



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**RETROPERİTONEAL YAĞ DOKUSUNDA
FARKLI HOMOJENİZASYON
YÖNTEMLERİNİN SÜPEROKSİT DİSMUTAZ
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Büşra ULUIŞIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**RETROPERİTONEAL YAĞ DOKUSUNDA
FARKLI HOMOJENİZASYON
YÖNTEMLERİNİN SÜPEROKSİT DİSMUTAZ
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Büşra ULUIŞIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2019

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Büşra ULUIŞIK'ın hazırladığı **“Retroperitoneal Yağ Dokusunda Farklı Homojenizasyon Yöntemlerinin Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi”** başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ahmet ALVER

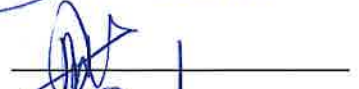


Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

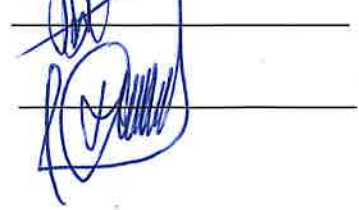
Prof. Dr. Ahmet ALVER



Prof. Dr. Birgül KURAL



Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU



Tarih: 24/05/2019

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve ...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 20/06/2019

Büşra ULUIŞIK

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilimsel açıdan bana önemli katkı sağlayan, tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle yol gösterici olan, tez çalışmam süresince göstermiş olduğu hoşgörü, inanç ve desteğinden dolayı değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER'e teşekkür etmeyi borç bilirim. Ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca tüm emekleri için Sayın Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Çalışmam sırasında yardımlarını benden esirgemeyen, destek ve katkıları ile her zaman yanımda olan Arş. Gör. Elif ŞAHİN'e, Arş. Gör. Neslihan SAĞLAM'a, doktora öğrencisi Yeşim SELVİ'ye ve Öğr. Gör. Nihal TÜRKMEN'e,

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm araştırma görevlisi, doktora, yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Tüm aşamalarda varlıklarını hissettiğim her daim yanımda olan sevgili eşim ve kızıma en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Büşra ULUIŞIK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Yağ Dokusu	4
4.1.1. Beyaz Yağ Dokusu ve Fonksiyonu	5
4.2. Yağ Dokusu-İnflamasyon ve Obezite	5
4.3. Antioksidan Savunma-Serbest Radikaller-Obezite	6
4.4. Süperoksit Dismutaz (SOD)	8
5. GEREÇ ve YÖNTEM	12
5.1. Gereçler	12
5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	12
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ticari Kitler	13
5.1.3. Kullanılan Doku	13
5.2. Yöntem	14
5.2.1. Yağ Dokusunda Homojenizasyon Yöntemleri	14
5.2.1.1. Kullanılan Çözeltiler	14
5.2.1.2. Homojenizasyon Yöntemi-1	14
5.2.1.3. Homojenizasyon Yöntemi-2	14
5.2.1.4. Homojenizasyon Yöntemi-3	15
5.2.2. Protein Miktar Tayini	15
5.2.3. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü	16

5.2.4. SOD Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	16
5.2.5. İstatiksel Analiz	18
6. BULGULAR	19
6.1. Retroperitoneal Yağ Dokusunda Protein Miktarı Ölçüm Sonuçları	19
6.2. Retroperitoneal Yağ Dokusunda SOD Ölçüm Sonuçları	19
6.3. Yöntemlere Göre Spesifik Aktivite Sonuçları	21
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	23
8. KAYNAKLAR	28
9. ÖZGEÇMİŞ	33



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler	12
Tablo 2.	Kullanılan kimyasal maddeler, ticari kit ve üretici firmalar	13
Tablo 3.	SOD aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları	17
Tablo 4.	Kullanılan üç yöntemde elde edilen protein miktarı sonuçları	19
Tablo 5.	Homojenizasyon-1 yöntemine göre spesifik aktivite sonuçları	20
Tablo 6.	Homojenizasyon-2 yöntemine göre spesifik aktivite sonuçları	20
Tablo 7.	Homojenizasyon-3 yöntemine göre spesifik aktivite sonuçları	21



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	Protein standart grafiği	16
Şekil 2.	SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği	18
Şekil 3.	SOD aktivitesinin üç homojenizasyon yöntemine göre dağılımı	22



KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİSİ

Kısaltmalar

BCA	Bisinkoninik asit
BYD	Beyaz yağ dokusu
KYD	Kahverengi yağ dokusu
CRP	C-reaktif protein
IL-6	İnterlökin-6
O₂⁻	Süperoksit radikali
OS	Oksidatif stres
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SOD 1	Süperoksit dismutaz-1
SOD 2	Süperoksit dismutaz-2
SOD 3	Süperoksit dismutaz-3
TG	Trigliserit
TNF-α	Tümör nekroz faktör- α

Simgeler

α	Alfa
μ	Mikro
γ	Gama
U	Ünite

1. ÖZET

Retroperitoneal Yağ Dokusunda Farklı Homojenizasyon Yöntemlerinin Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Beyaz yağ dokusu, fazlalık enerjinin depolandığı önemli bir endokrin ve metabolik organdır. Obezite, diyabet ve inflamatuvar hastalıklar gibi çeşitli patolojik koşullarla ilişkili yeni moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılmasında beyaz yağ dokusu büyük değere sahiptir. Obezite, yağ dokusundaki oksidan-antioksidan dengesinin bozulmasıyla artan oksidatif stres ve beraberinde oluşan düşük dereceli inflamasyon ile karakterize olan metabolik bir bozukluktur. Süperoksit dismutaz (SOD), reaktif oksijen türleri (ROT) ve özellikle süperoksit anyon radikallerine karşı antioksidan savunma sistemlerinin ilk ve en önemli çizgisidir. Yağ dokusunun protein içeriğinin oldukça düşük olması ve izolasyonunun güçlüğü birbirinden farklı homojenizasyon yöntemlerinin uygulanmasına sebep olmuştur. Çalışmamızda, retroperitoneal yağ dokusunda farklı protein izolasyon yöntemlerinin kullanılmasının SOD aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi ile Sun ve Oberley yöntemi için gerekli şartların ortaya konulması amaçlanmıştır. Sıçandan retroperitoneal yağ dokusu temin edilip üç farklı homojenizasyon yöntemi için kullanıldı. Homojenizasyon 1 (H1)'de lipidleri uzaklaştırmak için organik çözücü olarak kloroform/metanol, homojenizasyon 2 (H2)'de etanol/kloroform ve homojenizasyon 3 (H3)'de ise sadece kloroform kullanıldı. Homojenizasyonun ardından doku SOD aktivitesi ölçüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda H1 yönteminin ortalama spesifik aktivite değerleri diğer iki yönteme göre daha büyük bulundu ($p=0.009$). Sonuç olarak, yağ dokusunda SOD aktivite tayininde kullanılabilecek üç farklı homojenizasyon yöntemi karşılaştırıldığında, polar karakterli metanolün kullanıldığı ve soğuk ortamın devam ettiği H1 yönteminin SOD aktivitesi tayininde daha etkili olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar sözcükler: Homojenizasyon, Obezite, Oksidatif stres, Süperoksit dismutaz, Yağ dokusu

2. SUMMARY

The Effect of Different Homogenization Methods on Superoxide Dismutase Activity in Retroperitoneal Fat Tissue

White adipose tissue is an important endocrine and metabolic organ in which redundant energy is stored. White adipose tissue has great value in detecting new molecular mechanisms associated with various pathological conditions such as diabetes and inflammatory diseases. Obesity is a metabolic disorder characterized by oxidative stress and impaired low-grade inflammation caused by the deterioration of oxidant-antioxidant balance in adipose tissue. Superoxide dismutases (SOD) are the first and most important line of antioxidant defense systems against reactive oxygen species (ROS) and especially superoxide anion radicals. Due to the low protein content of adipose tissue and the difficulty of isolation different homogenization methods have been proposed. Our study was designed to investigate the effect of the protein isolation methods on SOD activity in different retroperitoneal fat tissues. Besides we aimed to determine the conditions necessary for the Sun and Oberley method. Retroperitoneal adipose tissue was obtained from the rat and used for three different homogenization methods. In homogenization 1 (H1), chloroform/methanol was used as organic solvent to remove lipids, ethanol/chloroform in homogenization 2 (H2) and chloroform in homogenization 3 (H3). Tissue SOD activity was measured after homogenization. As a result of the statistical evaluations, mean specific activity values of H1 method were found to be higher than the other two methods ($p=0.009$). Consequently, when comparing three different homogenization methods that can be used in the determination of SOD activity in adipose tissue, it was concluded that the H1 method, which uses polar character and the cold environment, is more effective in determining SOD activity.

Keywords: Fat tissue, Homogenization, Obesity, Oxidative stress, Superoxide dismutase

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Adipoz doku aktif bir endokrin organ ve vücudun ana enerji deposu olarak kabul edilmektedir. Organizma için oldukça önemli olan biyoaktif maddeler ile pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar faktörler bu doku tarafından üretilir ve salgılanır (1). Bu inflamatuar süreçte beyaz yağ dokusu metabolik olarak daha aktif olup daha fazla öne çıkmaktadır (2).

Yağ dokusundaki kronik inflamasyonun obeziteye bağlı metabolik disfonksiyonun gelişmesinde kritik rolü vardır (1). Adipoz dokunun genişlemesi ve adipoz doku fonksiyon bozukluğunun neden olduğu adipokinlerin düzensiz üretimi veya salgılanması obezite ile ilişkili metabolik hastalıkların gelişmesine katkıda bulunmaktadır (3).

Alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması nedeniyle yağ dokusu artışı olarak tanımlanan obezite, birçok problemi beraberinde getiren, yaygınlığı dünyada ve ülkemizde gittikçe artan ciddi bir sağlık problemidir. Obezite sonucu artan metabolik yük nedeniyle metabolik yollarda aşırı bir faaliyet gerçekleşir. Bunun sonucunda da serbest radikal türlerinde artış meydana gelir ve bu da oksidatif strese neden olur. Serbest radikallerin neden olduğu zararlı etkileri ortadan kaldırmak için hücrenin antioksidan savunma sistemi ve dışarıdan besinlerle alınan antioksidanlar devreye girer (4).

Süperoksit dismutaz (SOD), canlı hücreleri reaktif oksijen türlerine karşı koruyan başlıca antioksidan savunma enzimidir. Memelilerde sitoplazmik Cu/ZnSOD (SOD1), mitokondriyal MnSOD (SOD2) ve hücre dışı Cu/ZnSOD (SOD3) şeklinde üç SOD izoformundan oluşur. Her bir izoform aktif bölgelerinde bulunan metal kofaktörleri sayesinde O_2^- - H_2O_2 dönüşümünü katalize etmektedir (5).

Yağ dokusu, yüksek yağ içeriğine sahip olduğu ve protein miktarı toplam doku kütlelerinin %2'sinden daha az olduğu için beyaz yağ dokusu proteinlerinin izolasyonu ve analizi analitik olarak zorlayıcıdır (6). Bu çalışmada, retroperitoneal yağ dokusunda Sun ve Oberley yöntemiyle yapılan SOD aktivite tayininde kullanılabilecek literatürlerde geçen üç farklı homojenizasyon yöntemi karşılaştırılıp süperoksit dismutaz ölçümü için gerekli şartların ortaya konulması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Yağ Dokusu

Yağ dokusu lipidle dolu hücrelerin gevşek olarak bağlanmasıyla oluşur. Adipoz doku başta adiposit olmak üzere stroma vasküler fraksiyonu oluşturan makrofajlar, fibroblastlar, kan hücreleri, endotel hücreleri, preadipositler de dahil olmak üzere kollojen fiberleri ve kan damarlarıyla beraber birçok hücre tipini bir arada bulunduran heterojen özellikte bir dokudur (7).

Adipoz doku enerjinin depo edildiği bir doku olmakla beraber, endokrin bir yapı gibi metabolik dengeyi etkileyen biyolojik olarak aktif birçok maddeyi salgılama özelliğiyle metabolik anlamda dinamik bir organdır (8).

Yağ dokusu hücre yapısı, yerleşimi, rengi, damarlanması ve fonksiyonuna bağlı olarak temelde beyaz ve kahverengi olmak üzere iki çeşittir. Beyaz yağ dokusu (BYD), subkutan ve visceral yağ depoları hücrelerinden oluşan tipik yağ hücreleridir. Kahverengi adipositler ise çoğu memeli türünde termogeneze rol oynayan daha küçük kahverengi yağ depolarını içerir (9-11).

Beyaz yağ dokusu (BYD), vücudun başlıca enerji depolama bölgesiyken kahverengi yağ dokusu bol miktarda mitokondriye sahip hücreler bulundurduğu için ısı üretimi ve enerji tüketimiyle özelleşmiş bir dokudur (12).

Kahverengi yağ dokusu (KYD), çoğunlukla yağ asitlerini hızla okside edebilen ve spesifik fizyolojik durumlara yanıt olarak ısı üretebilen kahverengi adipositlerden oluşur. Yağ oranı ve kahverengimsi rengi nedeniyle kolayca gözlemlenebilir. Özellikle yeni doğan memelilerde görülen bu dokunun bolluğu zamanla bireyin yaşına göre değişir (12).

Beyaz yağ dokusu ile karşılaştırıldığında kahverengi yağ dokusu, multiloküler lipid damlacıkları, zengin damarlaşma ve fazla sayıda mitokondrisi ile karakterizedir. Kahverengi yağ dokusu depolarının fazlaca vasküler olması arteriyel venöz anastomoz sayısını arttırarak yüksek ısı dağılımına izin verir. Bir sıçanın soğuğa maruz kaldıktan

sonra, kahverengi yağ dokusu depolarındaki kan akışı, birkaç dakika içinde on kat artar, böylece ısınmış kan beyin, kalp ve böbrekler gibi önemli bölgelere gönderilir (12, 13).

4.1.1. Beyaz Yağ Dokusu ve Fonksiyonu

Beyaz yağ dokusunun temel görevi serbest yağ asitlerini trigliserit (TG) olarak depolamaktır. İhtiyaç halinde ise depolamış olduğu TG'lerin lipolizi ile bu depolardan serbest yağ asitlerinin dolaşıma katılmasını sağlarlar. Beyaz yağ dokusu enerji depolamanın yanı sıra özel biyolojik fonksiyonları olan adipokin adı verilen son derece aktif medyatörleri, proteinleri, hormonları ve sitokinleri salgılamaktadır. Böylelikle başta metabolizmanın düzenlenmesi olmak üzere pek çok fizyolojik süreçte rol oynamaktadır (4, 14).

Beyaz yağ dokusu yerleşim bakımından subkutan ve viseral şeklinde sınıflandırılır. Subkutan yağ dokusu deri altında bulunur ve karın ile bacaklarda belirgin şekilde bulunmaktadır. Viseral yağ dokusu ise karın içi bölgede iç organların çevresinde bulunur. Viseral yağ dokusunun epididimal, inguinal, mezenterik, epikardiyal ve retroperitoneal gibi çeşitleri bulunmaktadır (14, 15). Normal ağırlıktaki bir insan vücudunda yağ dokusunun yaklaşık %80'i yüzeysel ve derin subkutan yağ dokusu iken kalan %20'si ise viseral yağ dokusudur (16).

Viseral ve subkutan yağ dokusu bölgesel olarak farklılık gösterdiği gibi işlevsel olarak da farklılıklar bulundurmaktadır. Viseral yağ dokusu, subkutan yağ dokusuna kıyasla metabolik olarak daha fazla aktiftir ve lipolitik özelliği daha fazladır. Ayrıca viseral yağ dokusu daha zengin damar ağı ve sinirsel innervasyon yapısı ile daha çok pro-inflamatuar ve immün hücre özelliği taşımaktadır. Aynı zamanda insülin direnci ile ilişkili olan viseral yağ dokusu genel olarak diyabet, obezite gibi metabolik olaylarda subkutan yağ dokusuna göre daha fazla belirleyici olmaktadır (14, 16).

4.2. Yağ Dokusu-İnflamasyon ve Obezite

Obezite tüm dünyada gün geçtikçe artan önemli bir sağlık sorunudur. Adipoz kütle birikimi ile karakterize olup, adipositlerin büyüklüğünde ve sayısında artışa neden olmaktadır. Kilo alımı sırasında, adipositler büyür (hipertrofi) ve lipidleri biriktirir. Adipositler süresiz olarak lipid biriktiremediklerinden, yeni olgun adipositler oluşturmak için adiposit öncülerini toplayacaktır. Bu sürece de hiperplazi denir (17).

Adipoz doku hücre sayısı ve büyüklüğü bakımından enerji ihtiyacı ve tüketimine bağlı olarak, yaşam boyu sürekli hacim değişikliği gösterir. Vücudun ihtiyacından fazla enerji alınması nedeniyle yağ dokusu artışı olarak tanımlanan obezite, diyetle fazla kalori alınması dışında fiziksel aktivitenin azalması ve genetik yatkınlık gibi pek çok sebebe dayandırılmaktadır (18).

Son yıllarda özellikle obezite ve obezitenin en sık görülen komplikasyonları olan tip 2 diyabet, hipertansiyon gibi hastalıkların insidansında artış gözlenmektedir. Obezite nedenli hastalıkların patogeneğinde adipoz dokunun endokrin bir yapı gibi tüm vücuda etki etmesi rol almaktadır (18, 19).

Aşırı yağlanma bozulmuş glukoz ve lipid homeostazının yanı sıra, çeşitli metabolik hastalıkların gelişimine katkıda bulunan, adipokinler olarak adlandırılan çeşitli salgı faktörlerinin düzensizliğine yol açmaktadır. Obezite durumunda adiposit, çeşitli pro-inflamatuar kemokinlerin (Monosit kemoatraktan proteini 1, MCP1) ve sitokinlerin (Tümör nekroz faktör- α , TNF- α) salgılanmasını artırarak obezitenin neden olduğu inflamasyonun gelişiminin ayrılmaz bir parçası olur. Ayrıca, yağ dokusunun makrofaj içeriği hem adiposit büyüklüğü hem de vücut kitlesi ile pozitif korelasyon göstermektedir. TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonu çoğunlukla adipositlerden ziyade makrofajlardan elde edilir. Yağ dokusunda bu makrofaj sayısındaki artış beraberinde bu hücrelerde anti-inflamatuar M2 polarizasyon durumundan pro-inflamatuar M1 polarizasyon duruma geçişine neden olur. Böylece adipoz doku yatakları içindeki iltihaplı ortamı genişletir. Biriken M1 makrofajlar ve bu makrofajlardan üretilen pro-inflamatuar faktörlerin etkisiyle adipoz doku inflamasyonu ve fonksiyon bozukluğu sürdürülmektedir (1, 20).

4.3. Antioksidan Savunma-Serbest Radikaller-Obezite

Serbest radikaller, yapısında en az bir tane eşleşmemiş elektron bulunduran son derece reaktif karakterdeki atom veya molekülleri ifade eder. Kararsız özellikteki bu tanecikler potansiyel olarak toksiktir (21). Hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikalleri önemli reaktif oksijen türleridir. Fizyolojik koşullarda, mitokondri, solunum zinciri boyunca elektron sızıntısı nedeniyle reaktif oksijen türleri (ROT) üretiminin ana bölgesidir. Düşük konsantrasyonlarda ROT, patojenik mikroorganizmalara ve hücre içi sinyal iletimine karşı immün aracılı savunma dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik

etki gösterirken, yüksek konsantrasyonları lipid, proteinler ve DNA'ya zarar verebilir. Böylece hücrel fonksiyon bozukluğuna yol açabilir. ROT'ni doğru seviyelerde tutmak ve serbest radikallerin oluşturduğu sitotoksisteyi en aza indirmek için antioksidan savunma sistemi oldukça önemlidir (22, 23).

Canlı metabolizmasında oksidasyonun oluşması son derece olağan bir durumken, sağlıklı bir şekilde yaşamın devamı için organizmanın oksidan-antioksidan dengesini koruması şarttır. Bu dengenin oksidanların lehine bozulması oksidatif stres olarak ifade edilir (21).

Oksidatif stresin (OS) obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi patolojik süreçlerde rol aldığı bilinmektedir. Obezitenin OS'i indükleyebileceği ve aynı zamanda OS'in metabolik sendromun gelişimine katkıda bulunan düzensiz adipokin üretimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Obezitede C reaktif protein, TNF- α ve IL-6 gibi inflamatuvar belirteçler yani oksidatif hasar belirteçleri daha yüksek olurken buna karşılık antioksidan savunma belirteçlerinde de değişiklikler görülmektedir (4, 24).

Obezite ile ilişkili OS' deki artış büyük oranda aşırı adipoz dokunun kendisinin varlığından kaynaklanmaktadır, çünkü adipositler ve preadipositler TNF- α , IL-1 ve IL-6'yı içeren bir pro-inflamatuvar sitokin kaynağı olarak tanımlanmıştır. Bu sitokinler, makrofajlar ve monositler reaktif oksijen ve azot üretimi için güçlü uyarıcılardır; Bu nedenle, artan OS'den sitokinlerin konsantrasyonundaki artış sorumlu olabilir. Ayrıca obeziteyle mekanik yük ve miyokardiyal metabolizma artmaktadır. Dolayısıyla oksijen tüketimi de artar. Artan oksijen tüketiminin olumsuz bir sonucu olarak mitokondriyal respirasyon kaynaklı ROT retiminde artış görülmektedir (24).

Yağ hücrelerinde, aşırı yağ birikimi sonucu oluşan basınç etkisinden dolayı hücrel hasara oluşabilir. Oluşan bu hücrel hasara bağlı olarak, dokularda ROT üreten ve lipid peroksidasyonu uyaran TNF- α gibi sitokinlerin üretimi uyarılır. Böylece obezitede, oksidatif stres ile adipoz doku kütle artışının orantılı olduğu söylenebilir. Diğer olası mekanizmalardan birisi de doğrudan diyetle ilişkilidir. Diyetle antioksidan kapasiteyi aşacak miktarda serbest yağ asidi alımı lipid peroksidasyonunu uyarak, oksidatif stresi indükleyebilir (24, 25).

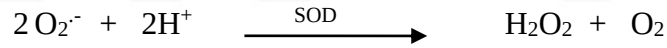
Özetle, obezlerde yağ dokusuna makrofaj infiltrasyonunun artışı, TNF- α ve IL-6 sentezinde artışa, adiponektin ve IL-10 sentezinde azalmaya sebep olarak, yağ

dokusunda inflamasyon gelişimine neden olur. İnflamatuar sitokinlerin dokudaki artışı serbest radikallerin üretimini uyarır. Ayrıca süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerin aktivitesini azaltarak, doku total antioksidan kapasitesinin azalmasına sebep olur (4, 25).

İnsan vücudu serbest radikallerin başlattığı zincir reaksiyonlarını bloke eden mükemmel bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. SOD, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) endojen kaynaklı önemli enzimatik antioksidanlardır. Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında glutatyon, ürik asit, bilirubin, albumin, koenzim Q₁₀, selenyum, α-lipoik asit, seruloplazmin ve transferrin sayılabilir (26).

4.4. Süperoksit Dismutaz (Süperoksit Oksidoredüktaz, EC: 1.15.1.1, SOD)

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1) süperoksit radikallerinin dismutasyonunu moleküler oksijen ve hidrojen peroksite katalize eden bir metalloenzimlerdir. Katalitik aktivitesi çok yüksek olup oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunmaktadır. SOD ailesi ROT'ne karşı ilk savunma hattını oluşturduğu için oksijen toksisitesine karşı önemli bir savunma olarak görülmektedir (26-28).



Metal kofaktöre bağlı olarak üç ana süperoksit dismutaz ailesi vardır. Hem bakır hem de çinkoyu bağlayan Cu/ZnSOD, mangan veya demiri bağlayan Fe/MnSOD ve nikeli bağlayabilen NiSOD izoformundan oluşur (29).

Tüm memelilerde ve çoğu omurgalılarda ise süperoksit dismutaz enzimi üç yapıya ayrılarak sınıflandırılmıştır. Bakır-çinko içeren SOD (SOD1, Cu/ZnSOD) primer olarak sitoplazmada ve nükleer kompartmanda lokalizedir. Monomer başına bir Cu ve bir Zn atomu içeren özdeş alt birimlerden oluşan 32 kDa ağırlığında homodimer yapıdadır (6, 30, 31). SOD1'deki mutasyonların ölümcül nörodejeneratif hastalık olan amotrofik lateral skleroza (ALS) neden olduğu bilinmektedir (29, 32).

Mangan içeren SOD (SOD2, MnSOD) mitokondride bulunur. 96 kDa ağırlığında homotetramer yapıda bulunur. Enzimin aktif bölgesinde bulunan Mn, O₂⁻'nin oksijene ve H₂O₂'ye tıpkı SOD1 ve SOD3'de olduğu gibi katalize edilmesini sağlar. Sitoplazmada sentezlenir ve bir sinyal peptidi tarafından mitokondriyaya yönlendirilir,

burada solunum zinciri tarafından üretilen $O_2^{\cdot-}$ 'yi dönüştürür (6, 26). Mitokondriyal MnSOD kritik olarak gereklidir, çünkü hücrel ROT'nin %90'ı bu organelde üretilir. Mitokondriyal DNA, aşırı oksijen metabolizması nedeniyle oksidatif hasara özellikle duyarlıdır. Mitokondriyal MnSOD için önemli hücrel fonksiyon, fareler üzerinde yapılan çalışmalar ile vurgulanmıştır. MnSOD eksikliğinde dilate kardiyomiyopati, hepatik lipid birikimi, mitokondriyal defektler ve erken yenidoğan ölümü gözlenmiştir (29). Ayrıca MnSOD'un bir tümör baskılayıcı gen olarak etki ettiği ve MnSOD için heterozigot farelerde bazı kanser türlerinin görülme sıklığında artış gözlenmiştir (32).

Ekstrasellüler SOD (SOD3, ECSOD) ekstrasellüler alanda bulunur ve yapısında Cu ve Zn vardır. Enzim heparin için yüksek afiniteli 135 kDa ağırlığa sahip bir homotetrameri olarak bulunur. Bu enzim, bazik aminoasit uçları bakımından zengin C-terminalinde bulunan heparin bağlama bölgesi nedeniyle heparin ve diğer asidik glikozaminoglikanlar için afinite sergiler. Doku dağılımı türler arasında değişir, ancak genel olarak SOD3, kan damarları, akciğer, böbrek, uterus gibi dokularda ve daha az miktarda kalpte sentez edilir. Genetik olarak değiştirilmiş fareler ve viral aracılı gen transferini kullanan çalışmalarla elde edilen bulgular sonucunda, SOD3'ün hücre dışı alandaki önemini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmalar SOD3'ün hipertansiyon, kalp yetmezliği, iskemik reperfüzyon hasarı ve akciğer hasarı gibi çeşitli oksidatif strese bağlı patofizyolojilerde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (6, 26, 32).

SOD1 (Cu/ZnSOD) 153 aminoasit, SOD3 (ECSOD) 222 aminoasitten oluşur. Aktif bölgeleri yaklaşık %50 homoloji gösterir. SOD1 ile karşılaştırıldığında SOD3'ün farklı bölgesi,

1. Hücreden salgılanmasına izin veren bir N-terminal sinyal peptidi,
2. SOD3'ün SOD1'den ayrılmasında yararlı olan ve proteinin çözünürlüğünü büyük ölçüde arttırdığı Asn-89'da N-bağlı bir glikozilasyon bölgesi,
3. Heparin bağlayıcı bölgeye karşılık gelen C-terminal bölgesi, pozitif yüklü uç kümesine sahiptir.

SOD2 (MnSOD) ise 198 aminoasitten oluşur. SOD1 ve SOD3'e homoloji göstermezler, fakat ökaryotlarda genellikle olmayan FeSOD'unkine benzer yapıdadır (6, 32).

Cu/ZnSOD, FeSOD ve MnSOD enzimleri farklı inhibitörlere duyarlıdır ve bunlar farklı inhibe edici reaksiyonlara dayanarak ayırt edilebilir. Cu/ZnSOD'lerin aktivitesi KCN tarafından inhibe edilirken, FeSOD ve MnSOD aktivitesi KCN tarafından inhibe edilmez. Ayrıca kloroform-etanol (1:3,V/V) bileşen çözücüsü içinde inkübe edildiğinde ise FeSOD ve MnSOD aktivitesi neredeyse kaybedilirken, Cu/ZnSOD kloroform-etanole karşı duyarlı değildir. FeSOD'lar ve MnSOD'lar oldukça homolog olup yapısal benzerlik sergilerler. Her ikisi de H₂O₂'ye farklı hassasiyetleriyle ayırt edilebilir, çünkü MnSOD aktivitesi H₂O₂'ye duyarlı değildir (28).

SOD'ın enzimatik fonksiyonu, ROT aracılı hasar ile birçok hastalık durumuna bağlı olduğundan hücredeki koruyucu rolü azımsanamaz. Obezitede, redoks durumunda değişiklik ve metabolik yük artışı söz konusudur. Obez deneklerde, değişen lipid ve glukoz metabolizması, kronik inflamasyon, doku disfonksiyonu, hiperleptinemi ve anormal prandial ROT üretimi dahil olmak üzere oksidatif strese sorumlu çeşitli mekanizmalar vardır. Daha önce pek çok çalışmayla obezite, OS belirteçlerinin artışından anlamlı şekilde sorumlu tutulmuştur (23, 29, 33).

Çeşitli hastalıklarda süperoksit dismutaz aktivitelerindeki değişiklik klinik olarak ilgi çekici görünmektedir (27). Obezitede, adipoz dokunun artması üzerine süperoksit dismutaz aktivitesinin sağlıklı kişilere göre önemli ölçüde düşük olduğu pek çok çalışmada ifade edilmiştir. Yalnız obezite değil patolojik sendromların çoğunda artmış ROT üretimi ile ilişkili olarak SOD aktivitesinde değişiklikler gözlenmiştir. Obezite ayrıca hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanların konsantrasyonunu ve aktivitesini etkiler. Vücut yağları, merkezi yağlanma ve toplam antioksidan kapasite arasında ters bir ilişki olduğuna dair kanıtlar vardır (34).

Obezitede antioksidan sistemin konsantrasyonu ve aktivitesi hakkında farklı sonuçlar da mevcuttur. Bazı çalışmalar obezitenin bir sonucu olarak yüksek seviyelerde serbest radikal ürünlerin antioksidan enzimlerin aktivitesinin artmasına neden olduğunu gösterirken öte yandan, obezitede antioksidan durumun konsantrasyon ve aktivitesinin azaldığını gösteren bazı çalışmalara da rastlanmaktadır (22, 23). Olusi (35), yaptığı çalışmada obez bireylerde normal deneklere kıyasla daha düşük eritrosit Cu/ZnSOD aktivitesi olduğunu bulmuştur. Bununla birlikte, Kobayasi ve ark. (36) obez farelerde Cu/ZnSOD aktivitesinin arttığını bulmuşlardır. Bu çelişkili sonuçlar şişmanlığın yaşı ve

süresi ile ilişkili olabilir. Antioksidan sistemi, obezitenin erken aşamasında indüklenirken, uzun süreli obezitede, antioksidanların kaynağı tükenmekte ve bu enzimlerin seviyelerinde azalmaya yol açmaktadır (22, 23).

SOD'ların pek çok hastalıktaki önemi göz önüne alındığında, antioksidan tedaviler kavramı, yani, oksidatif strese karşı daha etkili bir şekilde korunmak için endojen antioksidan savunmaların güçlendirilmesi zamanla önemli bir ilgi alanı olmuştur (19).

Son yıllarda süperoksit dismutaz mimetiği olan manganez porfirinlere odaklanılan pek çok klinik çalışma mevcuttur. Manganez (III) meso-tetrakis (N etilpiridinyum-2-il) porfirin (MnP), süperoksit gibi reaktif oksijen türlerini temizleyen birinci sınıf oksidoredüktazdır, aynı zamanda anti-inflamatuar özelliklere de sahiptir. Farklı bir manganez porfirin olan manganez tetrakis-benzoik asit porfirin (MnTBAP) de, obeziteye bağlı insülin direncinin ilerlemesini iyileştirmedeki rolü için araştırılmıştır. Çalışmalarla manganez porfirinlerin sadece radikal temizleyici olarak davranmadığı aynı zamanda güçlü bir anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (19).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve malzemeler üretici firmaları ile Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler

Kullanılan Cihazlar, Aletler	Üretici Firmalar
Etüv	Shel Lab
Vorteks	IKA Vortex Genius 3
Mikropleyt	Greiner Bio-one
Manyetik Karıştırıcı	İkamag RH
Otomatik Pipet, 100-1000 µL	Socorex
Otomatik Pipet, 20-200 µL	Eppendorf Research
Otomatik Pipet, 0,5-10 µL	Eppendorf Research
Otomatik Sekiz Kanallı Pipet, 20-200 µL	Eppendorf Research
pH metre	Hanna Instruments
Homojenizatör	Ultra-Turrax T 25
Hassas Terazî	Mettler Toledo AB204-S
Soğutmalı Santrifüj	Centrifuge 5804 R
İnkübatör	Shel Lab, Heraeus
Mikropleyt okuyucu	VERSA max
Cam Deney Tüpleri	SH&GLASS

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ticari Kitler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler, ticari kit ve üretici firmaları ile Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler, ticari kit ve üretici firmaları

Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kit	Üretici Firma
Ksantin	Sigma
Etilendiamintetraasetik Asit	Merck
Nitroblue Tetrazolium	Sigma
Sığır Serum Albümin(BSA)	Sigma
Amonyum Sülfat	Merck
Bakır(II) Klorür	Sigma
Ksantin Oksidaz	Sigma
Kloroform	Sigma
Metanol	Sigma
SOD Standardı	Sigma
Sodyum Klorür	Merck
Etanol	Sigma
Tris	Ambresco
HEPES	Ambresco
Hidroklorik Asit	Sigma
BCA Protein miktar tayini kiti	Novagen,Merck Millipore/71285-3

5.1.3. Kullanılan Doku

Retroperitoneal yağ dokusu elde etmek için, Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde farklı çalışmalar için kurban edilmiş, erkek Sprague Dawley ırkı ratın retroperitoneal yağ dokuları kullanılmıştır.

5.2. Yöntemler

5.2.1. Yağ Dokusunda Homojenizasyon Yöntemleri

5.2.1.1. Kullanılan Çözeltiler

Tris Tamponunun Hazırlanması: 3.03 g Tris, 4.38 g NaCl ve 0.04 g EDTA bir miktar saf suda çözüldükten sonra karışımın pH'sı 1 M HCl ile 7.4'e ayarlandı. Son hacim 500 mL'ye tamamlandı (Homojenizasyon-1 yönteminin tamponu).

HEPES Tamponunun Hazırlanması (25 mM pH: 8.80): 1.62 g HEPES tartılarak yaklaşık 150 mL saf suda magnetik karıştırıcı ile çözünmesi sağlandı. Ardından pH 8.80'e ayarlandı. Daha sonra balon jojeye aktarılarak hacmi 250 mL'ye tamamlandı (Homojenizasyon-2 ve Homojenizasyon-3 yönteminin tamponu).

5.2.1.2. Homojenizasyon Yöntemi-1 (H1)

Yaklaşık 100 mg retroperitoneal yağ dokusu cam tüplere alındı. 200 µL izolasyon tamponu (100 mL 150 mM NaCl, 100 mL 0.2 mM EDTA ve 50 mM Tris-HCl içeren pH: 7.4) ve 750 µL kloroform/metanol (1:2, v/v) karışımı ilave edilerek soğuk ortamda homojenize edildi. Homojenatlar ependorflara aktarılarak 20 dk buzda bekletildikten sonra 250 µL kloroform, 250 µL saf su eklendi ve ependorflar vortekslendi. +4 °C 15000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında iki faz gözlemlendi. Üstteki süpernatant temiz ependorfa aktarılarak SOD analizi için hazır hale getirildi (6).

5.2.1.3. Homojenizasyon Yöntemi-2 (H2)

Yaklaşık 150 mg retroperitoneal yağ dokusu cam tüplere alındı. 2 mL soğuk HEPES tampon çözeltisi (pH: 8.80) içinde soğuk ortamda homojenize edildi. Homojenatlar 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlendikten sonra tüpün üst kısmında toplanan yağ tabakası uzaklaştırıldı. Yağ tabakasının altında bulunan süpernatant temiz bir ependorf tüpe aktarıldı. Tüp içerisine 400 µL etanol/kloroform (3:2, v/v) karışımı ilave edildi. Elde edilen çözelti vortekslenerek +4 °C 15000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpte oluşan üç fazdan en üstteki süpernatant fazı temiz bir ependorf tüpe aktarılarak SOD analizi için hazır hale getirildi (37, 44).

5.2.1.4. Homojenizasyon Yöntemi-3 (H3)

Homojenizasyon-1 yöntemi modifiye edilerek işlem gerçekleştirildi. Yaklaşık 100 mg yağ dokusu cam tüplere alındı. 200 µL HEPES tamponu (pH: 8.80) çözeltisi içinde soğuk ortamda homojenize edildi. Homojenatlar ependorflara aktarıldı ve 200 µL kloroform ilave edilerek +4 °C 15000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından iki faz gözlemlendi. Üstteki süpernatant fazı temiz ependorfa aktarılarak SOD ölçümü için hazır hale getirildi (38).

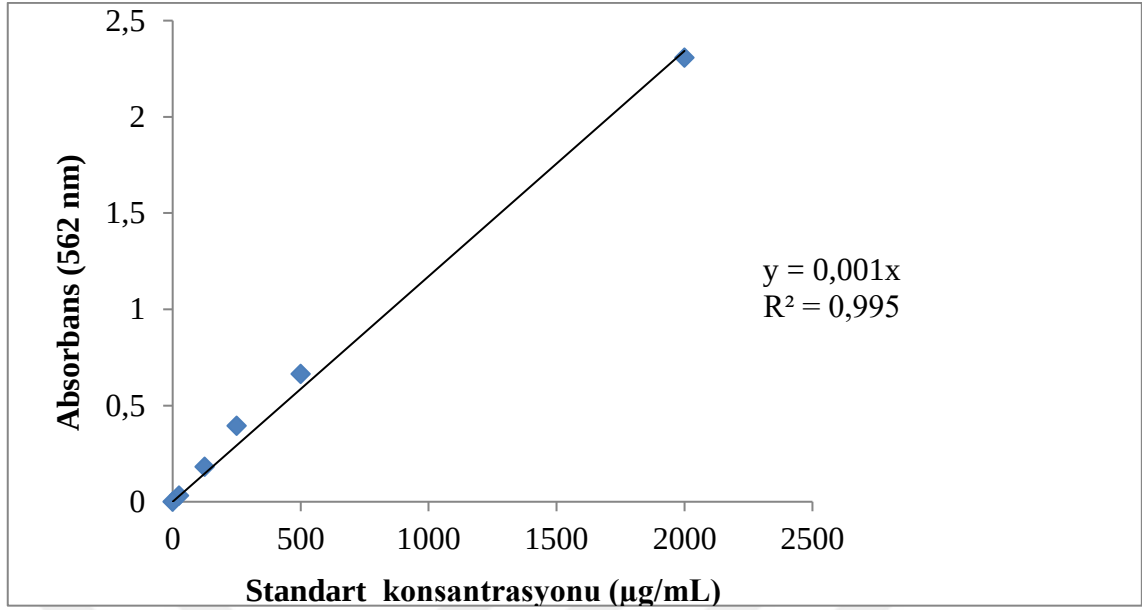
Dokular tartılıp yöntemlere göre homojenize edildikten sonra 1, 2, 4, 8, 10 ve 20 kat oranında seyreltildi. Her bir seyreltmede üç okuma yapıldı. Protein tayinleri de bisinkoninik asit (BCA) yöntemi ile yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı.

Her üç homojenizasyon yönteminde de tek bir hayvana ait retroperitoneal dokunun üç farklı parçası kullanıldı.

5.2.2. Protein Miktar Tayini

Retroperitoneal yağ dokularından elde edilen fazlarda protein tayini için BCA protein ölçüm kiti kullanılmıştır. BCA kiti protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Kit prosedürü Biüret tepkimesine dayanır. Cu^{2+} , alkali çözeltide bulunan protein tarafından Cu^{1+} ’e indirgenir ve BCA, indirgenmiş Cu ile kenetlenerek mor bir reaksiyon kompleksi oluşturur. Oluşan bu mor kompleksin 562 nm’de ölçümü yoluyla protein miktarı belirlenmektedir.

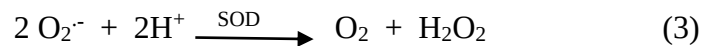
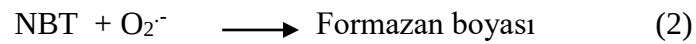
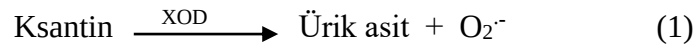
Çalışmada stok standart olarak 2 mg/mL’lik sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Retroperitoneal yağ dokularından elde edilen protein fazların konsantrasyonları sırasıyla Şekil 1’deki standart grafiklerine göre µg/mL cinsinden hesaplandı.



Şekil 1. Protein standart grafiği

5.2.3. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley'in geliştirdiği yöntem modifiye edilerek belirlendi (27). Metod süperoksit üreticisi olarak ksantin-ksantinoksidaz sisteminin kullanılmasını (Eş. 1) ve nitroblue tetrazoliu'nun (NBT) redüksiyonunun inhibe edilmesini içermektedir. Süperoksit radikalleri NBT gibi boyar maddeleri redüklemekte ve böylece formazonlar oluşmaktadır (Eş. 2). Bu formazonlar 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. SOD varlığında NBT'nin formazona dönüşümü engellenmektedir (Eş. 3). Bu sebeple NBT redüksiyon hızının inhibisyonuna bağlı olarak SOD aktivitesi tayin edildi.



5.2.4. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

SOD Reaktif Karışımı: 3.65 mg ksantin, 8.93 mg etilendiamintetraasetik asit, 1.01 g Na₂CO₃, 12 mg BSA tartıldı ve hacmi 156 mL'ye tamamlandı.

2 M (NH₄)₂SO₄ Çözeltisi: 2.64 g (NH₄)₂SO₄ 10 mL saf suda çözüldü. Ksantin oksidaz enziminin hazırlanmasında kullanıldı.

0.8 mM CuCl₂ Çözeltisi: 6.82 mg CuCl₂ alındı ve 50 mL deiyonize suda çözüldü. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi: 3.3 U/mL'lik orijinal şişeden 101 µL alınıp 2 mL'ye (NH₄)₂SO₄ çözeltisi ile tamamlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi günlük hazırlandı.

150 µM Nitroblue Tetrazolium Çözeltisi: 4.9 mg nitroblue tetrazolium 40 mL deiyonize suda çözülerek elde edildi. Nitroblue tetrazolium çözeltisi ışıktan korundu.

Standartların Hazırlanışı ve Örneklerin Çalışılması: 100 U/mL'lik stok SOD standardından 10, 9, 8, 6, 0.5, 0.25, 0.125 U/mL'lik SOD standartları deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Dokular ise tartılıp yöntemlere göre homojenize edildikten sonra 1, 2, 4, 8, 10 ve 20 kat oranında seyreltildi. Her bir seyreltme oranında üç okuma yapıldı. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaktifler Tablo 3'e göre pipetlendi.

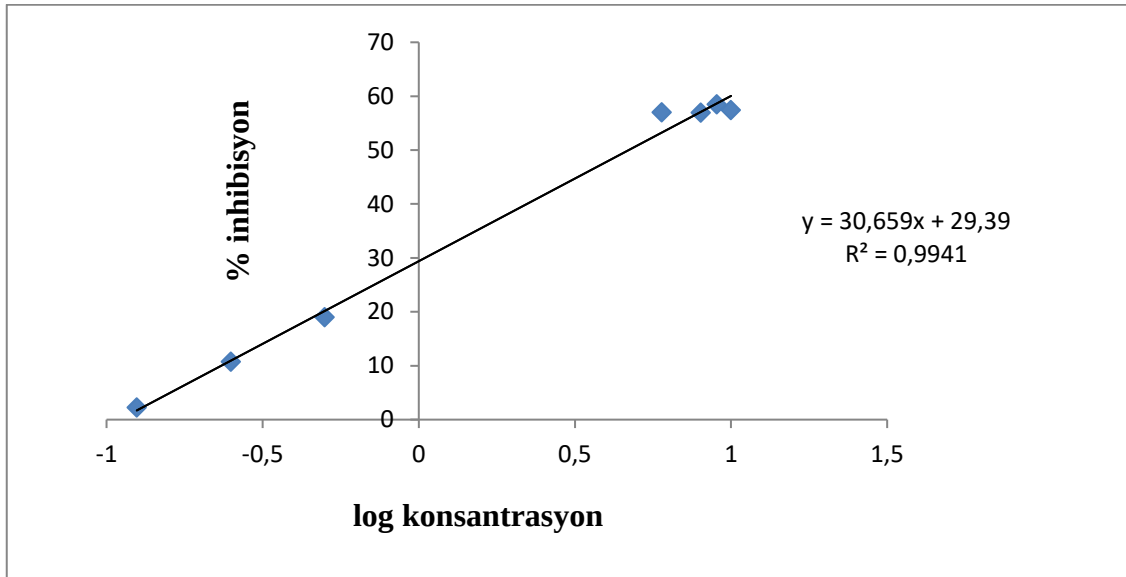
Tablo 3. SOD aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim (µL)
Numune, Standart, Kör	200
SOD Reaktif Karışımı	796
Nitroblue Tetrazolium	204
Ksantin Oksidaz	20
25 °C'de 20 dk inkübasyon	
CuCl ₂	400
560 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	

% inhibisyon Eş. 4'deki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = (AbsKör - AbsNumune) \div (AbsKör) \times 100 \quad (4)$$

Standart grafiği, % inhibisyona karşılık gelen konsantrasyonların logaritması belirlenerek Şekil 2'de gösterildiği gibi çizildi. Standart grafiğinde elde edilen denklem kullanılarak numunelerin % inhibisyonlarına karşılık gelen SOD aktivitelerinin logaritmik değeri hesaplandıktan sonra bunların anti logaritmaları alınarak numunelerin SOD aktiviteleri hesaplandı. Bulunan bu SOD aktiviteleri protein miktarına bölünerek sonuçlar U/mg protein olarak hesaplandı.



Şekil 2. SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği

5.2.5. İstatistiksel analiz

Elde edilen sonuçlar ortalama olarak ifade edildi. Karşılaştırmalar Kruskal Wallis testiyle yapıldı ve post hoc olarak da Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Retroperitoneal Yağ Dokusunda Protein Miktarı Ölçüm Sonuçları

Homojenizasyon yöntemlerinde ölçülen SOD aktivitelerini spesifik aktiviteye çevirmek için kullanılan protein miktarları farklı dilüsyonlar için Tablo 4’de verilmiştir.

Homojenizasyon-1 ile homojenizasyon-2 yönteminde elde edilen ortalama total protein miktarları arasında fark gözlenmemiştir ($p=0.059$).

Homojenizasyon-3 yönteminde diğer iki yönteme göre anlamlı seviyede daha fazla protein miktarı elde edilmiştir ($p<0.05$).

Tablo 4. Kullanılan üç yöntemde elde edilen protein miktarı sonuçları ($\mu\text{g/mL}$)

Seyreltme Oranı	1. Yöntem	2. Yöntem	3. Yöntem
1	93.014	269.51	-
2	46.805	160.49	604.635
4	27.743	67.825	309.764
8	9.786	35.657	183.476
10	10.55	32.51	137.52
20	7.32	27.402	75.313

6.2. Retroperitoneal Yağ Dokusunda Süpekoksit Dismutaz Ölçüm Sonuçları

Çalışmamızda homojenizasyon-1 yönteminde SOD enzim aktivitelerinin ortalama sonuçları Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Homojenizasyon-1 yöntemine göre spesifik aktivite sonuçları (U/mg protein)

Seyreltme Oranı	1. Ölçüm	2. Ölçüm	3. Ölçüm	Ortalama
1	113.89	116.10	128.29	119.26 ± 6.33
2	166.44	172.30	240.68	190.40 ± 33.7
4	189.77	184.74	206.51	193.45 ± 9.30
8	81.89	79.71	84.12	81.89 ± 1.80
10	61.95	67.94	81.69	70.06 ± 8.26
20	27.99	34.72	21.81	27.68 ± 5.27

Çalışmamızda homojenizasyon-2 yönteminden elde edilen spesifik aktiviteler ve ortalaması Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Homojenizasyon-2 yöntemine göre spesifik aktivite sonuçları (U/mg protein)

Seyreltme Oranı	1. Ölçüm	2. Ölçüm	3. Ölçüm	Ortalama
1	12.22	12.80	12.37	12.46 ± 0.25
2	20.69	23.30	16.75	20.06 ± 2.7
4	24.99	25.09	23.50	24.52 ± 0.73
8	21.05	22.56	21.29	21.63 ± 0.66
10	9.99	10.79	9.58	10.11 ± 0.50
20	6.41	4.12	3.97	4.72 ± 1.12

Çalışmamızda. homojenizasyon-3 yönteminden elde edilen spesifik aktiviteler ve ortalaması Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Homojenizasyon-3 yöntemine göre spesifik aktivite sonuçları (U/mg protein)

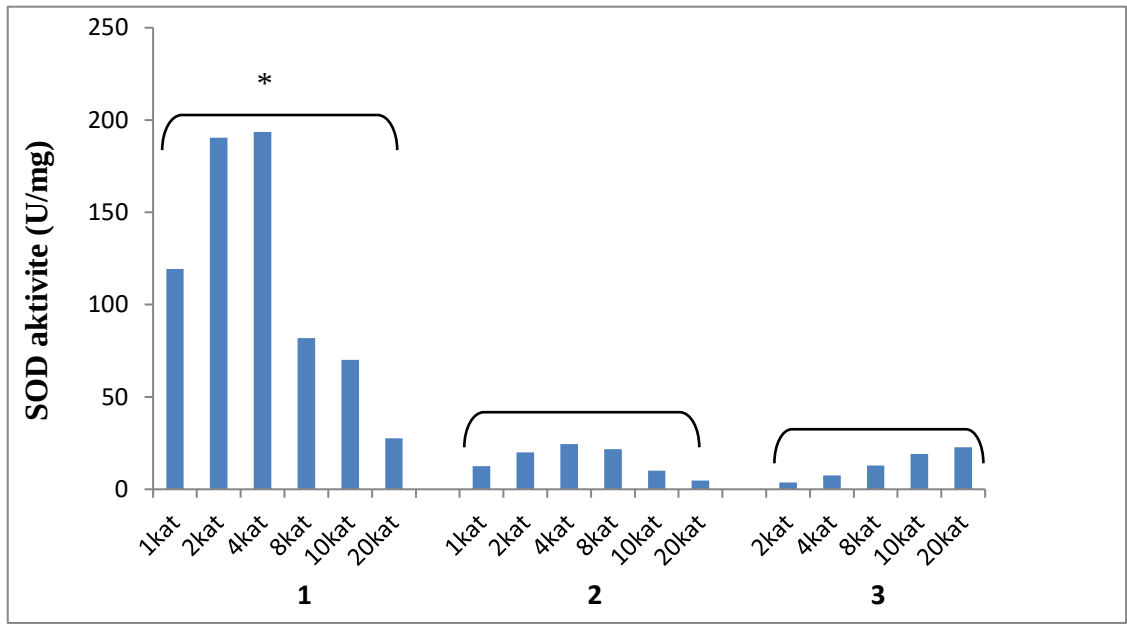
Seyreltme Oranı	1. Ölçüm	2. Ölçüm	3. Ölçüm	Ortalama
2	3.64	3.71	3.83	3.72 ± 0.08
4	7.19	7.53	7.53	7.41 ± 0.16
8	13.10	13.82	11.59	12.81 ± 0.93
10	19.62	18.45	19.03	19.03 ± 0.48
20	22.51	21.00	24.68	22.68 ± 1.5

6.3. Yöntemlere göre spesifik aktivite sonuçları (U/mg protein)

Her üç homojenizasyon yönteminin de farklı seyreltmelerdeki spesifik aktiviteleri Şekil 3’de gösterilmiştir.

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda homojenizasyon-1 yönteminin ortalama spesifik aktivite değerleri diğer iki yönleme göre daha büyüktür (p=0.009).

Homojenizasyon-2 ve homojenizasyon-3 arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir (p=0.465).



Şekil 3. SOD aktivitesinin üç homojenizasyon yöntemine göre dağılımı

*: Diğer gruplara göre $p < 0.05$ düzeyinde farklıdır.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yağ dokusu enerjinin depolandığı ana doku olmasının yanı sıra, birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol alan adipokinleri de salgılamaktadır (1, 3). Bu adipokinler metabolik sendrom, diyabet, obezite, kalp-damar hastalıkları ve kanser gibi birçok hastalığın patolojisinde yer almaktadır (33). Bu hastalıkların moleküler ve biyokimyasal mekanizmalarının aydınlatılmasında yağ dokusunda bulunan protein karakterli bileşiklerin izolasyonu oldukça önemli ve bilgi vericidir.

Oksidatif stres vücutta veya bir dokuda oksidan-antioksidan dengesinin oksidanlar lehine kayması ile oluşur. Vücudumuzda oldukça farklı oksidan karakterde bileşik bulunmasına rağmen, oksidatif stresten genellikle reaktif oksijen türleri sorumludur. Reaktif oksijen türleri birçok aerobik hücresel metabolik süreçlerde üretilir. Süperoksit ve hidrojen peroksit gibi radikaller lipidler, proteinler ve DNA gibi çeşitli hücre içi hedeflerle reaksiyona girer. Normal aerobik metabolizma sırasında ROT üretilmesine rağmen, ROT'nin biyolojik hedefler üzerine olan etkileri konsantrasyonlarına bağlıdır ve oksidatif stres durumunda bu türlerin seviyeleri yüksektir. ROT'nin yüksek seviyeleri toksiktir, ancak düşük seviyeleri hücre farklılaşması, apoptozi, hücre çoğalması ve redoks duyarlı sinyal iletim yolları gibi bazı önemli fizyolojik mekanizmaların düzenlenmesi için gereklidir (21-23). Oksidatif stres obezite, diyabet, kalp-damar hastalıkları ve kanser gibi hastalıklarda önemli patolojik roller oynar. Özellikle obezitede hipertrofi ve hiperplaziye bağlı artan yağ dokusu, normal adipokin profilinin dışına çıkarak inflamatuvar süreci tetikleyen bir adipokin salgı profili kazanır (yüksek leptin, TNF- α , IL-6 ve düşük adiponektin salgısı gibi). Özellikle inflamatuvar sitokinlerin artışı bölgede bulunan makrofaj ve monositlerden reaktif oksijen ve azot türlerinin sentezinin uyarılmasına yol açar. Ayrıca, artan mitokondriyal oksidasyon ve mekanik yükte yağ dokusunda oksidatif stresi daha da derinleştirir. Bu etkiler sonucu obezite düşük seviyeli kronik inflamatuvar bir süreç olarak tanımlanır (24, 25, 33).

Yukarıda da bahsedildiği gibi oksidatif stres aynı zamanda yetersiz antioksidan mekanizmalarla da ilgilidir. ROT hücre içi konsantrasyonu, üretimi ve bunların antioksidanlarca ortamdan uzaklaştırılma hızlarına bağlıdır. Hücreler oksidanların sebep olacağı hasarı engellemek ya da tamir etmek için birçok antioksidan içerir. Özellikle üç ana antioksidan enzim, SOD, CAT ve GPx oksijen kullanan tüm hücrelerin canlılığı için

gereklidir. Bu üç enzimin sıralı reaksiyonları sonucu süperoksit radikali suya indirgenir. Yağ dokusunda da obeziteye bağlı oksidatif stresin değerlendirilmesinde bu enzimlerin ölçümü yapılmaktadır (26). Ayrıca obezitenin biyokimyasal temellerinin aydınlatılması ve tedaviye yönelik çalışmaların değerlendirilmesi kullanılan, proteomik, ELISA, western blot ve enzim ölçümleri gibi yöntemler için yağ dokusundan protein izolasyonu gerekmektedir. Ancak, yüksek lipid içeriği ve protein miktarının bu dokuda %2 civarında bulunması, yağ dokusundan analitik amaçlı protein izolasyonunu güçleştirmektedir. Yağ hücreleri sitoplazmalarında triaçilgliserol ve az miktarda kolesterol ve fosfolipid içeren lipid damlacıklarını içerir. Lipid damlacıkları perilipin denilen proteinlerce sarılmıştır. Bu hidrofobik proteinlerin deterjan kullanılarak izolasyonu zordur. Proteinler oluşan misel yapılarının içinde kalır ve izole edilen protein miktarı azalır. Ayrıca, deterjanların birçok ölçüm için interferansı vardır (6).

Bu tez çalışmasında, yağ dokusu örneklerinde SOD enzim aktivitesi ölçümünde kullanılabilecek organik solventle doku homojenizasyonunun delipidasyonu (lipidlerin uzaklaştırılması) esasına dayanan üç farklı yöntem karşılaştırılmıştır. Yöntemlerin etkinliği spesifik aktivite değerleri hesaplanarak ortaya konmuştur. İlk homojenizasyon yönteminde (H1) yağ dokusu Varesio ve ark. (6) tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek yapılmıştır. İzolasyon tamponu ile yapılan homojenizasyonu takiben kloroform/metanol (1:2) karışımı ile delipidasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İkinci homojenizasyon yönteminde (H2) yağ dokusu Furukawa ve ark. (44) tarafından tanımlanan yöntem ile yapılmıştır. HEPES tamponu ile yapılan homojenizasyonu takiben etanol/kloroform ile delipidasyon işlemi yapılmıştır. Her iki yöntemde de proteinleri çözünürlüğü polar organik çözücüler (metanol, etanol) ile dengelenmiştir. Üçüncü homojenizasyon yönteminde (H3) ise yağ dokusu Selvi (38) tarafından tanımlanan yöntem ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon yine HEPES ile yapılmış, ancak delipidasyon işleminde sadece kloroform kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar (Tablo 4) incelendiğinde en yüksek protein değerlerinin H3'de olduğu gözükmemektedir. H3'de en yüksek protein içeriğinin olmasında polar organik çözücüler kullanılmamasının bir sonucu olabilir. Proteinler organik çözücülerle muamele edildiklerinde çökerler. Bununla beraber, bazı hidrofobik proteinler, özellikle hücre zarlarında yerleşenler organik çözücüler etkisi ile çöktürülemezler. Hücre zarlarında kullanılan organik çözücüler proteinin hidrofobik parçaları etrafındaki su moleküllerinin

yerini alırlar. Bu da, protein çözünürlüğün artması ile sonuçlanır. Proteinin büyüklüğü de çökme davranışını değiştirmektedir. Büyük molekül ağırlıklı proteinler diğer özellikleri aynı olan daha küçük molekül ağırlıklı proteinlere göre daha düşük organik çözücü konsantrasyonlarında çökerler (45). Homojenizasyon yöntemleri içerisinde tampon/klorofom oranı en yüksek homojenizasyon yöntemi H3'dür. Bu sebebe bağlı olarak H3'de ölçülen protein miktarı daha yüksek olabilir.

SOD tüm hücrelerde bulunan önemli bir antioksidan enzimdir. CuZnSOD ökaryotik hücrelerdeki toplam SOD aktivitesinin yaklaşık %90'ından sorumludur. Büyük bir kısmı sitozolde olmasına rağmen, küçük miktarlarda lizozom, peroksizom ve çekirdek gibi organellerde de bulunur. CuZnSOD'un yaklaşık %2'lik bir kısmında mitokondrilerin membranlar arası boşluğunda bulunduğu gösterilmiştir. Bu yerleşim özellikle mitokondrilerden sızacak süperoksidin zararlarından korunmada oldukça önemlidir. İnflamatuar bir süreç olan obezitede dokuda gözlenen oksidatif stresin ana kaynağı NADPH oksidazdır. Bu enzim bol miktarda süperoksit anyonu oluşturmaktadır. Süperoksidin zararlı etkilerinin bertaraf edilmesinde ilk savunma hattı SOD aktivitesidir (32).

Farklı seyreltme oranlarında üç homojenizasyon yöntemi ile elde edilen spesifik aktivite değerleri tablo 5,6, 7 ve şekil 3'de verilmiştir. En yüksek spesifik aktivite değeri H1'de elde edilmiştir ($p=0.009$). H1 yöntemi en düşük ortalama protein değerlerine sahip olmasına rağmen en yüksek SOD aktivitesine sahiptir. Her üç homojenizasyon yönteminde de yukarıda bahsedildiği gibi apolar bir organik çözücü (kloroform) ve polar organik çözücüler (metanol ve etanol) kullanılmıştır. Genel olarak organik çözücüler proteinlerin üç boyutlu yapılarını bozarak çözünürlüklerinin kaybetmelerine ve çökmelerine sebep olur. Bu etki 0 °C üzerindeki sıcaklıklarda daha belirgindir. Bu yüzden denatürasyon çalışmalarında organik çözücüler sıklıkla kullanılır. Organik çözücüler biyolojik sıvılarda tüm proteinlerin çökmesini sağlayabileceği gibi, uygun deneysel şartlarda bazı protein fraksiyonlarının çökmeden fonksiyonel olarak ortamda kalmasını sağlayabilir. Bu yöntem enzim çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (43).

Enzim katalizi çalışmalarında, organik çözücü kullanımı, substrat (lar) organik çözücülerde daha fazla çözünürlüğe sahip olduğu, sentetik reaksiyonlar için hidrolaz kullanımı gibi arzulanan yönlerde reaksiyon dengelerinin kaydırılması, mikrobiyal

kontaminasyon riskinin azaltılması, termostabilitenin artırılması, immobilizasyon olmadan bile enzimin geri kazanımı ve tekrar kullanılabilirliği, uçucu çözücüler kullanıldığında enerji verimliliğinin artırılması, asit anhidritler gibi "neme duyarlı" substratlar/reaktifler kullanması gerektiğinde, substratın özgülüğü, özgünlüğüne ve enantioselektiflik gibi durumlarda tercih edilir (39). Doz-cevap ölçümlerinde, enzimler ölçümde kullanılan organik çözücülere karşıda oldukça hassastırlar. Organik çözücü kullanımının enzim aktivitesi üzerine olan etkisi, enzimlerin tersiyer ve kuaterner yapılarını etkileyerek ölçümler sırasında domainlerin esnekliğini, substratların aktif bölgeye ulaşması ve bağlanması gibi özellikleri değiştirerek gerçekleştirebilir (40). Özellikle metanol ve etanol gibi alkollerin GAPDH, fruktoz 1,6-bisfosfataz ve alkalen fosfataz gibi enzimlerin aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı dikkat çekicidir (40-42). Bunun kesin nedenleri bilinmemekle birlikte, alkollerin peptitlerde ve proteinlerde yapısal değişiklikler meydana getirdiği uzun zamandır bilinmektedir. Alkoller enzimin katalitik aktivitesini kolaylaştırmak için konformasyonel esnekliğini artırarak moleküler bir kayganlaştırıcı gibi görünmektedir (40).

H1'de yağ dokusu homojenize edildikten sonra kullanılan kloroform/metanol karışımı H2'de kullanılan kloroform/etanol karışımına göre SOD aktivitesini daha iyi korumuştur. Bunda mevcut aktivitenin korunması kadar metanolün SOD aktivitesini yukarıda bahsedilen şekilde artırmış olmasının bir sonucu olabilir. H2'de H1'e göre daha fazla protein içeriği bulunması rağmen SOD aktivitesinin daha düşük olmasında, proteinin denatürasyonla aktivitesini kaybetmesi, en azından kullanılan etanol miktarının SOD fraksiyonunu çözünür halde tutamamasının da sonucu olabilir. Ayrıca, organik çözücüler su ile karıştırıldığında ısı üretimine sebep olmaktadır ve bu denatürasyonu daha da artırmaktadır (43). H1'de buz üzerinde numuneler bekletilirken H2'de bu uygulama yapılmamıştır. H2 için soğuk ortamın sağlanmamış olması denatürasyonu artırmış olabilir. Yukarıda bahsedildiği gibi organik çözücüler substratların çözünürlüğü üzerinde de etkilidir. Metanolün etanole göre daha polar olması deneylerde kullanılan NBT'nin çözünürlüğü üzerinden de enzim aktivitesinin H1'de daha yüksek olmasına sebep olmuş olabilir. Elde ettiğimiz sonuçlar Sun ve Oberley yöntemi ile SOD aktivitesi ölçümü ile ilgilidir. SOD aktivitesi ölçümünde kullanılacak farklı yöntemlerde substrat değişikliği gibi faktörler farklı sonuçların elde edilmesine sebep olabilir. Bu yöntemde kullanılan ksantin oksidaz enziminin ve

substratının yine reaksiyon ortamında bulunan metanol ve etanolden etkilenme derecelerinde farklılıklara sebep olabilir. H3’de en yüksek protein miktarına rağmen en düşük SOD aktivitesi ölçülmesinde polar bir çözücünün kullanılmaması etkili olabilir. Kloroformun yüksek apolar etkisi lipid-protein ayrımını tam anlamıyla yerine getirirken, yüksek miktarda ürün elde edilmesine imkan sağlarken, apolar karakterinden dolayı proteinlerde ciddi denatürasyona yol açmış olabilir. Yine yüksek apolariteden dolayı NBT çözünürlüğünün azalması, elektron transferinin zorlaşması ve ksantin oksidazın aktivite kaybına uğraması bu sonucu doğurmuş olabilir.

Çalışmamızda protein miktarları BCA testi ile belirlenmiştir. Bazı maddeler BCA tekniğinin hassasiyetini sınırlamaktadır. Bu maddelerden özellikle bakır şelatörler, güçlü asitler-bazlar ve alkollerin teste müdahale ettiği bilinmektedir. BCA kitiyle ölçülen protein miktarları karşılaştırıldığında H1 yönteminde diğer iki yöntemle göre dikkat çekici şekilde düşük sonuçlar elde edilmiştir. Bunun sebebi bu yöntemde kullanılan tris tamponunun içeriği olabilir. Tris tamponu, EDTA gibi bir bakır şelatörünün yanı sıra HCl ve Tris gibi kuvvetli asit ve bazları içermektedir. H2 yönteminde daha yüksek protein miktarları elde edilmiştir. HEPES tamponu büyük hacimlerde teste uyumlu değildir. Ayrıca H1 ve H2’de tamponların dışında kullanılan metanol ve etanol gibi organik çözücülerin protein miktarını belirlemede sınırlayıcı etkisi olabilir. H3’de elde edilen protein miktarları diğer iki yöntemle kıyasla oldukça yüksektir. Bunun sebebi H1 ve H2 yöntemlerinde kullanılan teste interfere edebilecek etanol ve metanolün olmaması ve H3’ün oldukça derişik bir protein çözeltisi olmasından dolayı olabilir (46).

Sonuç olarak, retroperitoneal yağ dokusunda Sun ve Oberley yöntemi ile SOD aktivite tayininde kullanılabilecek üç farklı homojenizasyon yönteminin karşılaştırıldığı çalışmamızda, H1 yönteminin SOD aktivitesi tayininde daha etkili olduğu bulundu ve bu etkide daha polar özelliğe sahip metanol varlığının ve soğuk ortamın devamlılığının önemli olabileceği kanaatine varıldı.

8. KAYNAKLAR

1. Jung UJ, Choi MS (2014). Obesity and its metabolic complications: The role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 15(4): 6184-6223.
2. Odegaard JI, Chawla A (2011). Alternative macrophage activation and metabolism. *Ann Rev Pathol* 6: 275–297.
3. Demirci Ş, Gün C (2017). Adipoz doku ve adipoz dokudan salınan bazı proteinler. *MAKU Sag Bil Enst Derg* 5(2): 155-179.
4. Buyukuslu N, Yiğitbaşı T (2015). Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. *Musbed* 5(3): 197-203.
5. Fukai T, Ushio-Fukai M (2011). Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function and diseases. *Antioxid Redox Signal* 15(6): 1583-1606.
6. Sajic T, Hopfgartner G, Szanto I, Varesio E (2011). Comparison of three detergent-free protein extraction protocols for white adipose tissue. *Anal Biochem* 415(2): 215–217.
7. Tordjman J (2013). Histology of adipose tissue. *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue* (Ed:Bastard JP, Fève B). Paris, 67-74.
8. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci* 9(2): 191-200.
9. Messina G, Valenzano A, Moscatelli F, Salerno M, Lonigro A, Esposito T, Monda V, Corso G, Messina A , Viggiano A, Triggiani AI , Chieffi S, Guglielmi G, Monda M , Cibelli G (2017). Role of autonomic nervous system and orexinergic system on adipose tissue. *Front Physio* 18:137.
10. Lapa C, Maya Y, Wagner M, Arias-Loza P, Werner RA, Herrmann K, Higuchi T (2015). Activation of brown adipose tissue in hypothyroidism. *Ann Med* 47(7): 538–545.
11. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE (2015). The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol* 208(5): 501–512.
12. Ricquier D (2013). Brown adipose tissue: Function and development. *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue* (Ed:Bastard JP, Fève B). Paris, 51-64.

13. Nicholls DG, Locke RM (1984). Thermogenic mechanisms in Brown fat. *Physiol Rev* 64(1): 1–64.
14. Bodur A (2017). Yüksek sukroz içerikli diyetle beslenmiş beyin kaynaklı nörotrofik faktör heterozigot farelerin yağ dokusunda oksidatif stresin incelenmesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
15. Votruba SB, Jensen MD (2007). Regional fat deposition as a factor in FFA metabolism. *Annu Rev Nutr* 27: 149-163.
16. Sağlam N (2016). Retroperitoneal yağ dokusu denervasyonunu takiben diyetle obez yapılmış sıçanlarda adiponektin gen ekspresyonu ve serum seviyelerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
17. Chavey C, Lagarrigue S, Annicotte AJ, Fajas L (2013). Emerging roles of cell cycle regulators in adipocyte metabolism. *Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue* (Ed:Bastard JP, Fève B). Paris, 17-24.
18. Gürbüz P, Yetiş G, Çelikcan G (2016). Obezite ve yağ dokusu. *T.C.İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi* 4(2): 32-43.
19. Coudriet GM, Delmastro-Greenwood MM, Previte DM, Marré ML, O'Connor EC, Novak EA, Vincent G, Mollen KP, Lee S, Dong HH, Piganelli JD (2017). Treatment with a catalytic superoxide dismutase (SOD) mimetic improves liver steatosis, insulin sensitivity, and inflammation in obesity-induced type 2 diabetes. *Antioxidants(Basel)* 6(4): 1-18.
20. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S (2011). NF- κ B, inflammation and metabolic disease. *Cell Metab* 13(1): 11–22.
21. Süleyman H, Gül V, Erhan E (2018). Oksidatif stres ve doku hasarı. *Erzincan Tıp Dergisi* 1(1): 1-4.
22. Mohseni R, Arab Sadeghabadi Z, Goodarzi MT, Teimouri M, Nourbakhsh M, Razzaghy Azar M (2018). Evaluation of Mn-superoxide dismutase and catalase gene expression in childhood obesity: its association with insulin resistance. *J Pediatr Endocrinol Metab* 31(7): 727-732.

23. Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L (2013). Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci* 14(5): 10497-10538.
24. Fernandez-Sanchez A, Madrigal-Santillan E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-Gonzalez A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sanchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-Gonzalez JA (2011). Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 12(5): 3117-3132.
25. İpar N (2012). Ekzojen obezitesi olan hastalarda total oksidatif stres ve total antioksidan kapasite düzeyleri; probiyotiklerin bu düzeylere etkisi. Tıpta uzmanlık tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Eskişehir.
26. Karabulut H, Gülay MŞ (2016). Antioksidanlar. *MAE Vet Fak Derg* 1(1): 65-76.
27. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxidedismutase. *Clin Chem* 34: 497-500.
28. Ma X, Deng D, Chen W (2017). Inhibitors and activators of SOD, GSH-Px and CAT. *Enzyme inhibitors and activators* (Ed : Şentürk M). Croatia, 207-224.
29. Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* 1804(2): 245-262.
30. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33(3): 337-349.
31. Rupérez AI, Gil A, Aguilera CM (2014). Genetics of oxidative stress in obesity. *Int J Mol Sci* 15(2): 3118-3144.
32. Case AJ (2017). On the origin of superoxide dismutase: An evolutionary perspective of superoxide-mediated redox signaling. *Antioxidants (Basel)* 6(4): 1-21.
33. Darroudi S, Fereydouni N, Tayefi M, Ahmadnezhad M, Zamani P, Tayefi B, Kharazmi J, Tavalaei S, Heidari-Bakavoli A, Azarpajouh MR, Ferns GA, Mohammadpour AH, Esmaily H, Ghayour-Mobarhan M (2019). Oxidative stress and inflammation, two features associated with a high percentage body fat, and that may lead to diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Biofactors* 45(1): 35-42.

34. Lewandowski L, Kepinska M, Milnerowicz H (2019). The copper-zinc superoxide dismutase activity in selected diseases. *Eur J Clin Invest* 49(1): 1-10.
35. Olusi SO (2002). Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(9): 1159–1164.
36. Kobayasi R, Akamine EH, Davel AP, Rodrigues MA, Carvalho CR, Rossoni LV (2010). Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J Hypertens* 28(10): 2111–2119.
37. Kahraman C (2013). Diyetle indüklenmiş obezitede yağ dokusundaki oksidan antioksidan dengenin incelenmesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
38. Selvi Y (2018). Denervasyona bağlı retroperitoneal yağ dokusundaki total karbonik anhidraz aktivite değişikliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
39. Gupta MN (1992). Enzyme function in organic solvents. *Eur J Biochem* 203(1-2): 25-32.
40. Wiggers HJ, Cheleski J, Zottis A, Oliva G, Andricopulo AD, Montanari CA (2007). Effects of organic solvents on the enzyme activity of trypanosoma cruzi glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays. *Anal Biochem* 370(1): 107-114.
41. Corley E, Wolosiuk RA (1986). The effect of organic solvents on the activation and the activity of spinach chloroplast fructose-1,6=bisphosphatas. *J Biol Chem* 260(7): 3978-3983.
42. Krishnaswamy M, Kenkare UW (1970). The effect of pH, temperature, and organic solvents on the kinetic parameters of Escherichia coli alkaline phosphatase. *J Biol Chem* 245(15): 3956-3963.
43. Englard S, Seifter S (1990). Methods in enzymology. Precipitation Techniques (Ed : Abelsan JN, Simon MI). California, 285-306.

44. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752-1761.
45. Asakura T, Adachi K, Schwartz E (1978). Stabilizing effect of various organic solvents on protein. *J Biol Chem* 253(18): 6423-6425.
46. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1): 76-85.



9. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	Büşra ULUIŞIK
Doğum Tarihi/Yeri	1989/SAMSUN
E-posta	busra858@hotmail.com
Adres	KTÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AbD, TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Fakülte/Bölüm	Üniversite	Yıl
Yüksek Lisans	SABE/Tıbbi Biyokimya AbD	KTÜ	2015
Lisans	Fen Fak./Kimya	OMÜ	2012
Yabancı Dil	İngilizce YÖKDİL (75.00)		