCCAGGCTACGATCCTTTCGGTGAA
```

AACCTGCAAAGCAGCAAATCCACCCGGGCCACGATCCTGGTGCGCCTGGACACCGGAGGTCAGGAGGGAC
TGCAGTACCAGCCCGGGGACCACATAGGCATCTGTCCCCCAACCGGCCAGGGCTGGTGGAGGCGCTGCT
GAGCCGCGTGGAGGACCCACCACCGCTGCCGAGTCTGTGGCAGTAGAGCAGCTAGAGAAGGGCAGCCCA
GGTGGCCCTCCGCCC GGCTGGGTGCGGGACCCCGGCTGCCCCCATGTACACTGCGCCAGGCCCTCACCT
TCTTCCTGGACATCACCTCTCCGCCCAGCCCACGCCTCCTTCGACTGCTCAGCACCCCTGGCTGAAGAGCC
CAGTGAACAGCAGGAGCTGGAGACCCTCAGCCAGGACCCACGGCGCTATGAGGAGTGGAAGTGGTTCCGC
TGCCCCACGCTGCTGGAGGTTCTGGAGCAGTTCCCTCCATTGCTCTGCCTGCACCCCTCCTCCTCACCC
AGCTGCCCCTGCTCCAGCCTCGGTACTACTCAGTCAGCTCAGCACCCAGCGCCACCCCGGGGAGATCCA
CCTCACAGTGGCTGAGCTTGATACAGGACCCAGGATGGGCTGGGGCCCCTGCACTACGGGGTCTGCTCC
ACGTGGCTGAGCCAACTCAAACTGGGGACCAGGTGCCCTGCTTCATTAGAGGGGCTCCTTCCTTCGGC
TCCCACCCGATCCCAGCTTGCCCTGCATCCTGGTGGGCCCGGGCACTGGCATTGCCCCCTTCGGGGATT
CTGGCAGGAGCGGCTGCATGACATTGAGAGCAAAGGGCTGCAGCCCGCGCCCATGACTTTGGTGTTTGGC
TGTCGATGCTCCCAACTCGACCATCTCTATCGTGACGAGGTGCAGGACGCCAGCAGCGTGGGGTGTTTG
GCCGCGTCTCACCGCCTTCTCCGGGAACCAACAGCCCCAAGACCTACGTACAGGACATCCTGAAGAC
TGAGCTGGCTGCTGAGGTGCACCGCGTGCTGTGCCTCGAGCGGGGCCACATGTTTGTCTGCGGGACGTC
ACCATGGCAACCAACGTCTGCAGACAGTGCAGCGAATCCTGGCGAGCGAGGGCGACATGGAGCTGGACG
AAGCCGGGGACGTCATCGGCGTGCTGCGGGATCAGCAACGCTATCACGAGGACATTTTCGGGCTCACACT
ACGCACCCAGGAGGTGACAAGTCGCATACGCACCCAGAGCTTTTCCTTGAGGAGCGCCATCTTCGGGGT
GCAGTGCCCTGGGCGTTTCGACCTGCCAGGCCAGACACCTCCAGCCCCTGA

Primerler; Primer3 primer dizayn programı kullanılarak dizayn edildi.

```

Using 1-based sequence positions
OLIGO      start   len    tm     gc%    any    3' seq
LEFT PRIMER      27    20    59.94   55.00   3.00   0.00 CCTGGAGAATGAGCAGAAAGG
RIGHT PRIMER     533    20    59.99   55.00   5.00   3.00 CTGTTGTAGGGGCCAGACAT
SEQUENCE SIZE: 2349
INCLUDED REGION SIZE: 2349

PRODUCT SIZE: 507, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

      1 GCTGCCACAGCCTCCTTCATGAAGCACCTGGAGAATGAGCAGAAAGGCCCGGGTGGTTGC
          >>>>>>>>>>>>>>>>

     61 CCTGCGGACTGGGCTGGATTGTACCACCCATCTCAGGCAGCCTCACTCCTGTCTTCCAT

    121 CAGGAAATGGTCAACTATTTCTGTCCCCTGCTTTCCGCTACCAGCCAGACCCCTGGAAG

    181 GGGAGTGGAACCAAGGGCACCGGCATCACCAGGAAGAAGACCTTCAAGGAAGTAGCCAAC

    241 GCGGTGAAGATCTCCGCCTCGCTCATGGGCACGGTGATGGCTAAGCGGGTGAAAGGCCACC

    301 ATCCTGTACGGCTCTGAGACCGGCCCGGGCCCCAGAGCTATGCACAGCAGCTGGGGAGGCTC

    361 TTCCGGAAGGCCTTCGATCCCCGGGTCCTGTGCATGGATGAGTATGATGTGGTGTCCCTG

    421 GAGCACGAGACACTGGTATTGGTGGTGACCAGCACCTTTGGGAATGGGGATCCTCCAGAG

    481 AATGGAGAGAGTTTTTGCAGCCGCCCTGATGGAGATGTCTGGCCCCCTACAACAGCTCCCCCT
          <<<<<<<<<<<<<<<<

    541 CGGCCAGAGCAGCACAAAGAGCTACAAAAATCCGCTTCAAACAGTGTGTCTGCTCAGACCCA

```

Şekil 7: eNOS geni için primer 3 sonucu

Tablo 5: eNOS primer sekansları

eNOS	
Forward primer	CCTGGAGAATGAGCAGAAGG
Reverse primer	CTGTTGTAGGGGCCAGACAT

iNOS primer dizaynı

İndüklenebilir NOS proteinine ait mRNA sekansı gen data bankasından sağlanmıştır.¹²²

gi|2653882|gb|AF027180.1| (NOS2) mRNA, complete cds

```
CAGCCGAATTTGTACGAGACTGGGCAGTTACGGGTGGTGTGACGATCTCAAGACTAAGAACCCCACTG
CACCCAGTTTCTCTCCTTGCTCTGTGGGGCCACACAGCTCTGAGCTACCAAGAGCTGAGTTTAAATC
CAGATAAGTGACCCACTTTGTAAAGCCACAGAGATGGCCTGCCCTGGAATTTCTGTGGAAGCTCAAAT
CCAGTCGGTATGACTTGACAGAGGAAAAGGACATCAACAACAACGTGGGAAAAGCCAGTCATCTCTACAG
CCCAGAAATACAAGATGACCCCAAATACTGCAGCCCTGGCAAGCACAAAACGGATCCTCCCAGTCCCTT
ACAGGGACTGCCAAGAAGTTCCAGAATCCCAGAGCAAGCCACATAAGCCTTCACCAACCTGTTCCCAGC
ACATGAAGATCAAAAACCTGGGGCAATGGGATGATTTTGCAAGACACACTGCACACCAAGGCCAAAACGAA
CTTTACTTGCAAGCCAAAATCTTGCCTTGGGTCCGTGATGAACCCTAGAAGTATGACCAGAGGCCCCAGG
GACACGCCTATCCCTCCGGATGAGCTTCTACCTCAAGCTATTGAATTTGTCAACCAGTATTACGACTCCT
TCAAAGAGGCCAAAATAGAGGAATATCTGGCCAGAGTGGAACGGTAACAAAGGAGATAGAAACAACAGG
AACCTACCAGCTGACAGGAGATGAGCTCATCTTCGCCACCAAGCTCGCCTGGCGCAATGCCCTCGCTGC
ATCGGGAGGATACAGTGGTCCAACCTGCAGGTGTTTCGATGCCCCGAGCTGTCACACAGCCCAGGAGATGT
TTGAGCACATCTGCAGGCACGTGCGTTACTCTACCAACAACGGCAACATCAGGTCGGCCATCACCGTGTT
CCCCCAGCGGACTGATGGGAAGCATGACTTCCGTGTCTGGAATGCCCAGCTCATCCGGTACGCTGGCTAC
CAGATGCCAGATGGCACCATCCAAGGGGACCTGCCAACCTGGAGTTCACACAGCTGTGCATTGACCTGG
GCTGGAAGCCTCGCTATGGCCGCTTTGATGTGCTGCCTCTGATCCTGCAGGCTGATGGCCGTGACCCCGA
GCTCTTTGAAATTCCGCCTGATCTTGTGCTTGAGGTGCCCATGGAGCATCCCAAGTATGAGTGGTTCCAG
GACCTGGGGTTGAAGTGGTATGCTCTGCCTGCGGTGGCCAACATGCTGCTTGAGGTGGGCGGCCCTTGAGT
TCCCAGCATGCCCTTCAATGGCTGGTACATGGGCACGGAGATCGGAGTCCGGGACTTCTGTGATGCCCA
GCGCTACAACATCCTGGAGGAAGTGGGCAGGAGGATGGGCCTGGAGACGCACACGTTGGCTTCCCTCTGG
AAAGACCGTGCCGTACGGAGATCAATGTTGCTGTGCTGCATAGTTTCCAGAAGCAGAACGTGACCATCA
TGGACCACCACTCTGCAGCGGAGTCCTTCATGAAGCACATGCAGAATGAGTACCGGGCCCGTGGGGGCTG
CCCGGCGGACTGGATTTGGCTGGTCCCTCCTATTTTCAGGGAGCATCACCCCGTGTTTACCAGGAGATG
CTGAACTACATCCTGTCCCCATTCTACTACTATCAGGTGGAAGCCTGGAAGACCCATGTGTGGCAGGATG
AAACTCGGAGACCCAAAAGACGAGAGATCCCATTCAGAGTCTTGGCAAAAGCCACGCTCTTTGCCTCTCT
GCTGATGCGCAAGATGATGGCCTCCCGAGTCAGAGCCACAATCCTTTTCGCCACAGAGACCGGAAAATCA
GAAGCACTGGCCCAGGACCTAGGGGCTTGTTCAGTTGTGCTTTCAACCCCAAGGTTCTCTGCATGGATC
AGTACCAGCTGAGTAGCCTGGAGGAGGAGAAGCTCCTGCTGGTGGTGACCAGCACGTTTCGGGAACGGAGA
CTGCCCTGGCAATGGAGAGACACTGAAGAAATCCCTCTTCGTGCTGAAAAAGCTCACCAATACCTTCAGG
TATGCTGTGTTTGGCCTTGGCTCCAGTATGTATCCTCGCTTCTGTGCCTTTGCTCATGACATCGACATAA
AGTTATCCCAACTGGGGGCTCTCAGCTCACCCCAAGTGGGGGAAGGGGACGAACTCAGCGGGCAGGAGGA
CGCCTTCTGCACCTGGGCTGTGCAAACCTTCAGGCAGCCTGTGCCGATTTCGATGTTTCGAGGCAGACAC
```

CACATCACCATCCCCAAGCGCTACACCTCCAGCGTGACCTGGGAGCCATACCACTACAGGCTGGTGCAGG
ATTTCGAGCCTTTGGACCTCAACAAAGCCCTCAGTAGGATGCATGCCACGGATGTGTTACCATGCGACT
CAAGTCCCAGAAGAATCTGCAGAGTCCAAATCCAGTCGCACTACCCTCCTGATGGAACTTTCCTGTGAT
GACAGCCGAAGCCTGGCTTACCTGCCCAGGAGCACCTTGGGGTTTTCCCGTGCAACCAGCCAGCCCTGG
TCCAAGGCATCTTGGAGTGTGTGGTGGACAACCCTGGACCCACACACCGTGTGCCTTGAGGTCCTGGA
TGACAGTGGCAGCTACTGGGCCAAGGACAAGCGGCTGCCCCCTGCTCCCTGAGCCAGGCCCTCACCTAC
TTCCTGGACATCACCACACCCCGACTCAGCTGCAACTCCAGAAGCTGGCCCGGCTGGCCACGGAGCAGG
CTGAGAGACTGAGGCTGGAGAGTCTGAGCCAGCCCTCAGAGTACAACAAATGGAAGTTCACCAACAGCCC
CACGTTCTGGAGGTCCTGGAGGAGTTCCTGCTACTGCGGGTGCTGCTGCCTTCTTGCTCTCCAGCTC
CCCATTCTGAAGCCCCGATACTACTCCATCAGCTCCTCCCTGGACCACACTCCCGCAGAGGTGCACCTCA
CTGTGGCCGTGGTCACCTACCGCACCCGAGATGGTCGGGGTCCCCTGCATCATGGCGTCTGCAGCACCTG
GTTCAGTGGCTTGAAGCCCCAGGACCCAGTGCCCTGTCTCGTTCGGAGTGTCAACAGCTTCCAGCTCCCC
AAGGACCCCTCCCAGCCCTGCATCCTCATTGGGCCTGGCACAGGCATTGCACCCCTCCGCAGTTTCTGGC
AGCAGCGGCTTCACAATCTCAAACACACAGGGCTCCAGGGTGGCCGAATGACGCTCCTGTTTGGATGTG
CCACCCGGAGGAAGATCACATCTATAAGGAAGAGATGCAGGAGATGGTCCAGAAGGGGGTGTGCATGAA
GTGCACACAGCCTACTCACGGCTGCCTGGAAAGCCCCAAGGCGTATGTCCAAGACATCCTGCGGCAGCAGC
TGGCCAGGGAGGTGCTCCGTGTGCTCCACGAGGAGCCGGGCCACCTCTACGTCTGTGGGAATGTGCTCAT
GGCCAGGACGTGGCCTGCACGTTGAAGCAGCTGCTAGCTGCCAAGCTGAACTTGAACGAGGAGCAGGTT
GAGGATTACTTCTTCCAGCTCAAGAGCCAGAAGCGCTATCACGAAGATATCTTTGGTGCTGTCTTTCCCC
ATGGGGTGAAGAAGGACCGGGCAGAGCGGCCCCCGGCGACGACAAGCTCTGAGGACCCCTAGAGACTTT
CAGAGTCACCTCGTGCCTGAAGCCTACCTTTCCAGGTCCCTTGGGGATGAATTTGCAAGGTCCGGCCTGG
CCAATGGGTCTTGAAGATGAAACCTTCTTCTGGTGGCAGCACTTGAAGTGACCCCGGGGGCGCTAAG
CGACACGCTTTGTATTTAGCCGCCATGTGTACAGTATTTATGCCTCTGTATTTAAAAAACTCTGCTTCCA
AGGGCCACTTGAGCCTTCCTTGTATGATGTCTTGAAGGAAATATTTATATGAAACTAATTTTATTTTAAC
CCCCTCAA

GAPDH primer dizaynı

Gliseraldehit 3 fosfat dehidrojenaz proteinine ait mRNA sekansı gen data bankasından sağlanmıştır.¹²²

gi|194475169|gb|EU862201.1| (Gapdh) mRNA, complete cds

```
CGCGCCGCATCGGTATTCCTTCTTCCCGTGCAAGTGCAGCCGCAACCCGAGACAAGATGGTGAAGGTCGG
AGTGAACGGATTTGGCCGTATTGGACGCCTGGTCACCAGGGCTGCTTTCATGTCTGGCAAAGTGGATATT
GTAGCCATCAATGATCCCTTCATTGACCTCCAGTACATGGTCTACATGTTCCAGTATGATTCTACCCACG
GCAAGTTCCACGGCACCCTCAAGGCTGAGAATGGGAAGCTCGTCATCAATGGAAAGGCCATCACCATCTT
CCAGGAGCGAGATCCCGCCAACATCAAGTGGGGTGATGCTGGCGCCGAGTATGTAGTGAATCCACTGGT
GTCTTCACCACCATGGAGAAAGCTGGGGCTCACTTGAAGGGTGGTGCCAAAAGGGTCATCATCTCTGCCC
CTTCTGCTGATGCCCTATGTTTCGTGATGGGCGTGAATCACGAGAAGTACGACAAGTCCCTCAAGATTGT
CAGCAATGCTTCCTGCACCACCAACTGCTTAGCCCCACTGGCCAAAGTCATCCATGACAACCTCGGCATT
GTGGAGGGGACTCATGACCACAGTCCATGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCTCTGGGA
AGCTGTGGCGTGATGGCCGTGGCGCTGCCCAGAACATCATCCCCGCATCCACTGGTGTGCCAAGGCTGT
GGGCAAGGTCATCCAGAGCTGAATGGGAAGCTCACAGGTATGGCCTTCCGTGTACCCACACCTAATGTG
TCGTTGTGGATCTGACCTGCCGCCTGGAGAAACCGGCCAAATACGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGC
AGGCATCAGAGGGCTCCCTCAAAGGCATCTTGGGCTACACCGAGGACCAGGTTGTGTCTGTGACTTCAA
CAGTGACAGCCATTCTTCCACTTTTGACGCTGGGGCTGGCATCGCCCTCAATGACCACTTTGTCAAGCTC
GTTTCTTGGTATGACAATGAGTTCGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGTCCACATGGCCTCCA
AGGAGTAAGTGGACCCACCTGAGCCCAGCGAGCCAGTGAGACCATGGAGACTAGGCCTCACTGCAGAA
GTCATGCCCCACTCTAAGCCCCAACACTGAGAATCTCCCCTCCTCCAGCTTCCAACCCAGGCCCCCTG
GAGAAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCCTGGCTCATTGCACACCATCAATAAAGCCTGCTG
```


MPO primer dizaynı

Myeloperoksidaz (MPO) proteinine ait mRNA sekansı gen data bankasından sağlanmıştır.¹²²

>gi|157820284|ref|NM_001107036.1|myeloperoxidase (Mpo),nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA

```
AGCCTGTAGCCCCAGGGTCCTCTTTCCTGAGAAGCCTAACTGTCTCCAGCCAGATTTCTGTCTCCTCA
GCTCCACTGAGAACTGGGGGCTTCTACCAGGGTTGGAGTGGGGGTGACTCTGAGGCCCTCAAGGGGTC
AGCGTTGCTACATCTTCCCTGTGACCCCATCTCTCCATGTGGCTACCCTACTTCCATAACTTCTTAGC
CTTTGCTCCCTAAATTTAGGTTCTTTTCAAAGGAATTGGGACGCTCAGTTTAACCAACATTTTGAGAGGC
TAGTTGCTTGTGCTCTCTGTGAGTAGTAGCTCTGATCCATCCCCCTGTCCATCCCTCCACTTCATGGGCC
CCTCTCTGGGCACCCCTAACCCAGTGGGGGAGGAGAGTCTAGTCTTAGGATAGGTCCATCTCTTTTAG
GTCAGCCCGCCCCAGCTCAGAAGGCATAAAAACCCGTTGTGAGTGAGAGGTGTTGACAGTGTCAGATGA
AGCTTTTTTTTGGCCTTGGCAGGCCTCCTGGCCCCCTGGCCATGCTTCAGACTTCCACTGGTGCCACTCC
AGCGCTCCCGGGGAAGTGGCGAACTCAGTGGTGCTGGACTGCATGGAGGAGGCCAAGCGGTGGTGAAC
AAAGCCTACAAGGAGCGGAGAGAAAGCATCAAGCAGAGTCTTCGAAGTGGCTCCGCCAGCCCTATGGAAC
TCCTATCGTATTTCAAGCAGCCGGTGGCGGGACACAGGACAGCTGTGAGGGCTGCCGACTATCTGCACGT
GGCCCTGGACCTGCTGAAGAGGAAGCTGCAGCCCCTGTGGCCACGGCCTTTCATGTGACAGGGGACATG
CGCTCCAGCGAGATGCCAGAGCTCACCTCCATGCACACCCTCTTCGTGCGAGAGCATAACCGTCTGGCCA
CAGAGCTCAAGCGCCTGAATCCTCGCTGGAATGGGGAGAAGCTTTACCAGGAGGCCCGGAAGATTGTGGG
GGCCATGGTCCAGATCATCACATACCGAGACTACCTGCCCTTGGTGTTGGGGCCAGCAGCCATGAAGAAG
TACCTACCCAGTACCGATCCTACAATGACTCAGTAGACCCTCGGATCGCCAATGTCTTCACCAACGCTT
TCCGTTACGGCCACACCCTCATCCAACCCTTCATGTTCCGCCTGGACAATCAGTACCGGTCCACAGGACC
CAACCCCGTGTCCCACTCAGCAGGGTCTTTTTTGGCAGCTGGAGAGTTGTGCTGGAAGGTGGCATTGAC
CCCATCTCCGAGGCCTCATGGCTACTCCTGCCAAACTGAATCGCCAGAACCAATTGCGGTGGATGAGA
TCCGGGAGCGACTGTTTGAGCAGGTCATGAGGATAGGTCTTGACTTACCTGCCCTTAACATGCAGCGCAG
CCGGGATCATGGCCTCCCGGGATACAATGCCTGGAGACGCTTCTGTGGGCTTCCACAGCCAGCACAGTG
GGTGAGCTCGGCACGGTGCTGAAGAACCTGGAGCTGGCACGGAAGCTGATGGCACAGTATGGCACGCCCCA
ACAACATTGACATCTGGATGGGCGGTGTGTCCGAGCCCCCTAGAGCCCAATGGCCGCGTAGGCCAGCTCCT
TGCTGCTCATTGGCACTCAGTTTAGGAAGTACGGGATGGCGATAGGTTTTGGTGGGAGAACCCGGGT
GTGTTGAGTAAACAGCAGAGACAGGCCTTGGCTACCATCTCCTTGCCCCGCATCATCTGTGACAACACTG
GCATCACTACCGTGTCTAAGAACAACATCTTCATGTCCAACACACCCCCGAGACTTTGTGAGCTGTAA
CACCCTTCCTAAACTGAATCTGGCTTCTGGAAGGAGACCTAGAGGCCGGGAGTCTGCCCGGAGAGGAAC
GGAGGCCATTGGCCTTTTTTGTGCTATCTGTACCTGAGGTTTACACTAATAAAGCATGGTGGATGGGGA
```


XO primer dizaynı

Ksantin oksidaz / dehidrojenaz (XO) proteinine ait mRNA sekansı gen data bankasından sağlanmıştır¹²².

gi|8394543|ref|NM_017154.1| xanthine oxidase (XO), mRNA

```
AGAGCTCAGTGACTCCAGCAGCCACGATGACTGCGGATGAGTTGGTCTTCTTTGTGAATGGCAAAAAGGT
GGTGGAGAAAAATGCGGACCCTGAAACAACACTTCTGGTCTACCTGAGAAGAAAGTTGGGGCTATGTGGG
ACCAAGCTTGGCTGTGGAGAAGGTGGCTGTGGGGCATGCACCGTGATGATCTCCAAGTATGACCGTCTTC
AGAACAAGATTGTTTCTGTCAATGCCTGCTTGGCTCCCATCTGCTCCTTGACCATGTTGCTGT
GACCACCGTGGAAAGGCATAGGAAACACCCAGAAGCTGCATCCTGTACAGGAGAGAATTGCCAGAAGCCAT
GGTTCCCAAGTGTGGGTTCTGCACTCCTGGCATTGTCATGAGTATGTACACACTGCTCCGGAACCAAGCCTG
AGCCTACTGTTGAGGAGATCGAGAATGCCTTCCAAGGAAACCTCTGTCGCTGTACAGGCTACAGACCCAT
CCTCCAGGGATTCCGGACCTTTGCCAAGGATGGTGGGTGCTGTGGAGGGAGTGGAACAACCCAACTGC
TGTATGAACCAGACGAAAGACCAACCGTTTCTCTCACCTTCTTTATTCAACCCAGAGGATTTCAAAC
CTTTAGATCCCACGCAAGAGCCCATCTTCCCCCAGAGTTGCTGAGGCTGAAAGACACTCCCCAGAAGAA
GCTGCGTTTTGAAGGGGAACGTGTGACCTGGATCCAGGCTTCAACTATGGAGGAGCTGCTTGACCTGAAA
GCTCAGCACCCCTGATGCCAAGCTGGTGGTGGGAAACACAGAGATAGGCATTGAAATGAAATTTAAGAATA
TGCTATTTCTCTGATCGTCTGCCCAGCCTGGATCCCTGAAGTGAATTCAGTGGTGCATGGGCCCTGAGGG
AATCTCCTTCGGAGCTTCTTGCCCCCTTAGCTTGGTGGAAAGTGTCTGCGGAGGAGATTGCTAAACTT
CCAGAGCAAAAGACAGAGGTGTTTCAAGGCGTGATGGAGCAGCTGCGCTGGTTTGCCGGCAAGCAGGTCA
AGTCCGTGGCGTCCATCGGAGGGAACATCATCACTGCCAGCCCCATCTCTGACCTCAACCTGTGTTTCA
GGCCAGTGGAGCCAAGCTGACTCTGGTGTCTAGAGGTACCAGGAGAACTGTTCCGATGGATCATACCTTC
TTCCCTGGCTACAGAAAGACTCTGCTCAGACCAGAGGAGATATTGCTGTCCATCGAGATCCCCATAGCA
AGGAGGGAGAGTTTTTCTCAGCCTTCAAGCAGGCCTCCAGGAGGGAAGATGACATTGCCAAGGTGACTAG
TGGCATGAGAGTCTGTTCAAACCGGGGACCATTGAAGTGCAGGAACTGTCCCTTTGCTTCGGAGGGATG
GCCGACAGAACTATCTCAGCCCTCAAGACCACTCCGAAGCAGCTATCGAAGTCTTGAATGAGGAGCTGC
TGCAGAGCGTGTGTGCCGGCTTGGCAGAGGAGCTGCAGCTGGCCCCCGATGCCCTGGTGGTATGGTGGA
ATTCCGGCGCACCCCTCACCTCAGCTTCTTCTTCAAGTTCTACCTGACAGTGCTCCAGAAGCTGGGCAGA
GCGGACCTTGAGGATATGTGTGGTAAACTGGACCCACCTTTGCCAGTGCCACCCTGCTCTTTCAGAAGG
ACCCTCCAGCTAATGTCCAGCTTTTCCAAGAGGTGCCAAAGGATCAGTCTGAGGAGGACATGGTGGGCCG
GCCCCCTGCCTCACCTGGCGGCAACATGCAGGCATCGGGAGAGGCCGTGTACTGTGATGACATTCCCCGC
TATGAGAATGAGCTCTCTCTCAGGCTGGTCACCAGCACCCGGGCGCATGCTAAAATCACGTCCATCGACA
CTTCAGAAGCCAAGAAGGTGCCAGGGTTTGTGTTGCTTCTCACCGCAGAGGATGTCCTAATAGTAATGC
AACCGGCTTTTCAATGATGAACTGTCTTTGCGAAGGATGAGGTTACTTGTGTTGGGCACATCATTGGT
GCTGTGGTCGCTGACACCCAGAACACGCACAGAGAGCTGCGAGAGGGGTGAAAATCACCTATGAAGATC
TTCCAGCCATTATCACAATCCAGGATGCTATAAAACAACCTCCTTTTATGGCTCTGAGATAAAAATTGA
GAAAGGAGATCTCAAGAAAGGCTTTTCAGAAGCTGACAATGTTGTCTCAGGAGAGTTGTATATCGGTGGC
```

CAGGAGCACTTCTACCTGGAGACCAACTGCACCATTGCCGTGCCAAAAGGCGAGGCAGGCGAGATGGAGC
TGTTTCGTGAGCACACAGAACACCATGAAAACCCAGAGCTTTGTTGCAAAAATGTTGGGCGTTCCGGACAA
CAGAATCGTAGTCCGAGTGAAGAGGATGGGTGGAGGCTTTGGAGGGAAGGAGACCCGGAGCACTGTGGTG
TCCACAGCACTGGCCTTGGCTGCACACAAGACTGGCCGGCCCCGTACGTTGCATGTTGGACCGAGATGAGG
ACATGCTGATAACTGGTGGCAGACATCCCTTCCTGGCTAAATACAAGGTTGGCTTCATGAAGACTGGGAC
TGTAAGTGGCTCTCGAGGTGGCTCACTTCAGCAATGGTGGTAACACTGAGGATCTCTCTCGGAGTATAATG
GAACGAGCTTTGTTCCACATGGATAACGCCTATAAGATCCCCAACATTCGAGGCACTGGGAGGATTTGCA
AGACTAATCTGCCCTCCAACACAGCCTTCAGAGGTTTTGGGGTCTCAGGGGATGCTAATCGCAGAATA
CTGGATGAGCGAGGTGCCATAACCTGTGGGCTGCCTGCAGAGGAGGTACGGAGGAAAAACATGTACAAA
GAAGGGGACCTGACTCACTTCAACCAGAAGCTGGAGGGGTTACCTTGCCAGGTGCTGGGATGAATGCA
TCGCCAGCTCTCAGTATCTTGCTCGCAAGAGGGAAGTGGAGAAATTCAACAGGGAGAATTGTTGGAAAAA
GAGAGGGCTGTGTATAATCCCAACTAAGTTTGAATAAGCTTTACACTTCCTTTTCTGAACCAGGGAGGC
GCTCTGGTTCACGTGTACACTGATGGTTCCGTGCTGTTGACCCATGGAGGGACTGAGATGGGCCAAGGCC
TTCACACCAAGATGGTTCAGGTGGCCAGCAGAGCTCTGAAAATCCCCACCTCCAAGATTCATATAAGTGA
GACAAGCACTAACACCGTCCCCAACACTTCTCCACAGCTGCCTCTGCCAGTGCTGACCTCAATGGACAG
GGTGTATGAAAGCATGCCAGACCATACTGAAAAGGCTGGAACCTTTCAAGAAGAAGAAACCCACCGGCC
CCTGGGAGGCATGGGTGATGGACGCCTATACGAGCGCAGTGAGTTTGTCCGCAACTGGATTTTATAAGAC
ACCCAACCTTGGCTACAGCTTTGAGACAACTCCGGAATCCCTTCCACTATTTAGTTATGGGGTGGCT
TGCTCTGAAGTAGAAATTGACTGCTTAACAGGGGATCATAAGAATCTCCGTACGGATATCGTCATGGATG
TTGGTTCCAGCTTGAATCCTGCCATTGATATTGGACAAGTAGAGGGGGCATTGTCCAGGGCCTTGGTCT
CTTCACTATGGAGGAGCTGCACTACTCCCCTGAGGGGAGCCTGCATACTCGTGGCCCCAGTACCTACAAA
ATCCCTGCATTTGGTAGCATCCCCATTGAGTTCAGAGTATCCCTACTCCGGGACTGCCCAACAAGAGGG
CCATCTATGCATCCAAGGCTGTTGGGGAGCCACCTCTTTTCTGGCTTCCTCTATCTTCTTTGCCATCAA
AGATGCCATTTCGTGCAGCTCGAGCTCAGCACGGAGATAACGCAAAACAACTTTTCCAGCTAGACAGCCCT
GCCACTCCGGAGAAGATCCGAAACGCCTGTGTGGACCAGTTCACCACCCTGTGTGCTACTGGAGTACCAG
AAAACGTAAATCCTGGTCTGTGAGGATCTGAAGAGAAGGTCTCCACCATTGGTTTGTACCGCACCAGGA
TTCCTTGGAGCCACAAGCACATCCTGTAGTATCCAGATTTCCGCATGCCGCGTGGGACTCAGCAGGATGA
CATTTTCAGGAAGATGGACATTTTGACCCAAATAAGAGCTGCAAAACAACCAATAAGCAAATGGGGAG

3. 2. 8 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

RNA örneklerinden elde edilen cDNA'lar üzerinde iNOS, eNOS, XOD, MPO ve GAPDH genleri için spesifik olarak dizayn edilmiş primerler kullanılarak ilgili genlere ait fragmentler çoğaltılmıştır. Her primer çifti için, primerlerin T_m değerleri ve ürün boyları göz önünde bulundurularak optimal annealing sıcaklıkları ve PZR koşulları düzenlenmiştir.

Primer çiftleri için Optimase Protocol Writer programı tarafından önerilen reaksiyon koşulları temel alınıp, optimize edilerek son PZR koşulları belirlenmiştir.¹²³

eNOS PZR Koşulları

Optimase ProtocolWriter™

The following PCR protocol is designed for use with Optimase, the high-fidelity polymerase product from Transgenomic.

Forward primer sequence: CCTGGAGAATGAGCAGAAGG (T_m = 56.3°C)
Reverse primer sequence: CTGTTGTAGGGGCCAGACAT (T_m = 56.3°C)
PCR product length: 507 bp
Protocol type: Simple 3-step PCR protocol

Step 1: 95°C, 2 min.
Step 2: 95°C, 30 sec.
Step 3: 59.3°C, 30 sec.
Step 4: 72°C, 60.0 sec.
Step 5: Repeat steps 2-4 29 more times
Step 6: 72°C, 5 min.
Step 7: 4°C, forever

Purchase of Optimase is accompanied by a limited license to use it in the PCR process for research and development purposes, in conjunction with a thermal cycler from Biosystems, or as purchased in an authorized thermocycler.

Information provided on this website is for information purposes and for research uses only. Transgenomic does not advocate that anyone should use any of these protocols without first making sure that it is not patented before using these. Although Transgenomic publishes this website to provide information to the dHPLC research community, we cannot be held responsible for any patent infringement.

Şekil 12: eNOS PZR koşulları

Tablo 10: eNOS PZR reaksiyon bileşenleri

PZR BİLEŞENLERİ	VOLUM	FINAL KONSANTRASYON
10 X PZR Buffer	2 µl	1 X
MgCl ₂ (25 mM/ µl)	2 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM/ µl)	0,8 µl	0,4 mM
eNOS Fw Primer (10 pmol / µl)	1 µl	0,5 µM
eNOS Rev Primer (10 pmol / µl)	1 µl	0,5 µM
Taq DNA Polimeraz (5U / µl)	0.2 µl	1 U
RNase free su	10 µl	
cDNA	3 µl	
TOTAL	20 µl	

Thermalcycler programı:

95 C°	2 dak.	
95 C°	30 san.	} 35 siklus
59 C°	45 san.	
72 C°	1 dak.	
72 C°	5 dak.	

PZR reaksiyonunu takiben, PZR ürünleri %2'lik agaroz jele 10 ml yüklenerek 100 voltta 10 dakika elektroforez edildi ve görüntülendi. DNA boy markerı olarak Gene Ruler 100 bp DNA ladder (Fermentas, SM0243) kullanıldı.

iNOS PZR Koşulları

Optimase ProtocolWriter™

The following PCR protocol is designed for use with Optimase, the high-fidelity polymerase product from Transgenomic.

Forward primer sequence: CCAAGGTTCTCTGCATGGAT (Tm = 54.2°C)
Reverse primer sequence: CCAAGGTTCTCTGCATGGAT (Tm = 54.2°C)
PCR product length: 369 bp
Protocol type: Simple 3-step PCR protocol

Step 1: 95°C, 2 min.
Step 2: 95°C, 30 sec.
Step 3: 57.2°C, 30 sec.
Step 4: 72°C, 40.0 sec.
Step 5: Repeat steps 2-4 29 more times
Step 6: 72°C, 5 min.
Step 7: 4°C, forever

Purchase of Optimase is accompanied by a limited license to use it in the PCR process for research and development purposes, in conjunction with a thermal cycler from Biosystems, or as purchased in an authorized thermocycler.

Information provided on this website is for information purposes and for research uses only. Transgenomic does not advocate that anyone should use any of these products without first making sure that it is not patented before using these. Although Transgenomic publishes this website to provide information to the dHPLC research community, we cannot be held responsible for any patent infringement.

Şekil 13: iNOS PZR koşulları

Tablo 11: iNOS PZR reaksiyon bileşenleri

PZR BİLEŞENLERİ	VOLUM	FINAL KONSANTRASYON
10 X PZR Buffer	2 µl	1 X
MgCl ₂ (25 mM/ µl)	2 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM/ µl)	0,8 µl	0,4 mM
iNOS Fw Primer (10 pmol / µl)	1 µl	0,5 µM
iNOS Rev Primer (10 pmol / µl)	1 µl	0,5 µM
Taq DNA Polimeraz (5U / µl)	0.2 µl	1 U
RNase free su	10 µl	
cDNA	3 µl	
TOTAL	20 µl	

Thermalcycler programı:

95 C°	2 dak.		
95 C°	30 san.	}	35 siklus
57 C°	45 san.		
72 C°	1 dak.		
72 C°	5 dak.		

PZR reaksiyonunu takiben, PZR ürünleri %2'lik agaroz jele 10 ml yüklenerek 100 voltta 10 dakika elektroforez edildi ve görüntülendi. DNA boy markerı olarak Gene Ruler 100 bp DNA ladder (Fermentas, SM0243) kullanıldı.

GAPDH PZR Koşulları

Optimase ProtocolWriter™

The following PCR protocol is designed for use with Optimase, the high-fidelity polymerase product from Transgenomic.

Forward primer sequence: GAGCTGAATGGGAAGCTCAC (Tm = 56.3°C)
Reverse primer sequence: TGGGGTCCACTTACTCCTTG (Tm = 56.3°C)
PCR product length: 568 bp
Protocol type: Simple 3-step PCR protocol

Step 1: 95°C, 2 min.
Step 2: 95°C, 30 sec.
Step 3: 59.3°C, 30 sec.
Step 4: 72°C, 60.0 sec.
Step 5: Repeat steps 2-4 29 more times
Step 6: 72°C, 5 min.
Step 7: 4°C, forever

Purchase of Optimase is accompanied by a limited license to use it in the PCR process for research and development purposes, in conjunction with a thermal cycler, or as purchased in an authorized thermocycler.

Information provided on this website is for information purposes and for research uses only. Transgenomic does not advocate that anyone should use any of these sequences without first making sure that it is not patented before using these. Although Transgenomic publishes this website to provide information to the dHPLC research community, we do not

Şekil 14: GAPDH PZR koşulları

Tablo 12: GAPDH PZR reaksiyon bileşenleri

PZR BİLEŞENLERİ	VOLUM	FINAL KONSANTRASYON
10 X PZR Buffer	2 µl	1 X
MgCl ₂ (25 mM/ µl)	2 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM/ µl)	0,8 µl	0,4 mM
GAPDH Fw Primer (10 pmol / µl)	1 µl	0,5 µM
GAPDH Rev Primer (10 pmol / µl)	1 µl	0,5 µM
Taq DNA Polimeraz (5U / µl)	0.2 µl	1 U
RNase free su	10 µl	
cDNA	3 µl	
TOTAL	20 µl	

Thermalcycler programı:

95 C°	2 dak.		
95 C°	30 san.	}	35 siklus
59 C°	45 san.		
72 C°	1 dak.		
72 C°	5 dak.		

PZR reaksiyonunu takiben, PZR ürünleri %2'lik agaroz jele 10 ml yüklenerek 100 voltta 10 dakika elektroforez edildi ve görüntülendi. DNA boy markeri olarak Gene Ruler 100 bp DNA ladder (Fermentas, SM0243) kullanıldı.

MPO PZR Koşulları

Optimase ProtocolWriter™

The following PCR protocol is designed for use with Optimase, the high-fidelity polymerase product from Transgenomic.

Forward primer sequence: TTTTGGCCAGCTGGAGAGTT (Tm = 52.2°C)

Reverse primer sequence: GCAAGGAGATGGTAGCCAA (Tm = 53.7°C)

PCR product length: 507 bp

Protocol type: Simple 3-step PCR protocol

Step 1: 95°C, 2 min.
Step 2: 95°C, 30 sec.
Step 3: 56.0°C, 30 sec.
Step 4: 72°C, 60.0 sec.
Step 5: Repeat steps 2-4 29 more times
Step 6: 72°C, 5 min.
Step 7: 4°C, forever

Purchase of Optimase is accompanied by a limited license to use it in the PCR process for research and development purposes, in conjunction with a thermal cycler, or as purchased in an authorized thermocycler.

Information provided on this website is for information purposes and for research uses only. Transgenomic does not advocate that anyone should use any of these products without first making sure that it is not patented before using these. Although Transgenomic publishes this website to provide information to the dHPLC research community, we cannot be held responsible for any patent infringement.

Şekil 15: MPO PZR koşulları

Tablo 13: MPO PZR reaksiyon bileşenleri

PZR BİLEŞENLERİ	VOLUM	FINAL KONSANTRASYON
10 X PZR Buffer	2 µl	1 X
MgCl ₂ (25 mM/ µl)	2 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM/ µl)	0,8 µl	0,4 mM
MPO Fw Primer (10 pmol / µl)	1 µl	0,5 µM
MPO Rev Primer (10 pmol / µl)	1 µl	0,5 µM
Taq DNA Polimeraz (5U / µl)	0.2 µl	1 U
RNase free su	10 µl	
cDNA	3 µl	
TOTAL	20 µl	

Thermalcycler programı:

95 C°	2 dak.		
95 C°	30 san.	}	35 siklus
57 C°	45 san.		
72 C°	1 dak.		
72 C°	5 dak.		

PZR reaksiyonunu takiben, PZR ürünleri %2'lik agaroz jele 10 ml yüklenerek 100 voltta 10 dakika elektroforez edildi ve görüntülendi.

XO PZR Koşulları

Optimase ProtocolWriter™

The following PCR protocol is designed for use with Optimase, the high-fidelity polymerase product from Transgenomic.

Forward primer sequence: CTCAGCCCTCAAGACCACT (Tm = 55.9°C)
Reverse primer sequence: TGGCTTCTGAAGTGTCGATG (Tm = 54.2°C)
PCR product length: 488 bp
Protocol type: Simple 3-step PCR protocol

Step 1: 95°C, 2 min.
Step 2: 95°C, 30 sec.
Step 3: 58.1°C, 30 sec.
Step 4: 72°C, 50.0 sec.
Step 5: Repeat steps 2-4 29 more times
Step 6: 72°C, 5 min.
Step 7: 4°C, forever

Purchase of Optimase is accompanied by a limited license to use it in the PCR process for research and development purposes, in conjunction with a thermal cycler, Biosystems, or as purchased in an authorized thermocycler.

Information provided on this website is for information purposes and for research uses only. Transgenomic does not advocate that anyone should use any of these products without first making sure that it is not patented before using these. Although Transgenomic publishes this website to provide information to the dHPLC research community, we cannot be held responsible for any patent infringement.

Şekil 16: XO PZR koşulları

Tablo 14: XO PZR reaksiyon bileşenleri

PZR BİLEŞENLERİ	VOLUM	FINAL KONSANTRASYON
10 X PZR Buffer	2 µl	1 X
MgCl ₂ (25 mM/ µl)	2 µl	2,5 mM
dNTP (10 mM/ µl)	0,8 µl	0,4 mM
XO Fw Primer (10 pmol / µl)	1 µl	0,5 µM
XO Rev Primer (10 pmol / µl)	1 µl	0,5 µM
Taq DNA Polimeraz (5U / µl)	0.2 µl	1 U
RNase free su	10 µl	
cDNA	3 µl	
TOTAL	20 µl	

Thermalcycler programı:

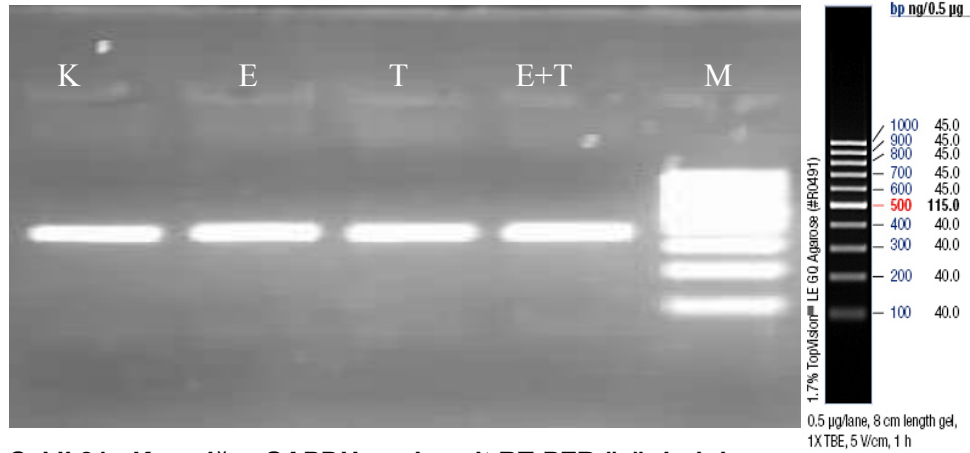
95 C°	2 dak.	
95 C°	30 san.	} 35 siklus
57 C°	45 san.	
72 C°	1 dak.	
72 C°	5 dak.	

PZR reaksiyonunu takiben, PZR ürünleri %2'lik agaroz jele 10 ml yüklenerek 100 voltta 10 dakika elektroforez edildi ve görüntülendi. DNA boy markeri olarak Gene Ruler 100 bp DNA ladder (Fermentas, SM0243) kullanıldı.

4.2 RT-PZR Sonuçları

4.2.1 GAPDH enziminin karaciğer, kalp, beyin ve böbrek doku örneklerinde kontrol, endotoksin, taurin ve endotoksin+taurin gruplarına ait RT-PZR sonuçları

Karaciğer dokusunda GAPDH enzimi ekspresyon sonucu



Şekil 21: Karaciğer GAPDH genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Karaciğer dokusuna ait kontrol grubu örneklerde ve endotoksin, taurin ve endotoksin + taurin uygulanmış örnek gruplarında GAPDH ekspresyonunun sabit olduğu görüldü.

Kalp dokusunda GAPDH enzimi ekspresyon sonucu

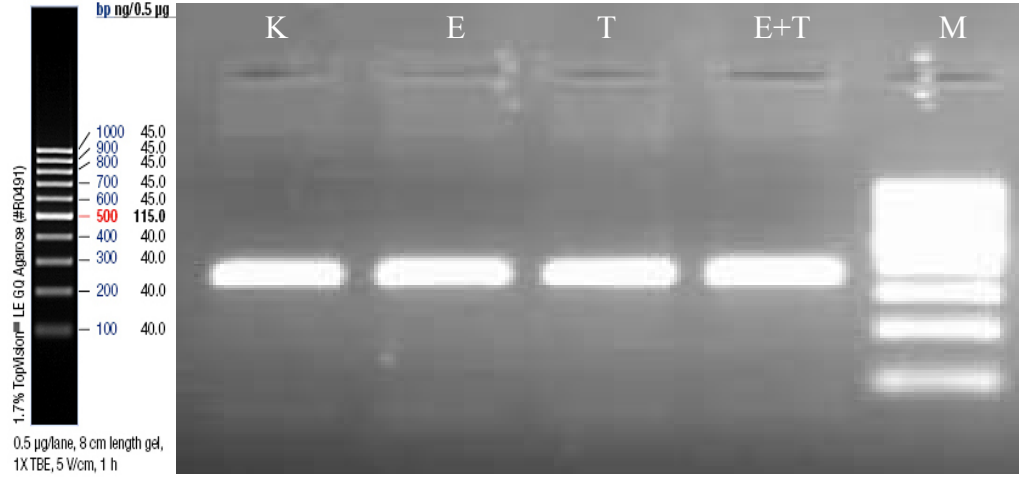


Şekil 22: Kalp GAPDH genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Kalp dokusuna ait kontrol grubu örneklerde ve endotoksin, taurin ve endotoksin + taurin uygulanmış örnek gruplarında GAPDH ekspresyonunun sabit olduğu görüldü.

Beyin dokusunda GAPDH enzimi ekspresyon sonucu

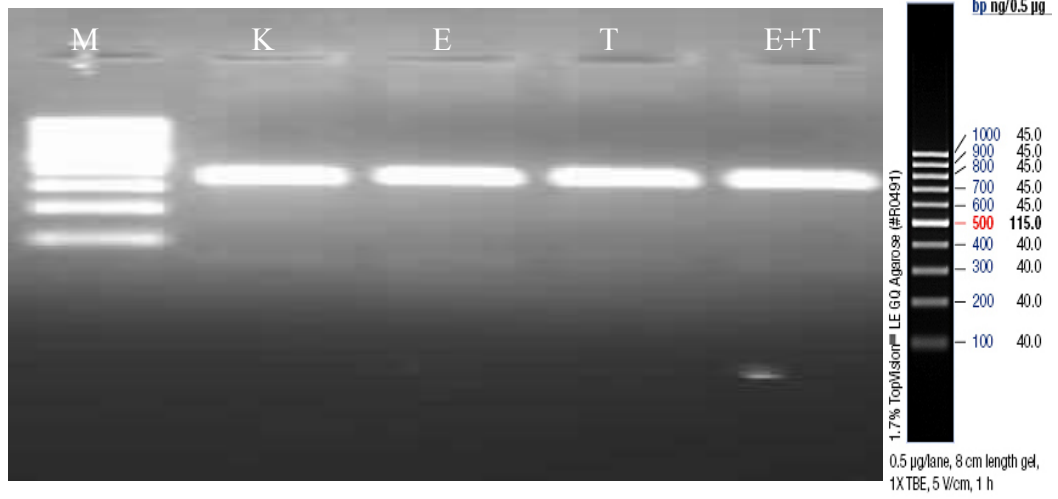


Şekil 23: Beyin GAPDH genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Beyin dokusuna ait kontrol grubu örneklerde ve endotoksin, taurin ve endotoksin + taurin uygulanmış örnek gruplarında GAPDH ekspresyonunun sabit olduğu görüldü.

Böbrek dokusunda GAPDH enzimi ekspresyon sonucu



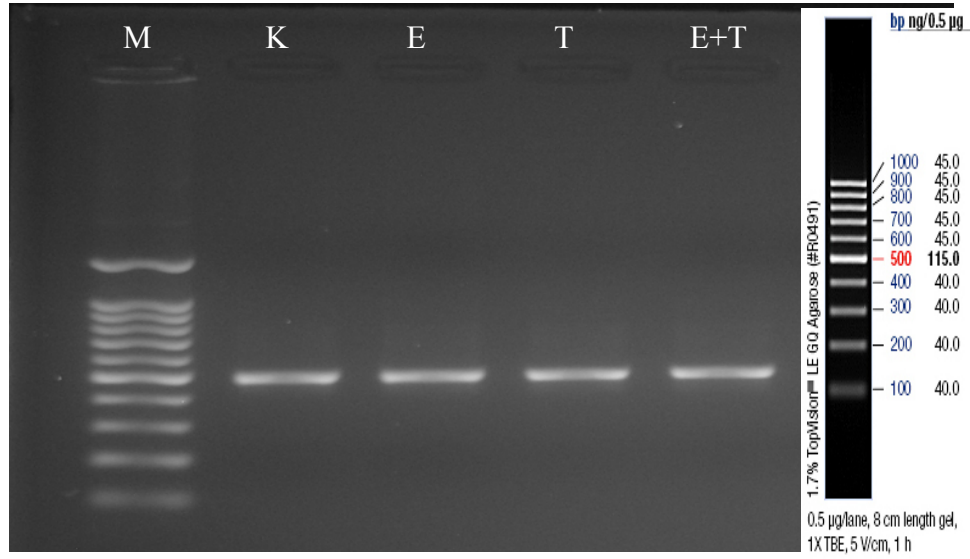
Şekil 24: Böbrek GAPDH genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Böbrek dokusuna ait kontrol grubu örneklerde ve endotoksin, taurin ve endotoksin + taurin uygulanmış örnek gruplarında GAPDH ekspresyonunun sabit olduğu görüldü.

4.2.2 eNOS enziminin karaciğer, kalp, beyin ve böbrek doku örneklerinde kontrol, endotoksin, taurin ve endotoksin+ taurin gruplarına ait RT-PZR sonuçları

Karaciğer dokusunda eNOS enzimi ekspresyon sonucu

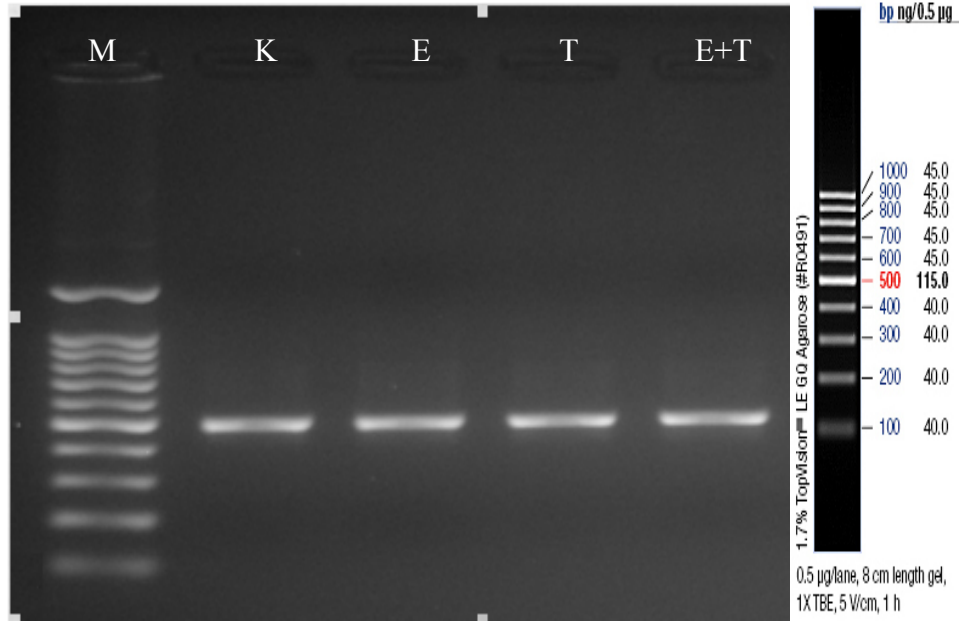


Şekil 25: Karaciğer eNOS genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Karaciğer dokusuna ait kontrol grubu örneklerde ve endotoksin, taurin ve endotoksin + taurin uygulanmış örnek gruplarında eNOS ekspresyonunun var olduğu ve değişmediği görüldü.

Kalp dokusunda eNOS enzimi ekspresyon sonucu

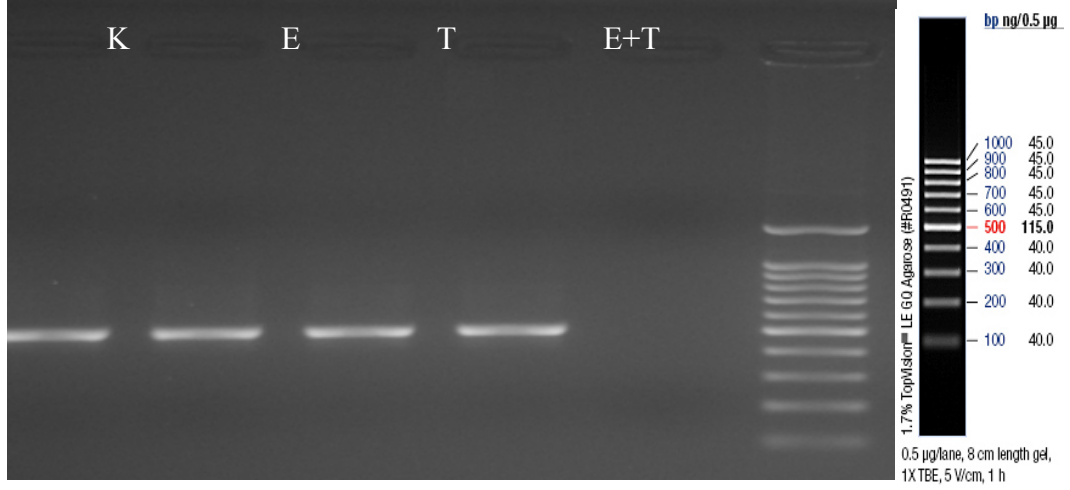


Şekil 26: Kalp eNOS genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Kalp dokusuna ait kontrol grubu örneklerde ve endotoksin, taurin ve endotoksin + taurin uygulanmış örnek gruplarında eNOS ekspresyonunun var olduğu ve değişmediği görüldü.

Beyin dokusunda eNOS enzimi ekspresyon sonucu

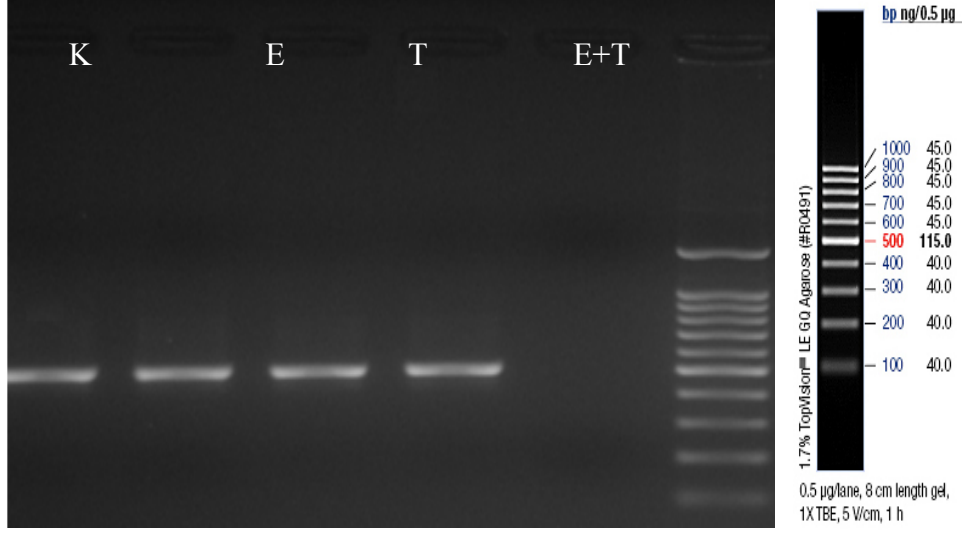


Şekil 27: Beyin eNOS genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Beyin dokusuna ait kontrol grubu örneklerde ve endotoksin, taurin ve endotoksin + taurin uygulanmış örnek gruplarında eNOS ekspresyonunun var olduğu ve değişmediği görüldü..

Böbrek dokusunda eNOS enzimi ekspresyon sonucu



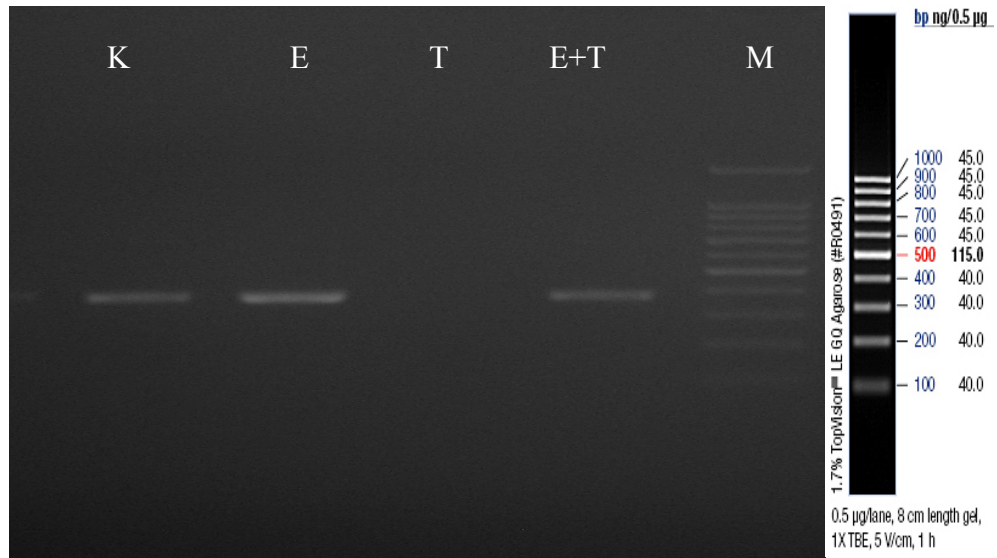
Şekil 28: Böbrek eNOS genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Böbrek dokusuna ait kontrol grubu örneklerde ve endotoksin, taurin ve endotoksin + taurin uygulanmış örnek gruplarında eNOS ekspresyonunun var olduğu ve değişmediği görüldü.

4.2.3 iNOS enziminin karaciğer, kalp, beyin ve böbrek doku örneklerinde kontrol, endotoksin, taurin ve endotoksin+ taurin gruplarına ait RT-PZR sonuçları

Karaciğer dokusunda iNOS enzimi ekspresyon sonucu

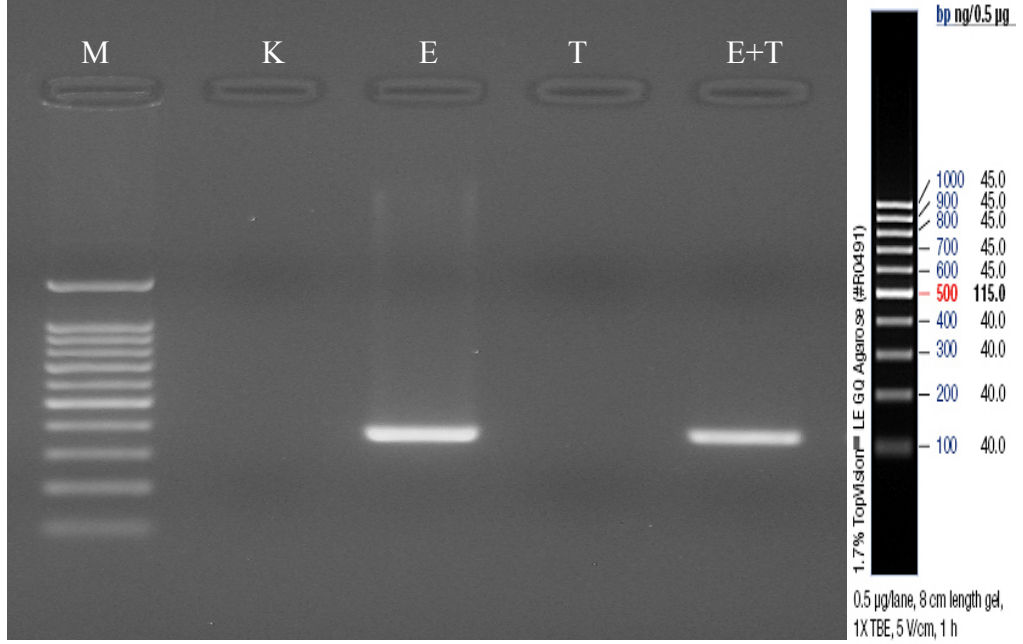


Şekil 29: Karaciğer iNOS genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, **E:** Endotoksin uygulanmış örnek, **T:** Taurin uygulanmış örnek, **E+T:** Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, **M:** Size Marker

SONUÇ: Karaciğer dokusuna ait kontrol grubu örneklerde bir miktar iNOS ekspresyonu bulunduğu tespit edildi. LPS uygulaması sonrası oluşan deneysel endotoksemi durumunda iNOS ekspresyonunun olduğu, taurin uygulaması sonrası ise iNOS ekspresyonunun inhibe olduğu görüldü. Taurinin endotoksin ile birlikte uygulandığında ise iNOS ekspresyonunun devam ettiği tespit edildi.

Kalp dokusunda iNOS enzimi ekspresyon sonucu

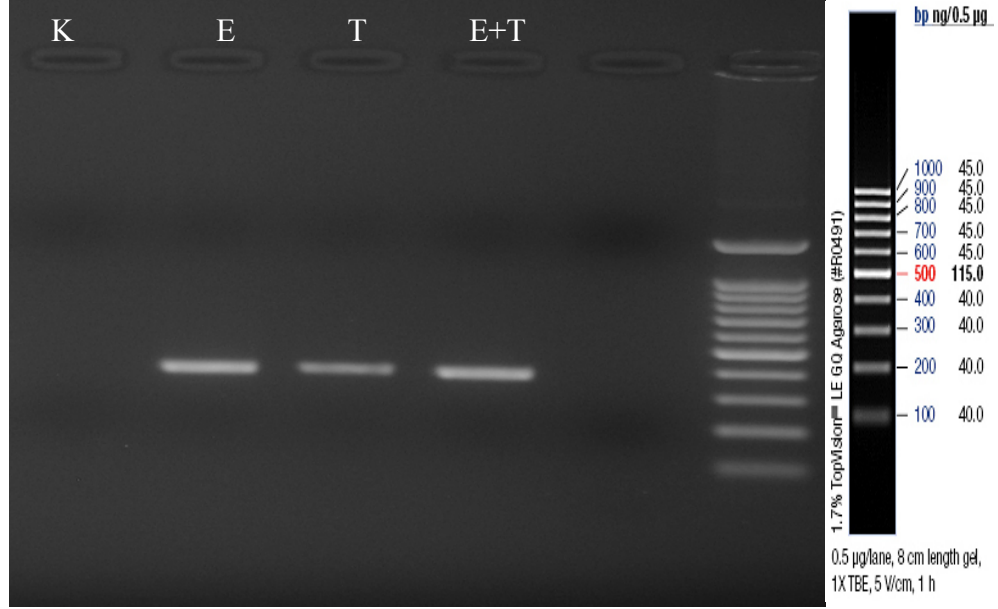


Şekil 30: Kalp iNOS genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, **E:** Endotoksin uygulanmış örnek, **T:** Taurin uygulanmış örnek, **E+T:** Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, **M:** Size Marker

SONUÇ: Kalp dokusuna ait kontrol grubu örneklerde iNOS RNA miktarının tespit edilebilir düzeyde olmadığı görüldü. LPS uygulaması sonrası oluşan deneysel endotoksemi durumunda iNOS ekspresyonunun var olduğu, taurin uygulaması sonrası ise iNOS ekspresyonunun yine tespit edilebilir düzeyde olmadığı görüldü. Taurin endotoksin ile birlikte uygulandığında ise iNOS ekspresyonu gözlemlendi.

Beyin dokusunda iNOS enzimi ekspresyon sonucu

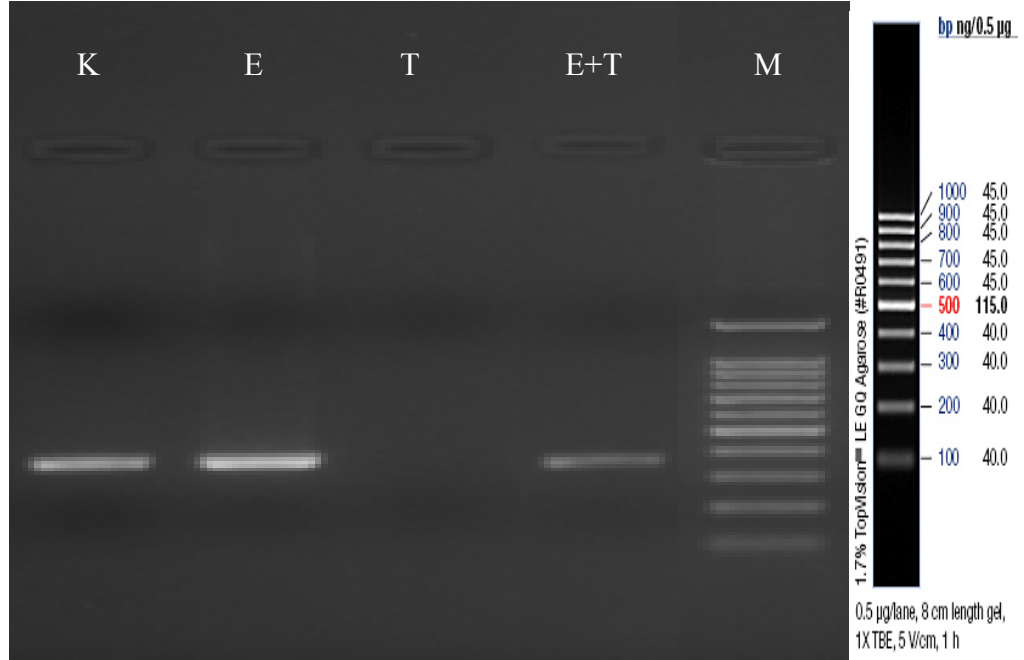


Şekil 31: Beyin iNOS genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Beyin dokusuna ait kontrol grubu örneklerde iNOS RNA miktarının tespit edilebilir düzeyde olmadığı görüldü. LPS uygulaması yapılan örneklerde, Taurinin yalnız başına uygulandığı örneklerde ve Taurinin endotoksin ile birlikte verildiğinde örneklerde ise iNOS ekspresyonunun var olduğu tespit edildi.

Böbrek dokusunda iNOS enzimi ekspresyon sonucu



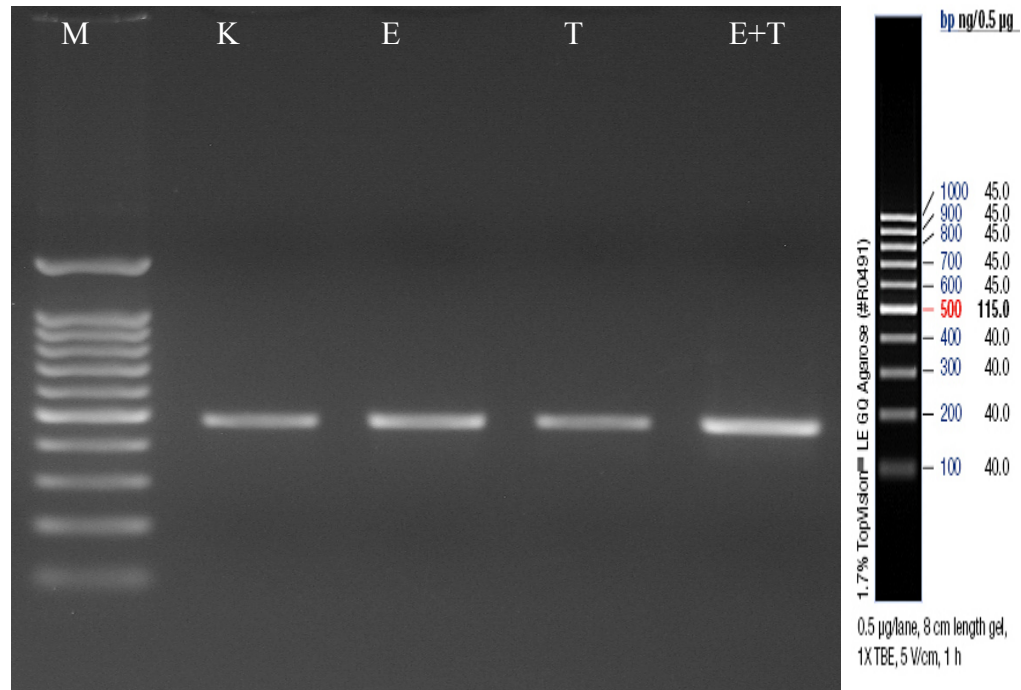
Şekil 32: Böbrek iNOS genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Böbrek dokusuna ait kontrol grubu örneklerde iNOS ekspresyonunun mevcut olduğu, LPS uygulaması sonrası yine ekspresyonun var olduğu görüldü. Taurinin tek başına uygulandığı durumda ise iNOS ekspresyonunu inhibe ettiği görüldü. Endotoksin ve Taurin grubunda iNOS ekspresyonu tespit edildi.

4.2.4 XO enziminin karaciğer, kalp, beyin ve böbrek doku örneklerinde kontrol, endotoksin, taurin ve endotoksin+ taurin gruplarına ait RT-PZR sonuçları

Karaciğer dokusunda XO enzimi ekspresyon sonucu

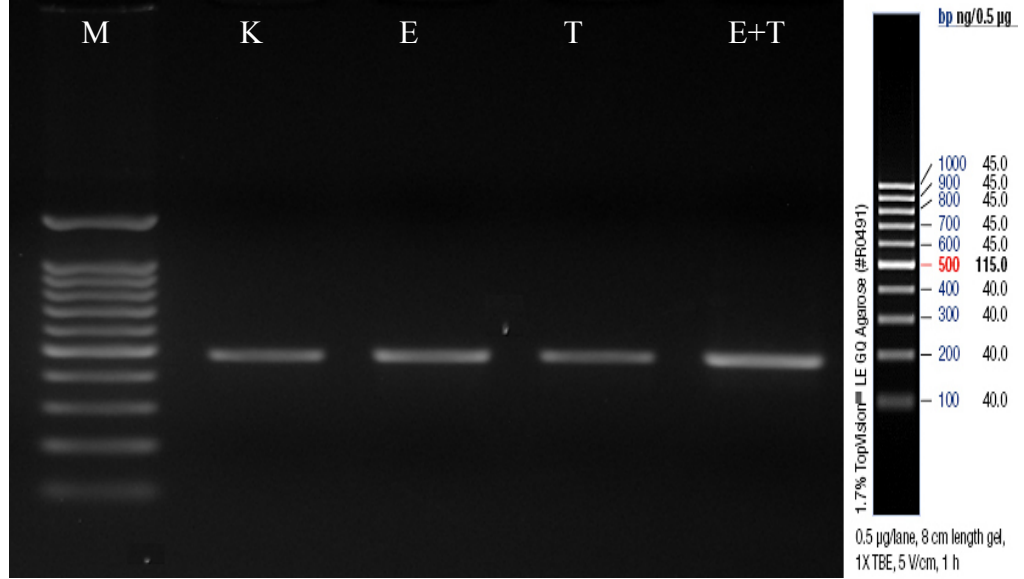


Şekil 33: Karaciğer XO genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Karaciğer dokusuna ait kontrol grubu örneklerde XO ekspresyonunun varlığı gözlemlendi. LPS uygulaması yapılan örneklerde, Taurinin yalnız başına uygulandığı örneklerde ve Taurinin endotoksin ile birlikte verildiğinde örneklerde ise yine MPO ekspresyonunun devam ettiği tespit edildi.

Kalp dokusunda XO enzimi ekspresyon sonucu

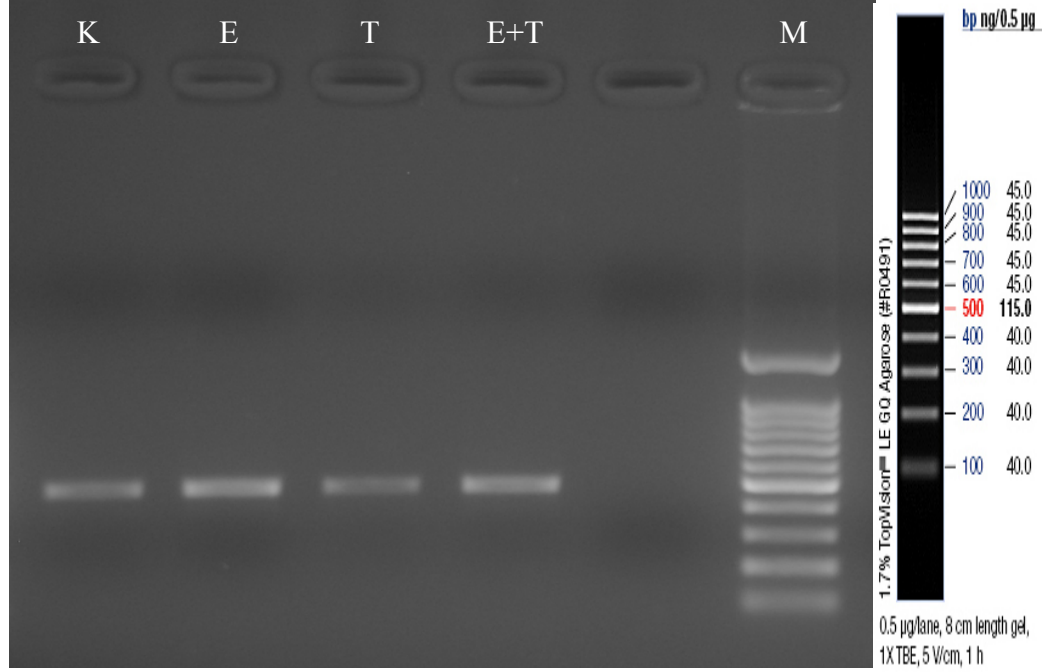


Şekil 34: Kalp XO genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, **E:** Endotoksin uygulanmış örnek, **T:** Taurin uygulanmış örnek, **E+T:** Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, **M:** Size Marker

SONUÇ: Kalp dokusuna ait kontrol grubu örneklerde XO ekspresyonunun varlığı gözlemlendi. LPS uygulaması yapılan örneklerde, Taurinin yalnız başına uygulandığı örneklerde ve Taurinin endotoksin ile birlikte verildiğinde örneklerde ise yine MPO ekspresyonunun devam ettiği tespit edildi.

Beyin dokusunda XO enzimi ekspresyon sonucu

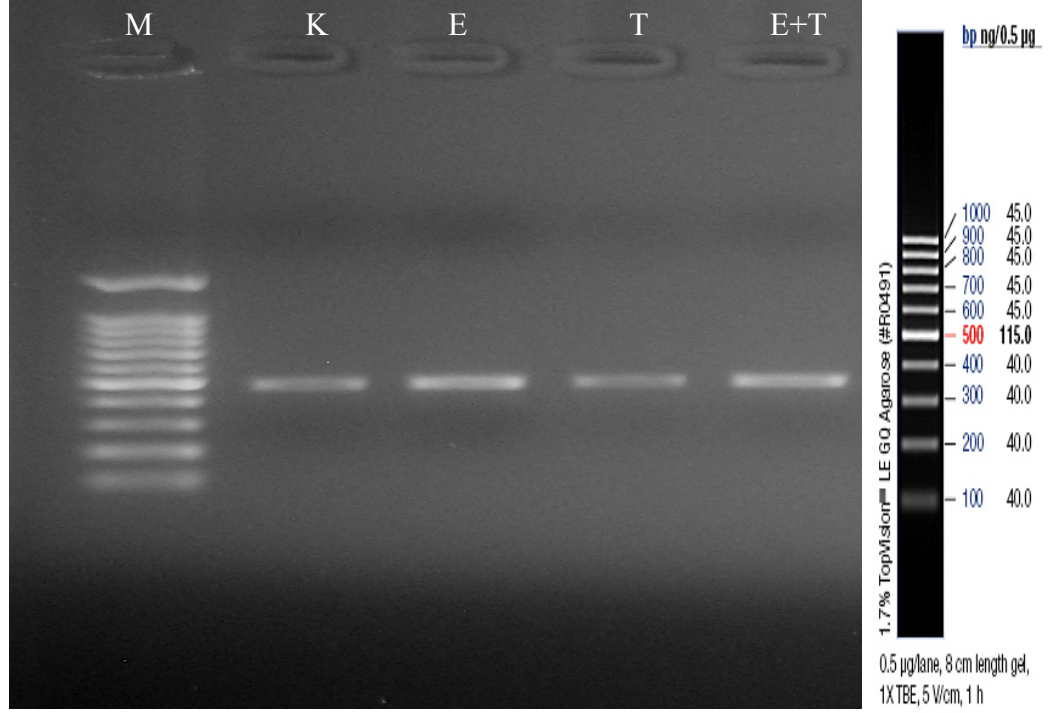


Şekil 35: Beyin XO genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Beyin dokusuna ait kontrol grubu örneklerde XO ekspresyonunun varlığı gözlemlendi. LPS uygulaması yapılan örneklerde, Taurinin yalnız başına uygulandığı örneklerde ve Taurinin endotoksin ile birlikte verildiğinde örneklerde ise yine MPO ekspresyonunun devam ettiği tespit edildi.

Böbrek dokusunda XO enzimi ekspresyon sonucu



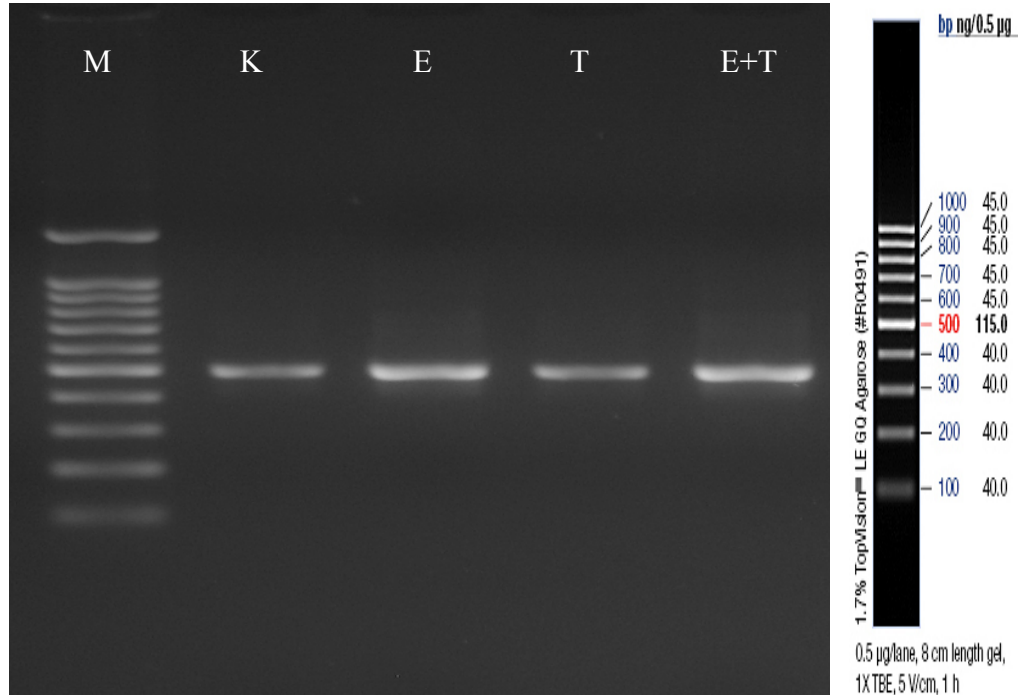
Şekil 36: Böbrek XO genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Böbrek dokusuna ait kontrol grubu örneklerde XO ekspresyonunun varlığı gözlemlendi. LPS uygulaması yapılan örneklerde, Taurinin yalnız başına uygulandığı örneklerde ve Taurinin endotoksin ile birlikte verildiğinde örneklerde ise yine MPO ekspresyonunun devam ettiği tespit edildi.

4.2.5 MPO enziminin karaciğer, kalp, beyin ve böbrek doku örneklerinde kontrol, endotoksin, taurin ve endotoksin+ taurin gruplarına ait RT-PZR sonuçları

Karaciğer dokusunda MPO enzimi ekspresyon sonucu

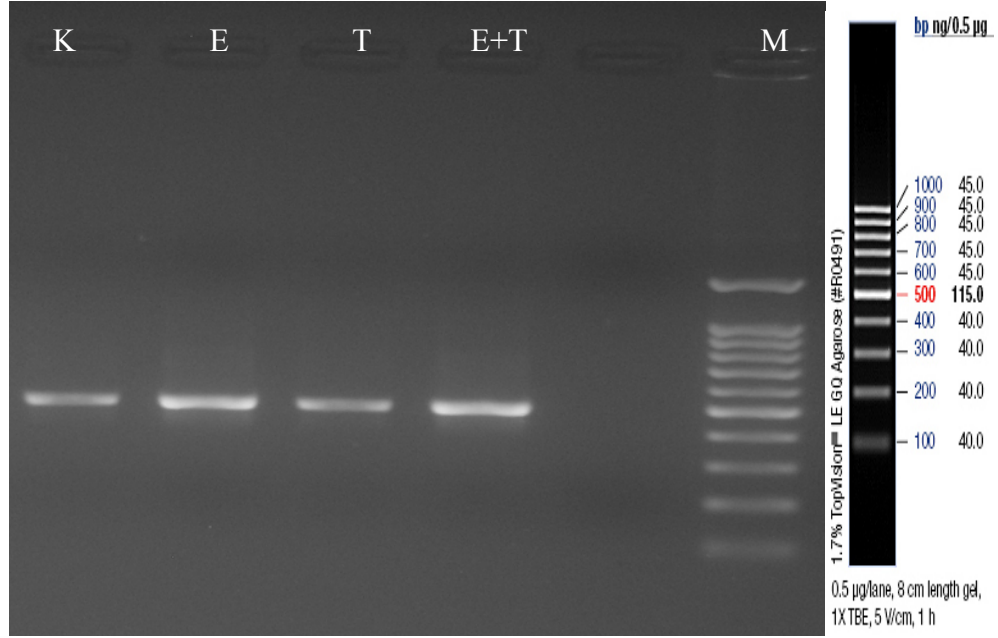


Şekil 37: Karaciğer MPO genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Karaciğer dokusuna ait kontrol grubu örneklerde MPO ekspresyonunun varlığı gözlemlendi. LPS uygulaması yapılan örneklerde, Taurinin yalnız başına uygulandığı örneklerde ve Taurinin endotoksin ile birlikte verildiğinde örneklerde ise yine MPO ekspresyonunun devam ettiği tespit edildi.

Kalp dokusunda MPO enzimi ekspresyon sonucu

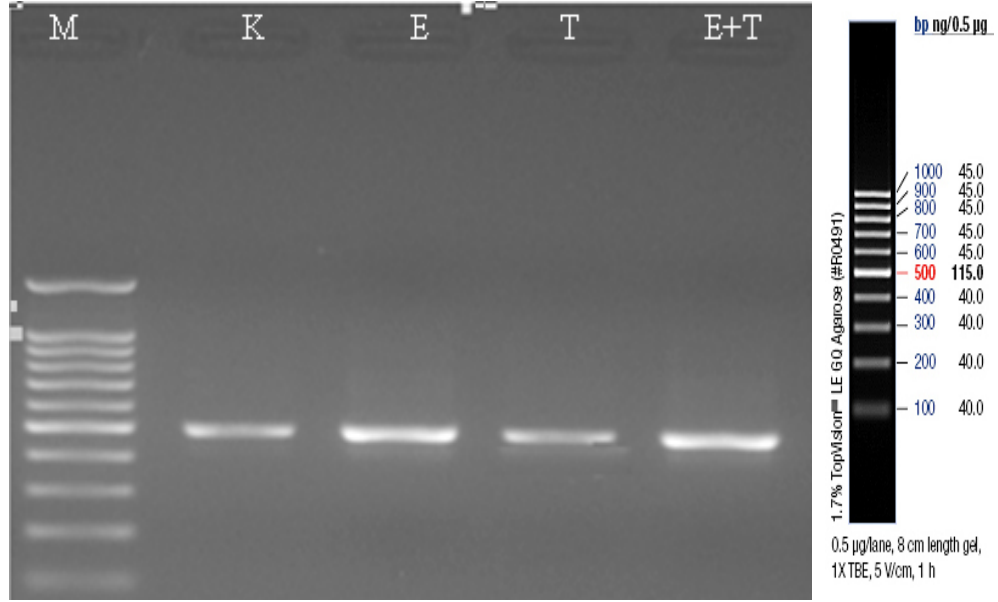


Şekil 38: Kalp MPO genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Kalp dokusuna ait kontrol grubu örneklerde MPO ekspresyonunun varlığı gözlemlendi. LPS uygulaması yapılan örneklerde, Taurinin yalnız başına uygulandığı örneklerde ve Taurinin endotoksin ile birlikte verildiğinde örneklerde ise yine MPO ekspresyonunun devam ettiği tespit edildi.

Beyin dokusunda MPO enzimi ekspresyon sonucu

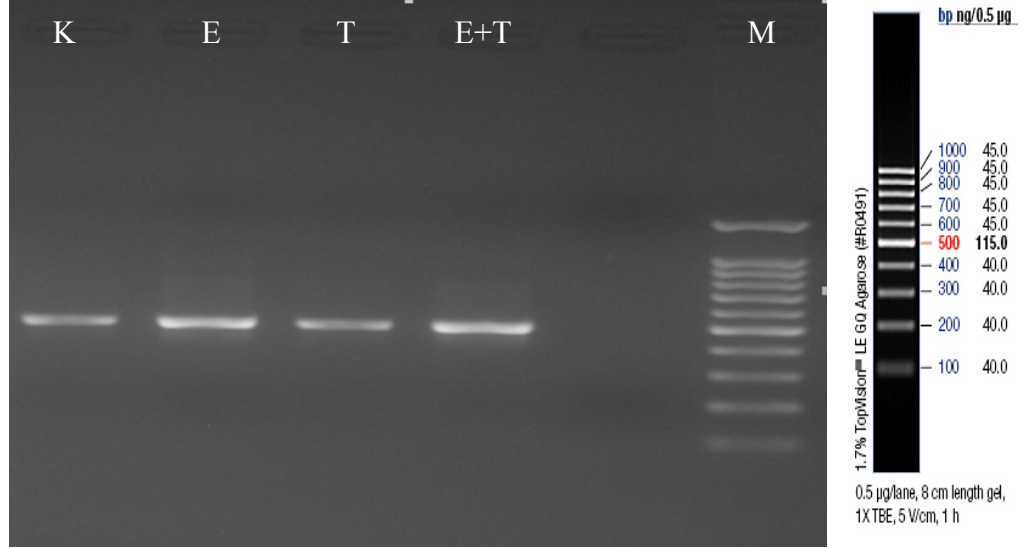


Şekil 39: Beyin MPO genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, **E:** Endotoksin uygulanmış örnek, **T:** Taurin uygulanmış örnek, **E+T:** Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, **M:** Size Marker

SONUÇ: Beyin dokusuna ait kontrol grubu örneklerde MPO ekspresyonunun varlığı gözlemlendi. LPS uygulaması yapılan örneklerde, Taurinin yalnız başına uygulandığı örneklerde ve Taurinin endotoksin ile birlikte verildiğinde örneklerde ise yine MPO ekspresyonunun devam ettiği tespit edildi.

Böbrek dokusunda MPO enzimi ekspresyon sonucu



Şekil 40: Böbrek MPO genine ait RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

K: Kontrol örnek, E: Endotoksin uygulanmış örnek, T: Taurin uygulanmış örnek, E+T: Endotoksin ve Taurin uygulanmış örnek, M: Size Marker

SONUÇ: Böbrek dokusuna ait kontrol grubu örneklerde MPO ekspresyonunun varlığı gözlemlendi. LPS uygulaması yapılan örneklerde, Taurinin yalnız başına uygulandığı örneklerde ve Taurinin endotoksin ile birlikte verildiğinde örneklerde ise yine MPO ekspresyonunun devam ettiği tespit edildi.

Tablo 15: RT-PZR sonuçlarının karşılaştırmalı olarak özeti

_: ekspresyon gözlenmediği durum, **+**: ekspresyonun mevcut olduğu durum

		eNOS	iNOS	XO	MPO
KARACİĞER	Kontrol	+	+	+	+
	Endotoksin	+	+	+	+
	Taurin	+	—	+	+
	Taurin /Endotoksin	+	+	+	+
KALP	Kontrol	+	—	+	+
	Endotoksin	+	+	+	+
	Taurin	+	—	+	+
	Taurin /Endotoksin	+	+	+	+
BEYİN	Kontrol	+	—	+	+
	Endotoksin	+	+	+	+
	Taurin	+	+	+	+
	Taurin /Endotoksin	+	+	+	+
BÖBREK	Kontrol	+	+	+	+
	Endotoksin	+	+	+	+
	Taurin	+	—	+	+
	Taurin /Endotoksin	+	+	+	+

5. TARTIŞMA

Karaciğer, kalp, böbrek ve beyin dokuları ile ratlarda yapılan bu çalışma, iki önemli bulgunun ortaya çıkmasına neden olmuştur. Birincisi; ratlara 4 mg/kg ip. endotoksin (LPS) uygulanması eNOS ekspresyonu üzerinde etkili olmazken iNOS ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Diğer taraftan, bu dokularda XO ve MPO enzimlerinin ekspresyonlarının da endotoksin uygulandıktan sonra arttığı tespit edildi. İkincisi; endotoksin aracılıklı indüksiyona uğrayan bu ekspresyonların bazı dokularda taurin tarafından inhibe edildiği, bazı dokularda ise taurinin etkili olmadığı saptandı.

Lipopolisakkaritlerin sistemik olarak uygulanmasının endotoksemiye ve sistemik inflamasyona neden olduğu ve periferik dokularda bazı enzim ekspresyonlarını arttırdığı bugüne kadar yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Serbest oksijen ve nitrojen türevlerinin endotoksin aracılıklı doku harabiyetlerinde önemli rol oynadığı deneysel olarak yapılan tüm çalışmalarda gösterilmiştir. Endotoksin uygulandıktan sonra sitokinlerin ve bölgeye göç eden makrofajların aktive olduğu ve bu hücrelerin de reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin oluşumuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. NO, NOsentazlar tarafından arjininden sentezlenmektedir.^{124,125} Çalışmamızda görüldüğü gibi endotoksin uygulandıktan sonra oluşan NO'nun kaynağı eNOS değil iNOS ekspresyonudur.

Gebeska ve arkadaşları; ratlarda 2mg/kg intravenöz LPS uygulaması sonrası akciğer, kalp, karaciğer, böbrek, dalak dokularını ve kan örneklerini çeşitli zaman aralıklarında elde ederek eNOS ve iNOS ekspresyonlarını RT-PZR yöntemi ile araştırmışlardır. eNOS ekspresyonunun LPS sonrası sabit kaldığını, iNOS ekspresyonunun ise ilk önce akciğerde olmak üzere kalp, karaciğer, böbrek ve dalakta artış

gösterdiğini bildirmişlerdir. Tüm dokularda mRNA ekspresyonu artışından 2–3 saat sonra protein artışı başlamıştır.⁴

Vos ve arkadaşları; endotoksin uygulandıktan sonraki 6. saatte iNOS ekspresyonunun hepatositlerde kuppfer hücrelerinde ve inflamatuvar hücrelerde maksimum seviyeye ulaştığını göstermişlerdir. Bu artışın endotoksin verildikten sonra oluşan sitokinler aracılığıyla oluştuğu rapor edilmektedir.⁷

Thiemermann ve arkadaşları, endotoksin verildikten 6 saat sonra serum nitrit seviyesinin 4.5 kat arttığını ve bu artışın karaciğer homojenatlarındaki iNOS aktivitesinde görülen artış ile paralel olduğunu rapor etmişlerdir.¹²⁶

Kirkeboen ve Strand ve bu konuda çalışan diğer araştırmacılar yine endotoksemi sonucunda karaciğer, kalp, böbrek ve beyin gibi dokularda iNOS aktivasyonunun gerçekleştiğini ve çok miktarda NO oluştuğunu gözlemişlerdir.^{5,6,7,127}

Daha önce endotoksemik hayvan modelleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, beyin, böbrek ve karaciğerde iNOS aktivasyonunun 6. saatte 2 kat artış gösterdiğini ve bu NO artışı ile ilgili olarak her iki dokuda 3-Nitrotirozin miktarının yükseldiği saptandı.^{128,129}

Luiking ve arkadaşları; endotoksemiden sonra iNOS aktivitesinin arttığını ve buna bağlı olarak arjinin kullanımının hızlandığını ancak eNOS aktivitesinde bir değişme olmadığını bildirmişler ve endotoksemi sırasında böbrek metabolizmasındaki değişikliklerde eNOS'un değil iNOS'un önemli olduğunu vurgulamışlardır.¹³⁰

Yine Chou ve arkadaşları; böbreğin farklı bölgelerinde LPS uygulaması öncesi ve sonrası iNOS ekspresyonunu incelemişler. Böbreğin korteks kısmında kontrol örneklerinde de iNOS varlığı tespit edilirken LPS sonrası artış anlamlı bulunmamıştır. Dış medullada ise, kontrolde çok az iNOS ekspresyonu varken LPS sonrası yüksek oranda artış tespit edilmiştir. İç medullada ise, kontrolde ekspresyon yüksek iken LPS sonrası anlamlı bir artış yoktur. Sonuçta, iNOS'un böbreğin değişik bölümlerinde normal şartlarda az da olsa devamlı bir ekspresyonunun bulunduğu ve bunun böbreğin normal işlevi için gerekli olduğu yargısına varılmıştır. Böbrek dokusunun farklı bölgelerinde ekspresyon durumlarının farklılık gösterebileceğine dikkat çekilmiştir.⁹ Biz bu çalışmamızda tüm böbrek homojenatında çalıştığımız için kontrol örneklerimizde iNOS ekspresyonu tespit etmemize rağmen LPS sonrası her hangi bir artış gözleyemedik.

Kim ve arkadaşları ise 1mg/kg ip. LPS uygulaması sonrası 5. saatte fare böbrek dokusunda iNOS ekspresyonunun ve aktivitesinin arttığını eNOS'un ise sabit kaldığını tespit etmişlerdir. Ancak böbreğin hangi bölgesinde çalışıldığı belirtilmemiştir.⁸

Heemserk ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, insanda endotoksemi sırasında görülen proksimal tubül harabiyeti durumunda idrardan elde edilen hücrelerde renal iNOS ekspresyonun arttığı kanda da önemli miktarda NO metabolitlerinin gözlemlendiği bulunmuştur.¹³¹

Wang ve arkadaşları; 5mg/kg LPS uygulanan fare böbreğinde meydana gelen böbrek tubuler harabiyetinin yalnız iNOS ekspresyonuna değil oluşan süperoksit radikallerine de bağlı olduğunu bildirmişlerdir. EC-SOD' nin endotoksemi de inhibe olduğu ve bunun süperoksit artışına neden olduğu hipotezi ortaya atılmıştır. Süperoksitdeki bu artış NO temizlenmesinde artışa neden olabilir. Böbrekte serbest NO

miktarının azalması renal vazokonstriksiyona ve akut böbrek yetmezliğine neden olabilir.¹³²

Araştırmacılar ratlarda ip. LPS verilmesinden sonra, minimal dozda (0.5 mg/kg) bile 18 saat sonunda iNOS ekspresyonunun artması sonucu fazla miktarda NO oluştuğunu ve bunun da kalbin kasılma fonksiyonlarını azalttığını gözlemişlerdir.^{133,134}

Yine Poon ve arkadaşları; rat kalp dokusunda LPS uygulaması sonrası iNOS ekspresyonunun arttığını tespit etmişlerdir.¹³⁵

Chin Liu ve arkadaşları ise endotoksin verilmiş sprague dawley ratların kalp, akciğer ve aort doku örneklerinde western blot yöntemi ile nNOS, eNOS ve iNOS protein miktarları incelemiş ve kalpte LPS enjeksiyonu sonrası 1. ve 4. saatlerde eNOS miktarlarında anlamlı bir değişim saptanamazken nNOS ve iNOS protein miktarında 1. saatten itibaren anlamlı bir artış gözlenmiştir. Akciğerde, sonuçlar aynı olmakla birlikte iNOS artışı daha yüksek düzeyde olmuştur. Aortda ise nNOS miktarı neredeyse sabit kalırken eNOS ve iNOS miktarlarında 1. saatten itibaren artış gözlenmiştir.¹³⁶

Araştırmacılar, ratlarda yapılan deneysel endotoksemi iNOS aktivitesinin arttığını ve bu artışın geç ve erken dönemde kardiyovasküler depresyona neden olduğunu gözlemişlerdir.¹³⁷

Khadour ve arkadaşlarının çalışmalarında; plazma nitrat/nitrit oranı kontrole göre 20 kat artmıştır. Kontrol örneklerde ventriküler homojenatlardaki iNOS aktivitesi tespit edilebilir en alt limitteyken LPS sonrası 20 kat artmıştır. eNOS aktivitesi ise anlamlı bir değişim göstermemiştir. Yine miyokardial ventriküllerdeki XDH (ksantin oksidazın öncüsü) aktivitesi artmıştır. (%55) yine XO aktivitesi miyokardda ikiye

katlanmıştır. Bu çalışmada LPS uygulanması sonrası endotoksemik ratlarda miyokardial süperoksit üretimi ve iNOS aktivitesinin artışı göstermiştir.¹³⁷

El-Mas ve arkadaşları ise ethanol kaynaklı endotoksemi sonucu kalp dokusunda iNOS ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir.¹³⁸

Yoshioka ve arkadaşlarının sonuçları beyin mikrogial hücrelerinde LPS aracılıklı NO seviyesinin arttığını ve bunun iNOS proteininin konsantrasyona bağlı bir şekilde artması ile oluştuğunu ve yine bu üretimin NO oluşumu yolu ile negatif feedback mekanizması ile kontrol altında tutulduğu göstermişlerdir.¹³⁹

Diğer bazı araştırmacılar da bizim bulgularımıza uygun bir şekilde LPS yolu ile oluşturulan sistemik inflamasyon sırasında iNOS aktivasyonunun ve ekspresyonunun değişik miktarlarda arttığını ve bu artışın nörotoksiteden sorumlu olduğunu göstermişlerdir.^{3,140,141}

İnflamasyona bağlı doku harabiyetinde reaktif nitrojen türevlerin yanı sıra reaktif oksijen türevlerde önemli rol oynamaktadır. Bunların içinde süperoksit türevlerinin oluşumundan sorumlu olan en önemli enzim tüm dokuların endotelinde yerleşen XO enzimidir.¹¹ Biz buna dayanarak tüm dokularda XO ekspresyon değişimini de incelemeyi hedefledik. XO bir metalloflavoproteindir ve redükte ajanları kullanarak moleküler oksijeni süperoksite çevirir ve bu şekilde serbest oksijen radikallerinin oluşumundan sorumlu tutulur.¹² Ancak hücrede bu enzimin pürin metabolizmasından sorumlu olan XDH ve patolojik şartlarda görev yapan XO formları vardır. Biz de çalışmamızda XO ekspresyonunun tüm dokularda LPS verilmesinden sonra arttığını tespit ettik. Sonuçlarımız bu konuda çalışan diğer araştırmacıların sonuçlarına uygunluk gösterdi.

Hassoun ve arkadaşları; rat akciğerlerinde 1mg/kg LPS uygulanması, IL-1B ve hipoksik koşulların XO ekspresyonuna etkisini araştırmışlardır. LPS ve IL-1B uygulaması sonrası XO ekspresyonunun arttığını gözlemişlerdir.¹⁵

Brandes ve arkadaşları; rat aortlarında yaptıkları çalışmada ksantin oksidaz ve NAD(P)H oksidaz aracılı süperoksit oluşumunun endotoksemideki rolünü araştırmışlardır. LPS uygulamasından 12 saat sonra vaskular süperoksit miktarının 4,7 kat arttığını ve 30 saat sonunda da artmaya devam ettiğini göstermişlerdir. 12 saat sonra NAD(P)H oksidaz inhibitörü olan Difenil iyodonyum (DPI) eklendiğinde süperoksit miktarı azalmış fakat ksantin oksidaz inhibitörü olan oksipurinol verildiğinde değişmemiştir. 30 saat sonra ise aynı inhibitörler verildiğinde her 2 inhibitör de süperoksit oluşumunu azaltmıştır. Bu da ksantin oksidazın süperoksit oluşumuna katılımının daha ileri aşamalarda olduğunu düşündürmektedir. Yine XO mRNA'sı kontrolde tespit edilemezken 12 saat sonra net olarak artış göstermiştir.¹²

Türközkan ve arkadaşları daha önce yapılan bir çalışmada karaciğerde XO enziminin aktivitesinin 4mg/kg endotoksin verilmesinden sonra arttığını tespit etmişlerdir.¹⁴²

Araştırmacılar, XDH'nın XO'ya dönüşümünün çeşitli virüsler ve bakteriyel lipopolisakkaritler ile dramatik bir şekilde arttığını bildirmişlerdir. NO'nun posttranskripsiyonel olarak süperoksit radikal oluşumunu XO ile ilişki kurarak düzenlediğini iddia etmektedirler. Ayrıca yine XO'nun da oluşan NO'nun önemli bir regülatörü olduğunu ifade etmektedirler.¹¹

Yang ve arkadaşları 4mg/kg ip. LPS enjeksiyonu sonrası oluşan endotoksemi modelinde renal XO aracılığıyla süperoksit üretiminin

yükseldiğini ve bununda akut böbrek yetersizliğine neden olduğunu bildirmişlerdir.¹⁰

Kurosaki ve arkadaşları; çeşitli fare dokularında LPS uygulaması sonrası XOR ekspresyonunu western ve northern blotting yöntemleri ile araştırmışlar. Normal şartlar altında da akciğer ve karaciğerde en yüksek olmak üzere böbrek, dalak ve kalpte de XOR aktivitesinin bulunduğunu, LPS uygulaması sonrası ise bu aktivitenin arttığını belirlemişlerdir. Bu artış 3 kat ile en çok böbrekte tespit edilmiştir. Dalak ve karaciğer bunu takip etmiştir.¹⁴³

Endotoksinler kan dolaşımındaki kemoatraktan maddelerin seviyesini arttırarak değişik organlarda nötrofillerin infiltrasyonunu indüklemektedir. Bu, tüm hayvan modellerinde gösterilmiştir. MPO enzimi, nötrofillerin oksidatif burst aktivitesinden sorumlu bir enzimdir ve endotoksemi sırasında ekspresyonu artmaktadır.¹⁴⁴

Buna dayanarak biz yine bu çalışmamızda endotoksin verildikten sonra tüm dokularda MPO ekspresyon düzeylerini inceledik.

Smith ve arkadaşları nötrofillerin akut inflamasyon cevabının aktif katılımcıları olduğunu ve bu hücrelerin en önemli fonksiyonlarının toksik ajanları öldürmek olduğunu bildirmişlerdir ve bu konuda en etkili ajanın MPO'nun oluşturduğu oksidanlar olduğunu göstermişlerdir. Nötrofillerin oluşturduğu bu reaktif oksidanların zaman zaman dokulara infiltre olarak zarar verdiği bildirilmiştir.¹⁴⁵

Tang ve arkadaşları endotoksemi sonucu nötrofil aracılıklı harabiyet markerı olan MPO' nun kalp dokusunda arttığını gözlemişlerdir.¹⁴⁶

Yeh ve arkadaşları ise MPO'nun hem reaktif nitrojen hem de reaktif oksijen türlerinin oluşumundan sorumlu olduğunu ve inflamasyon şartlarında hem XO'nun hem NO'nun hem de MPO' nun dokularda ve plazmada arttığı bildirilmiştir.¹³

Yine Türközkan ve arkadaşları endotoksemi sonrası akciğer dokusunda MPO aktivitesinin ve buna bağlı 3-NT oluşumunun arttığını bildirmişlerdir.¹⁴⁷

Beyinde serebral iskemiden sonra oluşan inflamatuvar hücre infiltrasyonu aracılığıyla meydana gelen beyin harabiyeti ile MPO aktivitesi arasında yakın bir ilişki olduğu Weston ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir.¹²⁵

Bazı araştırmacılar, birçok renal hastalıkta lökosit aracılığıyla reaktif O₂ türevlerinin hücredeki oksidatif harabiyete katıldığını ve artan MPO aktivitesinin önemli bir etken olduğunu ve yine bu enzimin NO metabolizması ile yakından ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.¹⁴⁴

Gebska ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada endotoksemi sonrası akciğerlerde lökosit birikimi dolayısıyla 15 dakika içinde MPO aktivitesi artarken diğer dokularda bu aktivite ancak 3 saat sonra tespit edilmiştir. Dolayısıyla akciğerlerde görülen erken NOS2 indüksiyonu da bu dokuda başlayan hızlı nötrofil göçü sebebiyledir denmektedir.⁴

Kumar ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise MPO nun iNOS ekspresyonu üzerine negatif etkisi olduğu gösterilmiştir. IL ile muamele edilen rat makrofajlarında iNOS gen ekspresyonu uyarılırken MPO ekspresyonunun baskılandığı gözlenmiştir. Ayrıca ortama MPO enziminin eklenmesi iNOS seviyelerinde azalmaya neden olmuştur. MPO

enzimi inhibitörü olan 4-aminobenzohydrazide eklenmesinin ise iNOS artışı ile sonuçlanması MPO'nun iNOS ekspresyonu üzerine baskılayıcı bir etkisi olduğunu göstermiştir. iNOS indüksiyonu ile MPO ekspresyonu arasında bir ilişki olduğunu ve MPO'nun düşük miktardaki NO'yu tutarak iNOS indüksiyonunu baskıladığını bulmuşlardır. MPO'nun inflamasyon bölgesindeki makrofajlarda iNOS için bir bariyer olarak hareket ettiğini ve bu şekilde toksik seviyede NO'nun oluşumunu önlediğini gözlemlemişlerdir.¹⁴

Bu çalışmamızın ikinci amacı tüm hücrelerde fazla miktarda bulunan ve kükürt taşıyan bir aminoasit olan taurinin, endotoksemi aracılığı iNOS, eNOS, XO ve MPO ekspresyon değişimleri üzerine etkisini incelemektir.

İnvivo ve invitro inflamasyon modellerinde gösterildiği gibi, taurin lökositler başta olmak üzere tüm vücut hücrelerinde ve inflamatuvar hücrelerde bulunan ve organizmayı inflamatuvar reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan harabiyetten koruyan önemli bir aminoasittir. Daha önceki çalışmalarda taurinin nötrofillerin fagositik yeteneğini ve respiratuvar burst aktivitesini arttırarak güçlü bir antimikrobial rol oynadığı bildirilmiştir.⁹³

Daha önce yapılan araştırmalarda endotoksemi (300m/kg LPS) aracılığı hücre harabiyetlerinde taurinin tek başına ve endotoksin ile uygulanmasının farklı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.^{20,129}

Biz bu çalışmamızda 300m/kg ip taurinin karaciğer, kalp ve böbrek eNOS aktivitesi üzerinde etkisiz olduğunu ancak bu dokuların iNOS ekspresyonları üzerine hem tek başına verildiğinde hem de endotoksin ile verildiğinde inhibitör etkisi olduğunu gözledik. Ancak endotoksin aracılığı beyin harabiyetinde aynı dozdaki taurinin eNOS

üzerine etkisiz kalırken iNOS'u inhibe etmediği ve endotoksin gibi davrandığı gözlenmiştir.

Daha önce yapılmış, yayınlanmamış bir çalışmada yine ip uygulanmış olan 300mg/kg taurin beyinde tek başına bile toksik etki yaptığı ve bu toksik etkinin endotoksin ile birlikte verildiğinde 2 kat arttığı bu dokularda DNA ve protein oksidasyonları ölçülerek gösterilmiştir.¹²⁹

Karpuzoğlu ve arkadaşları ise, %2'lik konsantrasyonda 6 hafta süre ile içme suyuna ilave edilen taurinin karaciğerde antioksidan etki gösterirken beyinde etkili olmadığını gözlemişlerdir.¹⁴⁸

Karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda kullandığımız dozdaki taurinin iNOS'u inhibe etmesi ile ilgili olan bulgularımız diğer araştırmacıların sonuçları ile paralellik göstermiştir.

Bazı araştırmacılar taurinin önemli bir hücre koruyucusu olduğu ve tek bilinen endojen iNOS inhibitörü olduğunu ifade etmektedirler. Zhang ve arkadaşları tarafından, 1mg/kg LPS enjeksiyonundan sonra serbest oksijen ve nitrojen türevleri aracılıklı meydana gelen karaciğer harabiyetinin taurin tarafından engellendiği bildirilmiştir.¹⁴⁹

Hanna ve arkadaşları, taurinin invivo ve invitro olarak oluşan ve kalp harabiyetine neden olan serbest radikallere karşı spesifik ve güçlü bir scavenger (süpürücü) etkisi bulunduğunu bildirmişlerdir.¹⁵⁰

Pasantes ve arkadaşları ise değişik ajanlarla oluşturulan kalp harabiyetinde taurinin bir kalp koruyucusu olduğunu bildirmişlerdir.⁹⁵

Egan ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada endotokseminin nötrofil aracılıklı endotel harabiyetine neden olduğunu ve endotokseminde

tüm dokulara nötrofil infiltrasyonunun arttığını bildirmişlerdir. Ancak endotoksin uygulaması öncesinde taurin uyguladıklarında nötrofil infiltrasyonunun ve doku harabiyetinin azaldığı ancak lökositlerin antimikrobial fonksiyonlarının değişmediğini bildirmişler ve taurinin etkisini eNOS değil iNOS inhibisyonu yolu ile olduğunu rapor etmişlerdir.¹⁹

Endotoksemi sonucu uyarılan fagositik hücreler, en çok karaciğer, beyin, böbrek ve kalp gibi dokularda birikerek reaktif toksik türevleri oluşturmaktadırlar. Bu toksik türevlerden en önemlisi MPO-H₂O₂ sistemi ile oluşan hipohaloz asitlerdir.⁶⁸ Taurin bu hipohaloz asitlerle birleşerek tauroklorin oluşturmakta ve tauroklorin ise NO, TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu engellemekte ve iNOS transkripsiyonunu inhibe etmektedir.^{99,102}

Çalışmamızda da görüldüğü gibi taurin beyin dışındaki tüm dokularda iNOS'u bu yolla da inhibe etmiş olabilir.

Çalışmamızda taurinin XO ekspresyonu üzerine etkisini incelediğimizde karaciğer ve kalpte tek başına etkisiz olduğu fakat endotoksin ile birlikte verildiğinde endotoksinin etkisini arttırdığı tespit edilmiştir. Böbrek ve beyinde ise XO ekspresyonunda yalnız başına veya endotoksinle uygulandığında etkisiz kaldığı gözlenmiştir.

Ekremoğlu ve arkadaşları tarafından, endotoksemi durumunda uygulanan taurinin lökositlerde XO aktivitesi üzerinde etkisiz olduğu gösterilmiştir.¹⁵¹

Yapılan bir çalışmada taurinin endotoksin aracılıklı karaciğer harabiyetinde etkili olduğu ve ksantin oksidaz aktivitesini hem tek başına hem de endotoksin ile birlikte verildiğinde kontrol değerlerine düşürdüğü gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada XO ekspresyonu çalışılmamıştır.¹⁴²

Yaptığımız literatür taramalarında taurinin XO ekspresyonu üzerine etkisine ilişkin yapılan bir araştırmaya rastlamadık. Taurinin kalp ve karaciğer üzerindeki XO ekspresyonunu arttırmasını fakat beyin ve böbrekte de etkisiz kalmasını uyguladığımız doz ile ilgili olduğunu düşünüyoruz. Bu mekanizmanın açıklanması için daha ileri çalışmaların yapılması gerekli olduğuna inanıyoruz.

Çalışmamızda endotoksin aracılıklı nötrofil infiltrasyon markerı olan myeloperoksidaz üzerine tek başına taurinin ve endotoksinle birlikte taurinin etkisini inceledik. Taurinin incelediğimiz tüm dokularda aynı endotoksin gibi davrandığını gözledik. Yani endotoksin aracılıklı MPO artışı üzerine etkili olmadığını gözledik ki bu taurin ile çalışan araştırmacıların sonuçları ile uygunluk göstermektedir

Daha önce belirttiğimiz gibi inflamatuvar hücrelerde fazla miktarda bulunan taurin, invivo ve invitro inflamasyon modellerinde inflamasyon aracılıklı harabiyete karşı dokuyu korumakta ve nötrofil infiltrasyonunu ve lökosit aracılıklı doku harabiyetini önlemektedir. Ancak bu etkisini bu hücrelerin fagositik yeteneklerini ve respiratuvar burst aktivitelerini etkilemeden yani MPO aktivitesini azaltmadan yerine getirmektedir.¹⁹

Sonuçlarımızdan da görüldüğü gibi taurin tek başına verildiğinde etkisiz kalmakta ancak, endotoksin ile birlikte verildiğinde lökositlerin fagositik aktivitesini değiştirmemektedir. . Bu durumda taurin, MPO ekspresyonunun azalmasını inhibe ederek endotoksin aracılıklı doku harabiyeti üzerinde etkili olmaktadır. Bu şekilde taurin dokuda kalan nötrofillerin antimikrobial fonksiyonlarının devamında etkili olmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda araştırmacılar, taurinin endotokseminin denetiminde önemli bir etkiye sahip olduğunu önermektedirler.

6. SONUÇ

Sonuç olarak, 4mg/kg ip endotoksin uygulanması, karaciğer, beyin, kalp ve böbrek dokusunda eNOS ekspresyonu üzerinde etkili olmaz iken iNOS, XO ve MPO ekspresyonlarını dokulara göre değişen düzeylerde arttırarak serbest oksijen ve nitrojen radikalleri aracılığı ile doku harabiyetine neden olabilmektedir. Anti-inflamatuar ve antioksidan etkisi olduğu düşünülen taurinin ise 300mg/kg dozda tüm dokularda yine eNOS üzerinde etkili olmaz iken iNOS ekspresyonu üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu görülmüştür. Taurinin XO ekspresyonu üzerindeki etkileri dokulara göre farklılık göstermiştir. MPO üzerinde taurinin etkisi incelendiğinde ise tek başına hiçbir etkisinin olmadığı ancak endotoksinle birlikte uygulandığında endotoksine karşı aktivitesini arttırarak koruyucu rol oynadığını gözledik. Buna dayanarak, taurinin dokularda lökosit infiltrasyonunu azaltabileceğini ancak mevcut lökositlerin respiratuar burst aktivitesini endotoksemiye karşı azaltmadığını düşünmekteyiz.

7. ÖZET

TAURİN'İN ENDOTOKSİN ARACILIKLI eNOS, iNOS, MPO ve KSANTİN OKSİDAZ EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Bu çalışmada endotoksin uygulandıktan sonraki 6. saatte kobaylarda karaciğer, kalp, böbrek ve beyin dokularına ait eNOS, iNOS, MPO ve XO enzimlerinin ekspresyonları incelendi. Diğer taraftan bu enzim ekspresyonları üzerine taurinin etkisi araştırıldı.

Bu amaçla kontrol, endotoksemi, taurin ve endotoksemi+taurin olmak üzere 4 farklı kobay grubu oluşturuldu. Bunun için 4 mg/kg endotoksin ve 300 mg/kg taurin intraperitoneal olarak uygulandı. Kontrol grubuna ise intraperitoneal serum fizyolojik verildi. Uygulamadan 6 saat sonra ise tüm grupların karaciğer, kalp, beyin ve böbrek dokuları alındı ve bu dokularda eNOS, iNOS, MPO ve XO enzimlerinin ekspresyonları RT-PCR yöntemi ile tayin edildi.

Tüm dokularda, endotoksin uygulandıktan sonra eNOS ekspresyonu sabit kalırken iNOS, MPO ve XO enzimlerinin ekspresyonlarının arttığı gözlemlendi. Antiinflamatuvar ve antioksidan özelliği bilinen taurinin bu enzimlerin ekspresyonları üzerine olan etkisi tüm dokularda araştırıldı. Taurinin eNOS ekspresyonu üzerinde hiçbir etkisi görülmezken iNOS ekspresyonunu tüm dokularda inhibe ettiği görüldü. Taurinin XO ekspresyonu üzerine karaciğer ve kalp dokusunda gözlenen etkisi ilginçti. Endotoksin etkisi ile artan XO ekspresyonunun taurin verilmesinden sonra daha fazla artışı görüldü. Beyin ve böbrek dokusunda ise taurin XO ekspresyonu üzerine etkisiz kaldı. MPO ekspresyonu ile ilgili olarak tüm dokularda birbirine benzer bulgular elde edildi. Endotoksin aracılı MPO artışı taurin verildikten sonra aynı seviyede kaldı. Taurinin endotoksin ile birlikte verildiğinde MPO oluşumunu aynı düzeyde tutarak hücreleri korumaya çalıştığını düşünmekteyiz.

8. SUMMARY

THE EFFECT OF TAURIN ON ENDOTOXIN MEDIATED ENOS, INOS, MPO AND XANTHINE OXIDASE EXPRESSION

In this study we aimed to investigate the eNOS, iNOS, MPO and XO enzymes' expression profiles at liver, heart, kidney and brain tissues of rats at 6th hour after endotoxin administration.

For this purpose, guinea pigs were divided into 4 groups as; control, endotoxine, taurine and endotoxine plus taurine. 4 mg/kg endotoxine and 300 mg/kg taurine was administered intraperitoneally to the animals. Only serum physiologic was administered to the control group. Six hours after administration, liver, heart, kidney and brain tissues of all groups were collected and examined the expression levels of eNOS, iNOS, MPO ve XO enzymes via RT-PCR procedure.

After endotoxin administration, iNOS, MPO and XO expressions were found to be upregulated while eNOS expression was constant at all tissues. Taurine has been known to have anti-inflammatory and antioxidant properties. The effect of taurine on the expression of these enzymes was also investigated at all tissues. It was detected that taurine has an inhibitory effect on iNOS expression at all tissues but has no effect on eNOS expression. The effect of taurine on the liver and heart tissues' XO expression was interesting. The increased XO expression after endotoxin exposure was seen to be more upregulated after taurine administration. At brain and kidney tissues, taurine had no effect on XO expression. Regarding to MPO expression all tissues showed similar results. The degree of endotoxin mediated MPO increase stayed at the same degree. We think that when taurine was applied with endotoxin, it tends to protect cells by preventing the inhibition of MPO expression.

9. KAYNAKLAR

- 1) Bian K, Murad F. Diversity of endotoxin-induced nitrotyrosine formation in macrophage-endothelium-rich organs. *Free Radic Biol Med.* 2001; Aug 15;31(4):421–9.
- 2) Nowak D, Pietras T, Antczak A, Król M, Piasecka G. Effect of bacterial lipopolysaccharide on the content of lipid peroxidation products in lungs and other organs of mice. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1993; Jan;63(1):77–83.
- 3) Suzuki E, Shintani F, Nakaki T, Nagata K, Yamazoe Y, Fujita N, Asai M, Kanba S. Dexamethasone and nitric oxide synthase gene expression in brain. *J Psychiatry Neurosci.* 1997; Mar;22(2):105–10.
- 4) Gebska A, Olszanecki R, Korbut R. Endotoxaemia in rats: role of leukocyte sequestration in rapid pulmonary nitric oxide synthase–2 expression. *Physiol Pharmacol.* 2005;Jun;56(2):299–311.
- 5) Knowles RG, Merrett M, Salter M, Moncada S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J.* 1990; Sep 15;270(3):833–6.
- 6) Hickey MJ, Sihota E, Amrani A, Santamaria P, Zbytnuik LD, Ng ES, Ho W, Sharkey KA, Kubes P. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in endotoxemia: chimeric mice reveal different cellular sources in various tissues. *FASEB J.* 2002; Jul;16(9):1141–3.
- 7) Vos TA, Van Goor H, Tuyt L, De Jager-Krikken A, Leuvenink R, Kuipers F, Jansen PL, Moshage H. Expression of inducible nitric oxide synthase in

endotoxemic rat hepatocytes is dependent on the cellular glutathione status. *Hepatology*. 1999; Feb;29(2):421–6.

8) Kim JI, Jang HS, Park KM. Endotoxin-induced renal tolerance against ischemia and reperfusion injury is removed by iNOS, but not eNOS, gene-deletion. *BMB Rep*. 2010; Sep;43(9):629–34.

9) Chou DE, Cai H, Jayadevappa D, Porush JG. Regional expression of inducible nitric oxide synthase in the kidney stimulated by lipopolysaccharide in the rat. *Exp Physiol*. 2002;Mar;87(2):153–62.

10) Yang CC, Ma MC, Chien CT, Wu MS, Sun WK, Chen CF. Hypoxic preconditioning attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat kidneys. *J Physiol*. 2007; Jul 1;582(Pt 1):407–19.

11) Parks DA, Skinner KA, Skinner HB, Tan S. Multiple organ dysfunction syndrome: Role of xanthine oxidase and nitric oxide. *Pathophys*. 1998; 49-46

12) Brandes RP, Koddenberg G, Gwinner W, Kim D, Kruse HJ, Busse R, Mügge A. Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. *Hypertension*. 1999; May;33(5): 1243-9.

13) Yeh GC, Henderson JP, Byun J, André d'Avignon D, Heinecke JW. 8-Nitroxanthine, a product of myeloperoxidase, peroxynitrite, and activated human neutrophils, enhances generation of superoxide by xanthine oxidase. *Arch Biochem Biophys*. 2003; Oct 1;418(1):1–12.

14) Kumar AP, Ryan C, Cordy V, Reynolds WF. Inducible nitric oxide synthase expression is inhibited by myeloperoxidase. *Nitric Oxide*. 2005;Aug;13(1): 42–53.

- 15) Hassoun PM, Yu FS, Cote CG, Zulueta JJ, Sawhney R, Skinner KA, Skinner HB, Parks DA, Lanzillo JJ Upregulation of xanthine oxidase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and hypoxia. Role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Jul;158(1):299–305.
- 16) Houdijk AP, Oosterling SJ, Siroen MP, de Jong S, Richir M, Rijssenbeek AL, Teerlink T, van Leeuwen PA. Hypertaurinemia in bile duct-ligated rats after surgery: the effect of gut endotoxin restriction on organ fluxes and oxidative status. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2006; May-Jun;30(3):186–93.
- 17) Choi HS, Cha YN, Kim C. Taurine chloramine inhibits PMA-stimulated superoxide production in human neutrophils perhaps by inhibiting phosphorylation and translocation of p47(phox). *Int Immunopharmacol.* 2006 Sep;6(9):1431–40.
- 18) Bridges CC, Ola MS, Prasad PD, El-Sherbeny A, Ganapathy V, Smith SB. Regulation of taurine transporter expression by NO in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Dec;281(6):C1825–36.
- 19) Egan BM, Abdih H, Kelly CJ, Condrón C, Bouchier-Hayes DJ. Effect of intravenous taurine on endotoxin-induced acute lung injury in sheep. *Eur J Surg.* 2001 Aug;167(8):575–80.
- 20) Erdamar H, Türközkan N, Ekremoğlu M, Kurt Y, Yaman H. The effect of taurine on polymorphonuclear leukocyte functions in endotoxemia. *Amino Acids.* 2007 Nov;33(4):581–5.

- 21) Dunne MW. Inflammation and repair. Port CM, ed. Pathophysiology: Concepts of Altered Health States with Contributors. Philadelphia: Lippincott, 1990; 165–176
- 22) Bullock BL. Inflammation and repair. Pathophysiology, Lippincott, 1996; 276–311
- 23) Calin A. Pain and inflammation. Am J Med. 1984;10: 9–16
- 24) Haeffner-Cavaillon N, Carreno MP, Aussel L, Caroff M. Molecular aspects of endotoxins relevant to their biological functions. Nephrol Dial Transplant, 1999; 14(4): 853–860.
- 25) Maslinsk D, Gajewski M. Some aspects of inflammatory process. Folia Neuropathology 1998; 36 (4): 199–204
- 26) Imhof BA, Dunon D. Basic mechanism of leukocyte migration. Horm Metab Res. 1997; 29 (12): 614–621
- 27) Stout RD, Stuttles J. T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease. Front Biosci. 1997; 1(29): 197–206
- 28) Goronzy JJ, Gold KN, Weyand CM. T cell derived lymphokines as regulators of chronic inflammation: potential targets for immunomodulation. Am J Ther. 1996;3 (2): 109–114
- 29) De Keyser F, Elewaut D, Vermeersch J, De Wever N, Cuvelier C, Veys EM. The role of T cells in rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 1995; 14: 5–9

- 30) Higgins AJ. The biology pathophysiology and control of eicosanoids in inflammation. *J Vet Pharmacol Therap.* 1985; 8: 1–18
- 31) Aditya GN, Chattopadhyay RN, Mandal S. Calcium channel blockers and non-steroidal anti-inflammatory combination. *Indian J Pharmacology.* 1999; 31: 36–37
- 32) Aditya GN, Chattopadhyay RN, Mandal S. Preliminary study on anti-inflammatory effect of calcium channel blockers in albino rats. *Indian J Pharmacology.* 1997;29: 132–34
- 33) Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Biosci.* 1997;2: 12–26
- 34) Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2010;118(2): 503-508
- 35) Kwon NS, Nathan CF, Gilker C, Griffith OW, Matthews DE, Stuehr DJ. L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen. *J Biol Chem.* 1990;265(23): 13442–5.
- 36) Wexler & Oppenheim. *Infect Immunol.* 1979; 23: 845
- 37) Lowry SF. Human endotoxemia: a model for mechanistic insight and therapeutic targeting. *Shock.* 2005; Suppl 1: 94–100.
- 38) Bassaga HS. Biochemical Aspects of Free Radicals. *Biochem. Cell. Biol.* 1990; 68: 989–998
- 39) Akuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. Kona: Mimoza Basım-Yayım ve Dağıtım AŞ. 1995

- 40) Cheseeman KH, Slater TF. An Introduction to Free Radical Biochemistry. Brit. Med. Bulletin 1993; 149: 481–93
- 41) Mccrd JM. Oxygen derived free radicals in postischemictissue injury. New engl. J. Med. 1985; 17: 159–163
- 42) Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. Eur J Pharmacol. 2001 Aug 24;426(1–2): 1–10.
- 43) Brunori M, Rotilio G. Biochemistry of oxygen radical species. Methods Enzymol. 1984;105: 22–35.
- 44) Corte ED, Stirpe F. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. Biochem J. 1972; Feb;126(3): 739–45.
- 45) Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O).J Biol Chem. 1969; Jul 25;244(14): 3855–63.
- 46) Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. Acta Physiol Scand Suppl. 1986;548: 87–99.
- 47) Waud WR, Rajagopalan KV. The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD⁺-dependent form (type D) to an O₂-dependent form (type O).Arch Biochem Biophys. 1976;172(2): 365–79.

- 48) Pritsos CA. Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system *Chem Biol Interact.* 2000;Dec 1;129(1–2): 195–208.
- 49) Topham RW, Walker MC, Calisch MP, Williams RW. Evidence for the participation of intestinal xanthine oxidase in the mucosal processing of iron. *Biochemistry.* 1982; Sep 14;21(19):4529–35.
- 50) Topham RW, Walker MC, Calisch MP. Liver xanthine dehydrogenase and iron mobilization. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982; Dec 31;109(4):1240–6.
- 51) Godber BL, Doel JJ, Durgan J, Eisenthal R, Harrison R. A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Lett.* 2000; Jun 16;475(2): 93–6.
- 52) Xu P, LaVallee P, Hoidal JR. Repressed expression of the human xanthine oxidoreductase gene. E-box and TATA-like elements restrict ground state transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2000; Feb 25;275(8): 5918–26.
- 53) Kurose I, Granger DN. Evidence implicating xanthine oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; Jun 17;723:158–79.
- 54) McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985; Jan 17;312(3):159–63.
- 55) Miesel R, Zuber M. Elevated levels of xanthine oxidoreductase in serum of patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation*, 1993; 17(5): 551–561

56) Newaz MA, Adeeb NN, Muslim N, Razak TA, Htut NN. Uric acid, xanthine oxidase and other risk factors of hypertension in normotensive subjects. *Clin Exp Hypertens*. 1996; Nov;18(8):1035–50.

57) Cosić V, Antić S, Pesić M, Jovanović O, Kundalić S, Djordjević VB. Monotherapy with metformin: does it improve hypoxia in type 2 diabetic patients? *Clin Chem Lab Med*. 2001; Sep;39(9):818–21.

58) Guyton CG. (1971): *Textbook of Medical Physiology*. Toronto.

59) Sethi S, Dikshit M. Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thromb Res* 2000;100: 223–47.

60) Nichols BA, Bainton DF, Farquhar MG. Differentiation of monocytes. Origin, nature, and fate of their azurophil granules. *J Cell Biol* 1971;50: 498–515.

61) Trush MA, Seed JL, Kensler TW. Oxidant-dependent metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons by phorbol ester-stimulated human polymorphonuclear leukocytes: possible link between inflammation and cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 5194–5198.

62) Van Rensburg CEJ, Van Staden AM, Anderson R, Van Rensburg EJ. Hypochlorous acid potentiates hydrogen peroxide-mediated DNA-strand breaks in human mononuclear leucocytes. *Mutat Res*. 1992; 265:255–261.

63) Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med*. 1978; 298, 659–68.

64) Forman HJ, Thomas MJ. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. *Annu Rev Physiol* 1986; 48, 669–80.

- 65) Lilius EM, Marnila P. Photon emission of phagocytes in relation to stress and disease. *Experientia*. 1992; 48: 1082–91.
- 66) Adler J. The sensing of chemicals by bacteria. *Sci Am*. 1976; 234, 40-7.
- 67) Zgliczynski JM, Stelmaszynska T. Chlorinating ability of human phagocytosing leucocytes. *Eur J Biochem*. 1975; 56: 157–62.
- 68) Wintrobe MM, Boggs DR, Bithell TC. *Clinical Haematology*. Great of Henry Kimpton. London. 1985
- 69) Vliet VA, Eiserich JP, Kaur H, Cross CE, Halliwell B. Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species. *Method Enzymol*. 1996; 269: 175–209
- 70) Moncada S. The L-arginine nitric oxide pathway. *NEJ Medicine* 1993; 329: 2002–2012
- 71) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol*. 1991; rev 43: 109–142
- 72) Hensley K, Williamson KS, Floyd RA. Measurement of 3-Nitrotyrosine and 5-Nitro- γ -Tocopherol by High performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 520–528
- 73) Sass G, Koerber K, Bang R, Guehrig H, Tegs G. Inducible nitric oxide synthase is critical for immune-mediated liver injury in mice. *J. Clin. Invest* 2001; 10: 439–447
- 74) Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide, *Free*

Radic. Biol. Med. 1998;25: (4–5): 434–456

75) Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide
Br. J. Surg. 1995; 82: (12): 1598–1610

76) Robbins RA, Grisham MB. Molecules in focus: nitric oxide. Int. J.
Biochem. Cell Biol. 1997; 29: (6): 857–860

77) Cuzzocea S, Riley P, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a
new pharmacological approach in shock, inflammation and Ischemia/
Reperfusion injury. Pharmacol Rev. 2001; 53: 153–159

78) Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide
and related species: free radical reactions and modification of
Biomolecules. Mol. Aspects Med, 1998; 19: (4–5): 221–357

79) Murphy MP, Packer MA, Scarlett JL, Martin SW. Peroxynitrite: a
biologically significant oxidant. Gen. Pharmacol. 1998; 31: (2): 179–186

80) Beckman JS, Crow J.P. Pathological implications of nitric oxide,
superoxide and peroxynitrite formation. Biochem. Soc. Trans 1993; 21 (2):
330–334

81) Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product
from the reaction of nitric oxide with superoxide. Am J Physiol. 1995; 268
(5):699–722

82) Parratt JR. Nitric oxide. A key mediator in sepsis and endotoxemia? J
Physiol Pharmacol. 1997;48 (4): 493–506

- 83) Chesney RW. Taurine: its biological role and clinical implications. *Adv Pediatr* 1985; 32: 1–42.
- 84) Ahn BO, Kim HG, Lee HS, Kim CD, Kim YS. Effects of taurine on cerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Pharmacology*. 2001; 61: 1-7
- 85) Schuller-Levis GB, Park E. Taurine and its chloramine: modulators of immunity. *Neurochem. Res*, 2004; 29 (1): 117–126
- 86) Birdsall TC. Therapeutic applications of taurine. *Altern. Med. Rev* 1998; 3(2):128–136
- 87) Tappaz ML. Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. *Neurochem. Res*. 2004; 29 (1): 83-96
- 88) Bouckennooghe T, Remacle C, Reusens B. Is taurine a functional nutrient? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2006; 9 (6): 728-733
- 89) Redmond HP, Stapleton PP, Neary P, Bouchier-Hayes D. Immunonutrition: the role of taurine, *Nutrition*, 1998; 14 (7-8): 599-604
- 90) Lourenco R, Camilo ME. Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? *Nutr. Hosp*, 2002; 17 (6): 262-270
- 91) Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev*. 1992; 72 (1):101-163
- 92) Han X, Patterson AB, Jones DP, Zelikovic I, Chesney RW. The taurine transporter: mechanisms of regulation, *Acta Physiol. Oxf*, 2006; 187 (1-2): 61-73

- 93) Kim C, Chung JK, Jeong JM., Chang YS, Lee YJ, Kim YJ, Lee MC, Koh CS, Kim BK. Uptake of taurine and taurine chloramine in murine macrophages and their distribution in mice with experimental inflammation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998; 442: 169-176
- 94) Wright CE, Tallan HH, Lin YY, Gaull GE. Taurine: biological update. *Annu. Rev. Biochem.* 1986; 55: 427-453
- 95) Pasantes-Morales H, Quesada O, Moran J. Taurine: an osmolyte in mammalian tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998; 442: 209-217
- 96) Huxtable RJ. Sources and turnover rates of taurine in nursing and weaned rat pups, *J. Nutr.* 1981; 111(7): 1275-1286
- 97) Awapara J. Absorption of injected taurine-S35 by rat organs, *J. Biol. Chem.* 1957; 225 (2): 877-882
- 98) Redmond HP, Stapleton PP, Neary P, Bouchier-Hayes D. Immunonutrition: the role of taurine, *Nutrition.* 1998; 14 (7-8): 599-604
- 99) Marcinkiewicz J, Chain B, Nowak B, Grabowska A, Bryniarski K, Baran J. Antimicrobial and cytotoxic activity of hypochlorous acid: interactions with taurine and nitrite. *Inflamm Res.* 2000; 49 (6): 280-289
- 100) Mainnemare A, Megarbane B, Soueidan A, Daniel A, Chapple IL. Hypochlorous acid and taurine-N-monochloramine in periodontal diseases. *J. Dent. Res.* 2004; 83 (11): 823-831
- 101) Marcinkiewicz J, Nowak B, Grabowska A, Bobek M, Petrovska L, Chain B. Regulation of murine dendritic cell functions in vitro by taurine

chloramine, a major product of the neutrophil myeloperoxidase-halide system. *Immunology*. 1999; 98 (3): 371-378

102) Stapleton PP, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Taurine and inflammation: a new approach to an old problem? *J Leukoc Biol*. 1997; 61 (2):231-232

103) Nagl M, Teuchner B, Pöttinger E, Ulmer H, Gottardi W. Tolerance of N-chlorotaurine, a new antimicrobial agent, in infectious conjunctivitis-a phase II pilot study. *Ophthalmologica*. 2000; 214 (2): 111-114

104) Tatsumi T, Fliss H. Hypochlorous acid and chloramines increase endothelial permeability: possible involvement of cellular zinc. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 1994; 267 (4): 1597- 1607

105) Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Stelmaszynska T. Taurine chloramine, a product of activated neutrophils inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. *J Leukoc Biol*. 1995; 58 (6): 667–674.

106) Park E, Quinn MR, Wright CE, Schuller-Levis G. Taurine chloramine inhibits the synthesis of nitric oxide and the release of tumor necrosis factor in activated RAW 264,7 cells. *J. Leukoc. Biol*. 1993; 54 (2): 119-124

107) Kim C, Park E, Quinn MR, Schuller-Levis G. The production of superoxide anion and nitric oxide by cultured murine leukocytes and the accumulation of TNF- α in the conditioned media is inhibited by taurinechloramine. *Immunopharmacology*. 1996; 34 (2-3): 89–95

- 108) McLoughlin DM, Stapleton PP, Bloomfield FJ. Influence of taurine and a substituted taurine on the respiratory burst pathway in the inflammatory response. *Biochem. Soc. Trans.* 1991; 19 (1): 73-78
- 109) Schaffer SW, Jong CJ, Ramila KC, Azuma J. Physiological roles of taurine in heart and muscle. *J Biomed Sci.* 2010 Aug ; 24;17
- 110) Yamori Y, Taguchi T, Hamada A, Kunimasa K, Mori H, Mori M. Taurine in health and diseases: consistent evidence from experimental and epidemiological studies. *Biomed Sci.* 2010; 24;17 Suppl 1:S6.
.
- 111) Watson JD, Crick FHC. "A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid", *Nature* vol. 1953;171, pp. 737-738
- 112) Bartlett Stirling. A Short History of the Polymerase Chain Reaction, *Methods Mol Biol.* 2003; 226:3-6
- 113) Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES, Kornberg A. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. I. Preparation of Substrates and Partial Purification of an Enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1958;233(1): 163-170
- 114) Brock TD, Freeze H. *Thermus aquaticus*, a Nonsporulating Extreme Thermophile. *J Bact.* 1969; 98(1): 289-297
- 115) Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Molec. Biol.* 1971;56:341-61
- 116) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 1977;74(12):5463-7.

117) Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91 (12): 5695–5699.

118) Joseph Sambrook and David W. Russel. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction, 2000; Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

119) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science.* 1988; 239 (4839): 487–91.

120) Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Slesarev AI. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. *Trends Biotechnol.* 2004;22 (5): 253–260.

121) Primer 3 (v.0. 4. 0.) , <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

122) gene data bank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>.

123) Optimase protocol writer program,
<http://www.mutationdiscovery.com/md/MD.com/screens/optimase>

124) Bannerman DD, Goldblum SE. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 284(6):L899-914.

125) Weston RM, Jones NM, Jarrott B, Callaway JK. Inflammatory cell infiltration after endothelin–1-induced cerebral ischemia: histochemical

and myeloperoxidase correlation with temporal changes in brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007; 27(1):100-14

126) Thiernemann C, Ruetten H, Wu CC, Vane JR. The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol.* 1995; 116(7):2845-51.

127) Kirkebøen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1999; 43(3):275-88

128) Erdamar H, Türközkın N, Balabanlı B, Ozan G, Bircan FS. The relationship between taurine and 3-nitrotyrosine level of hepatocytes in experimental endotoxemia. *Neurochem Res.* 2007; 32(11):1965-8.

129) Ozan G. Kobay beyin dokusunda endotoksin-aracılı lipid, protein ve DNA oksidasyonu üzerine taurinin etkisinin incelenmesi. Doktora. Ankara: Gazi Üniversitesi;2007

130) Luiking YC, Hallemesch MM, Lamers WH, Deutz NE. The role of NOS2 and NOS3 in renal protein and arginine metabolism during early endotoxemia in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288(4):F816-22

131) Heemskerk S, Pickkers P, Bouw MP, Draisma A, van der Hoeven JG, Peters WH, Smits P, Russel FG, Masereeuw R. Upregulation of renal inducible nitric oxide synthase during human endotoxemia and sepsis is associated with proximal tubule injury. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006 Jul;1(4):853-62.

132) Wang W, Jittikanont S, Falk SA, Li P, Feng L, Gengaro PE, Poole BD, Bowler RP, Day BJ, Crapo JD, Schrier RW. Interaction among nitric

oxide, reactive oxygen species, and antioxidants during endotoxemia-related acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Mar;284(3):F532-7

133) Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res*. 1996 Sep;79(3):363-80.

134) Portnychenko AG, Harmatina OY, Kotsuruba AV, Moybenko OO. The role of nitric oxide in endotoxin-induced cardiodepression. *Exp Clin Cardiol*. 2005 Winter;10(4):223-8.

135) Poon BY, Raharjo E, Patel KD, Tavener S, Kubes P. Complexity of inducible nitric oxide synthase: cellular source determines benefit versus toxicity. *Circulation*. 2003 Sep 2;108(9):1107-12.

136) Liu YC, Chang AY, Tsai YC, Chan JY. Differential protection against oxidative stress and nitric oxide overproduction in cardiovascular and pulmonary systems by propofol during endotoxemia. *J Biomed Sci*. 2009 Jan 15;16:8.

137) Khadour FH, Panas D, Ferdinandy P, Schulze C, Csont T, Lalu MM, Wildhirt SM, Schulz R. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Sep;283(3):H 1108-15.

138) El-Mas MM, Fan M, Abdel-Rahman AA. Endotoxemia-mediated induction of cardiac inducible nitric-oxide synthase expression accounts for the hypotensive effect of ethanol in female rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Jan;324(1):368-75.

- 139) Yoshioka Y, Takeda N, Yamamuro A, Kasai A, Maeda S. Nitric oxide inhibits lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression and its own production through the cGMP signaling pathway in murine microglia BV-2 cells. *J Pharmacol Sci.* 2010 Jun;113(2):153-60.
- 140) Starkey SJ, Grant AL, Hagan RM. A rapid and transient synthesis of nitric oxide (NO) by a constitutively expressed type II NO synthase in the guinea-pig suprachiasmatic nucleus. *Br J Pharmacol.* 2001 Nov; 134(5): 1084-92.
- 141) Igarashi K, Akira S, Imaki J, Takeshita T. Systemic endotoxin induces gene expression of inducible nitric oxide synthase in fetal rat brain. *J Nippon Med Sch.* 2009 Oct;76(5):232-9.
- 142) Türközkan N, Ozan G, Bircan F, Balabanlı B, Erdamar H. Effect of taurine on the relationship between xanthine oxidase and 3- nitrotyrosine level in endotoxemia. (Yayında)
- 143) Kurosaki M, Li Calzi M, Scanziani E, Garattini E, Terao M. Tissue- and cell-specific expression of mouse xanthine oxidoreductase gene in vivo: regulation by bacterial lipopolysaccharide. *Biochem J.* 1995 ;306 (Pt 1):225-34.
- 144) Malle E, Buch T, Grone HJ. Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney Int.* 2003 Dec;64(6):1956-67.
- 145) Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol.* 1994 Dec;56(6):672-86.

- 146) Tang WH, Brennan ML, Philip K, Tong W, Mann S, Van Lente F, Hazen SL. Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2006 Sep 15;98(6):796-9.
- 147) Nurten T, Nihal S, Gonca O, Ozgür A, Halil Y, Filiz B, Barbaros B. Role of neutrophils in arginine-asymmetric dimethylarginine pathway subsequent to endotoxemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Sep;1173 Suppl 1:E55-9.
- 148) Parildar-Karpuzoğlu H, Mehmetçik G, Ozdemirler-Erata G, Doğru-Abbasoğlu S, Koçak-Toker N, Uysal M. Effect of taurine treatment on pro-oxidant-antioxidant balance in livers and brains of old rats. *Pharmacol Rep.* 2008 Sep-Oct;60(5):673-8.
- 149) Zhang F, Mao Y, Qiao H, Jiang H, Zhao H, Chen X, Tong L, Sun X. Protective effects of taurine against endotoxin-induced acute liver injury after hepatic ischemia reperfusion. *Amino Acids.* 2010 Jan;38(1):237-45
- 150) Hanna J, Chahine R, Aftimos G, Nader M, Mounayar A, Esseily F, Chamat S. Protective effect of taurine against free radicals damage in the rat myocardium. *Exp Toxicol Pathol.* 2004 Dec;56(3):189-94
- 151) Ekremoğlu M, Türközkan N, Erdamar H, Kurt Y, Yaman H. Protective effect of taurine on respiratory burst activity of polymorphonuclear leukocytes in endotoxemia. *Amino Acids.* 2007;32(3):413-7

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Yasemin
Soyadı : Aktaş Öztürk
Doğum Yeri ve Tarihi : ORDU–1977

Eğitimi:

- Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı (2003)
- Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Embriyoloji ve Histoloji Ana Bilim Dalı ve Tüp Bebek Ünitesi, Yardımcı Üreme Teknikleri Uygulama Eğitim Programı(2002)
- Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Lisans Eğitimi(2000)
- Ordu Anadolu Lisesi(1996)

Yabancı Dili:

İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Klinik Embriyoloji Derneği
Biyologlar Derneği

Bilimsel Etkinlikleri

Sertifikalar ve Ödüller

- Üremeye Yardımcı Tedavi Yöntemleri Eğitim Sertifikası, ICSI Uygulama Sertifikası, T.C. Sağlık Bakanlığı (2005)
- Vitrification System Hands-On Workshop Training Program, Irvine Scientific's (2005)
- Üremeye Yardımcı Tedavi Yöntemleri Eğitim Sertifikası, Embriyoloji Uygulama Kursu, T.C. Sağlık Bakanlığı (2003)
- XIII. Biyoteknoloji Kongresi, poster dalında üçüncülük ödülü (2003)

Katıldığı Yurtdışı Kongreler

- 25th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 2009, AMSTERDAM, HOLLANDA
- American Society for Reproductive Medicine,65th Annual Meeting (ASRM), 2007, WASHINGTON DC, AMERİKA
- American Society for Reproductive Medicine,63th Annual Meeting (ASRM), 2005, NEW ORLEANS, AMERİKA
- 20th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 2004, BERLİN, ALMANYA

Yayınlar

- The effectiveness of intracytoplasmic sperm injection combined with piezoelectric stimulation in infertile couples with total fertilization failure. Baltacı V, Ayvaz OU, Unsal E, Aktaş Y, Baltacı A, Turhan F, Ozcan S, Sönmezer M.Fertil Steril. 2009 May 20.
- Successful application of preimplantation genetic diagnosis for Leigh syndrome. Unsal E, Aktaş Y, Uner O, Baltacı A, Ozcan S, Turhan F, Baltacı V.Fertil Steril. 2008 Nov;90(5):2017.e11-3. Epub 2008 Sep 7.
- Preimplantation genetic diagnosis in two couples with balanced reciprocal translocations. Baltacı V, Satioğlu H, Unsal E, Uner O, Ergün MA, Batioğlu S, Sönmezer M, Kabukçu C, Aydinuraz B, Aktaş Y. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2007 Sep;134(1):126-7. Epub 2006 Jul 31
- Relationship between embryo quality and aneuploidies. Baltacı V, Satioğlu H, Kabukçu C, Unsal E, Aydinuraz B, Uner O, Aktas Y, Cetinkaya E, Turhan F, Aktan A.Reprod Biomed Online. 2006 Jan;12(1):77-82.

11. TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca değerli bilgi birikimi ve tecrübesi ile beni yönlendiren, tezimin hazırlanmasında ve doktorayı tamamlamamda büyük katkısı bulunan değerli danışmanım Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN'a, tüm sabır ve anlayışı için sonsuz teşekkürler ederim.

Doktora eğitimim boyunca bilgilerinden faydalandığım, başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU olmak üzere tüm bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım için bana laboratuvarlarını açan sayın hocalarım Prof. Dr. Volkan BALTACI ve Prof. Dr. Hakan GÜRDAL'a teşekkür ederim.

Her koşulda tüm destekleri ile yanımda olan sevgili dostlarım, ailem ve eşime sonsuz teşekkürler ederim.

YASEMİN AKTAŞ ÖZTÜRK