



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KRONİK APELİN UYGULAMASININ
KARACİĞER ANTİOKSİDAN ENZİMLERİ
(CAT, SOD, GSH-Px) ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

İmran İNCE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2012



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KRONİK APELİN UYGULAMASININ
KARACİĞER ANTİOKSİDAN ENZİMLERİ
(CAT, SOD, GSH-P_x) ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

İMİRAN İNCE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2012

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Asım ÖREM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi İmran İNCE' nin hazırladığı “Kronik Apelin Uygulamasının Karaciğer Antioksidan Enzimleri (CAT, SOD, GSH-Px) 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: Doç. Dr. Ahmet ALVER



Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

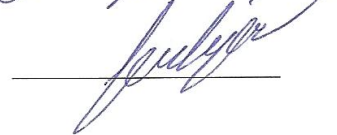
Doç. Dr. Ahmet ALVER



Doç. Dr. Sinan CANPOLAT



Yrd. Doç. Dr. Fulya B.YÜCESAN



Tarih:/.../2012

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../2012 tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet KALKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

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 aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

25.05.2012

İMİRAN İNCE

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans hayatım boyunca bilimsel bakış açısıyla, akademik duruşuyla daima örnek olarak gördüğüm ve tez çalışmamın gerçekleşmesinde gerekli imkânları sağlayan, araştırmanın planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda değerli bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, tüm yardım ve emekleri için danışman hocam sayın Doç. Dr. Ahmet ALVER'e,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca yetişmemde emekleri geçen değerli hocalarım Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Doç. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Doç. Dr. Birgül VANİZÖR KURAL ve Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN'a,

Çalışmamızın gerçekleşmesi için yapmış olduğu değerli katkı ve yardımlarından dolayı Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Sinan CANPOLAT'a ve Artvin Çoruh Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Öğr. Gör. Sinan SARAL'a,

Akademik bilgi ve tecrübelerini aktararak bilimsel gelişimime katkısı olan ve çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE ve Arş. Gör. Cemil KAHRAMAN'a,

Bana her aşamada destek ve yardımcı olan değerli arkadaşlarım Fazilet YALDUZ, Sema MISIR, Akın BODUR, Arş. Gör. Metehan AKÇA ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm arkadaşlarıma,

Gösterdikleri tüm sabır, özveri ve emekleri için varlıkları bana destek sağlayan, yaşamın bana sunduğu en güzel armağanlar olan sevgili aileme,

Teşekkür ederim.

İmran İNCE

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İç Kapak Sayfası	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER, KISALTMALAR VE ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÖZET	1
SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Adipoz Doku	4
4.1.1. Adipokinler	6
4.2. Apelin	7
4.2.1. Apelin Reseptörü	8
4.2.2. Apelinin Biyolojik Etkileri	9
4.3. Serbest Radikal Kaynakları	10
4.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	11
4.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	12
4.4.2. Antioksidan enzimler	13
4.4.2.1. Süperoksit Dismutaz	13
4.4.2.2. Katalaz	14
4.4.2.3. Glutasyon Peroksidaz	14
4.5. Karaciğer ve Fonksiyonları	15
4.6. Malondialdehit	16
5. GEREÇ ve YÖNTEM	18
5.1.GEREÇ	18
5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	18
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19

5.2. YÖNTEM	20
5.2.1. Deney Grupları	20
5.2.2. Deney Planı	20
5.2.3. Karaciğerde Antioksidan Enzimlerin Ölçülmesi	21
5.2.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini	21
5.2.3.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini	23
5.2.3.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Tayini	25
5.2.4. Protein Tayini	25
5.2.5. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü	26
5.2.6. Karaciğer Dokusundan RNA İzolasyonu	27
5.2.7. Reverse Transkriptaz-PCR ile RNA dan cDNA Elde Edilmesi	28
5.2.8. Real Time PCR	29
5.2.8.1. Real Time PCR Protokolü	30
5.2.9. Ürünlerin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi	32
5.2.10. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	32
6. BULGULAR	33
6.1. Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri	33
6.2. Real Time PCR Sonuçları	34
6.3. SOD Aktivite Ölçüm ve Ekspresyon Sonuçları	35
6.4. Katalaz Aktivite Ölçüm ve Ekspresyon Sonuçları	36
6.5. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Ölçüm ve Ekspresyon Sonuçları	38
6.6. MDA Seviyesi Ölçüm Sonuçları	39
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	41
8. KAYNAKLAR	46
9. ETİK KURUL ONAYI	52
10. ÖZGEÇMİŞ	53

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. Apelinin etkileri	10
Tablo 2. Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler	18
Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler	19
Tablo 4. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı	22
Tablo 5. Katalaz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı	24
Tablo 6. Real Time PCR’da kullanılan primer dizileri	29
Tablo 7. RNA örneklerinin Real Time-PCR için hazırlanması	31
Tablo 8. Reverse Transcription-PCR protokolü	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Beyaz ve kahverengi yağ dokusunun oluşumu	5
Şekil 2. Beyaz adipoz doku kaynaklı adipokinler ve fonksiyonları	6
Şekil 3. Apelin sentezi ve postranslasyonel mekanizmaları	7
Şekil 4. Apelin peptidlerinin metabolizması	8
Şekil 5. Antioksidanların sınıflandırılması	12
Şekil 6. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği	23
Şekil 7. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonların logaritmasına karşı % inhibisyon grafiği	23
Şekil 8. Protein tayininin standart grafiği	26
Şekil 9. MDA standart grafiği	27
Şekil 10. RNA izolasyon sonuçlarının jel elektroforez görüntüsü	33
Şekil 11. cDNA örneklerinin jel elektroforez görüntüsü	33
Şekil 12. qPCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü	34
Şekil 13. Amplifikasyon eğrileri	34
Şekil 14. Glutatyon peroksidaz ve beta aktin erime eğrisi	35
Şekil 15. Katalaz, süperoksit dismutaz, beta aktin erime eğrileri	35
Şekil 16. Çalışma gruplarının SOD aktivitesi	36
Şekil 17. Grupların SOD gen ekspresyonu	36
Şekil 18. Çalışma gruplarının CAT aktivitesi	37
Şekil 19. Grupların CAT gen ekspresyonu	38
Şekil 20. Çalışma gruplarının GSH-Px aktivitesi	39
Şekil 21. Grupların GSH-Px gen ekspresyonu	39
Şekil 22. Çalışma gruplarının MDA düzeyi ölçümü	40

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

CAT	Katalaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Okside glutasyon
NADPH	Nikotin adenin dinükleotid fosfat
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
APJ	Apelin reseptörü
TNF- α	Tümör nekroz faktör-alfa
PAI-1	Plazminojen aktivatör inhibitör-1
IL-6	İnterlökin-6
TGF- α	Transforming büyüme faktörü- α
ASP	Asilasyon stimüle edici protein
IGF-I	İnsülin benzeri büyüme faktörü
PG I ₂	Prostaglandin I ₂
PG F ₂ α	Prostaglandin F ₂ α
qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
GSH	Glutasyon
MDA	Malondialdehit
NBT	Nitro blue tetrazolium

Formüller

O ₂	Oksijen molekülü
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
OH.	Hidroksil radikali
ROO.	Peroksil radikali
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit

ÖZET

KRONİK APELİN UYGULAMASININ KARACİĞER ANTİOKSİDAN ENZİMLERİ (CAT, SOD, GSH-Px) ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Apelin çeşitli fizyolojik fonksiyonları bulunan, adipoz dokudan salgılanan peptit yapılı bir bileşiktir. Apelin; immün, kardiyovasküler ve nöroendokrin sistem başta olmak üzere birçok biyolojik sistemi etkilemektedir. Bu peptidin kardiyomiyositlerde bazı antioksidan enzimler üzerine etkisi araştırılmış ve katalaz aktivitesini arttırdığı bulunmuştur.

Bu çalışmada, detoksifikasyon, sentez, sindirim ve çeşitli maddeler için depo yeri olan karaciğer dokusunda, apelin-13'ün antioksidan sistem aktivitesine olan etkisi incelendi. Çalışmada 32 adet Sprague-Dawley erkek sıçan dört gruba ayrıldı. 1. grup kontrol (1 ml/kg/gün serum fizyolojik), 2. grup 30 µg/kg/gün, 3. grup 100 µg/kg/gün ve 4. grup ise 300 µg/kg/gün olmak üzere, 15 gün süreyle tek doz intraperitoneal apelin-13 enjeksiyonu yapıldı. 15. günde alınan karaciğer dokularında, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ve bu enzimlerin gen ekspresyonları ölçüldü. SOD aktivitelerinde AP 30 kontrol grubuna göre daha düşük ($p<0.05$), CAT aktivitelerinde AP 30 ve AP 100 kontrol grubuna göre daha düşük ($p<0.05$), GSH-Px aktivitelerinde ise AP 100 ve AP 300 kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ($p<0.05$). SOD ve CAT gen ekspresyonu ölçümlerinde değişiklik gözlenmezken, GSH-Px ekspresyonlarında AP 300 kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ($p<0.05$). MDA konsantrasyonu kontrol grubuna göre AP 100 ve AP 300 grupları daha düşük bulundu ($p<0.05$).

Sonuç olarak apelinin karaciğer dokusunda oksidatif süreci, GSH-Px aktivitesi ve ekspresyonunu artırarak bazal seviyede baskıladığı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Apelin-13, Glutatyon peroksidaz, Karaciğer, Katalaz, Süperoksit dismutaz

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CHRONIC APELIN TREATMENT EFFECT ON LIVER ANTIOXIDANT ENZYMES (CAT, SOD, GSH-Px)

Apelin is a versatile peptide, secreting from adipose tissue and has a variety of physiological functions. Apelin affects many biological systems especially immune, cardiovascular and neuroendocrine system. The effect of this peptide on some antioxidant enzymes in cardiomyocytes was investigated and found to increase the activity of catalase.

In this study, the effect of apelin-13 on antioxidant system activity is investigated in the liver tissue, which is depot location for detoxification, synthesis and digestion of various substances. In this study 32 male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups. 1. group control (1 ml/kg/day saline solution), 2. group 30 µg/kg/day, group 3. 100 µg/kg/day and 4. group of 300 µg/kg/day and a single intraperitoneal dose of apelin 13 was injected for 15 days. In liver tissues taken the fifteenth day, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities and gene expression of these enzymes were measured. AP 30 was found lower in the SOD activities ($p<0.05$), AP 30 and AP 100 was found lower in the CAT activities, AP 100 and AP 300 was found higher in the GSH-Px activities than the control group ($p<0.05$). While any change wasn't observed in the measurement of SOD and CAT gene expressions, the GSH-Px expressions of AP 300 group was found higher than the control group ($p<0.05$). The concentration of MDA in the AP 100 and AP 300 groups were found lower than the control group ($p<0.05$).

As a result, it was suggested that apelin suppressed basal oxidative process by increasing GSH-Px activity and gene expression in liver tissue.

Key Words: Apelin-13, Catalase, Glutathione Peroxidase, Liver, Superoxide Dismutase

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Adipoz doku temel olarak trigliserid deposu olarak görev yapar ve enerji tüketiminin enerji alımını aştığı durumlarda yağ asidi salınımı yaparak enerji ihtiyacını karşılar. Adipoz dokuda bulunan adiposit, preadiposit, makrofaj, endotel hücresi, fibroblast, lökositler çeşitli hormon ve sitokinler salgılamakta, sonuçta adipoz doku endokrin, parakrin ve otokrin sinyallerle çeşitli metabolik etkiler oluşturmaktadır. Bu yüzden adipoz doku yeni bir endokrin organ olarak kabul edilmektedir. Adipoz dokudan salgılanan peptit yapılı bir bileşik olan apelin birçok sistemi etkilese de özellikle nöroendokrin, kardiyovasküler ve immün sistem üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir (1, 2).

Karaciğer; karbohidratların, proteinlerin ve yağların metabolizmasının gerçekleştiği, plazma proteinlerinin sentezi, bazı bileşiklerin depolanması, ilaç ve alkol gibi dışarıdan alınan bileşiklerin detoksifikasyonunun gerçekleştirildiği metabolizmanın merkez organıdır. Mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde (sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal fizyolojik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir. Bu radikallerin oluşumunu ve meydana getireceği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Normalde hücrelerdeki en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden kaynaklanan sızıntıdır. Yüksek miktarda mitokondri içeren dokulardan biride karaciğerdir. Ayrıca, karaciğer detoksifikasyon işlemlerinde önemli yeri olan sitokrom P-450 sistemi yönünden de zengindir. Bu yüzden karaciğer dokusunda bulunan antioksidan savunmanın önemi büyüktür (3, 4).

Foussal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (5) apelinin in vitro olarak katalaz aktivitesini ve mRNA ekspresyonunu arttırarak serotonin ve oksidatif strese hipertrofik cevabı inhibe ettiği gösterilmiştir.

Bu çalışmada ise, in vivo olarak apelinin antioksidan etkisi; metabolizmada ve detoksifikasyon olayları için önemli bir organ olan karaciğer dokusundaki bazı antioksidan enzimlerin (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz) aktiviteleri ve gen ekspresyonları üzerine etkisi olup olmadığı incelendi.

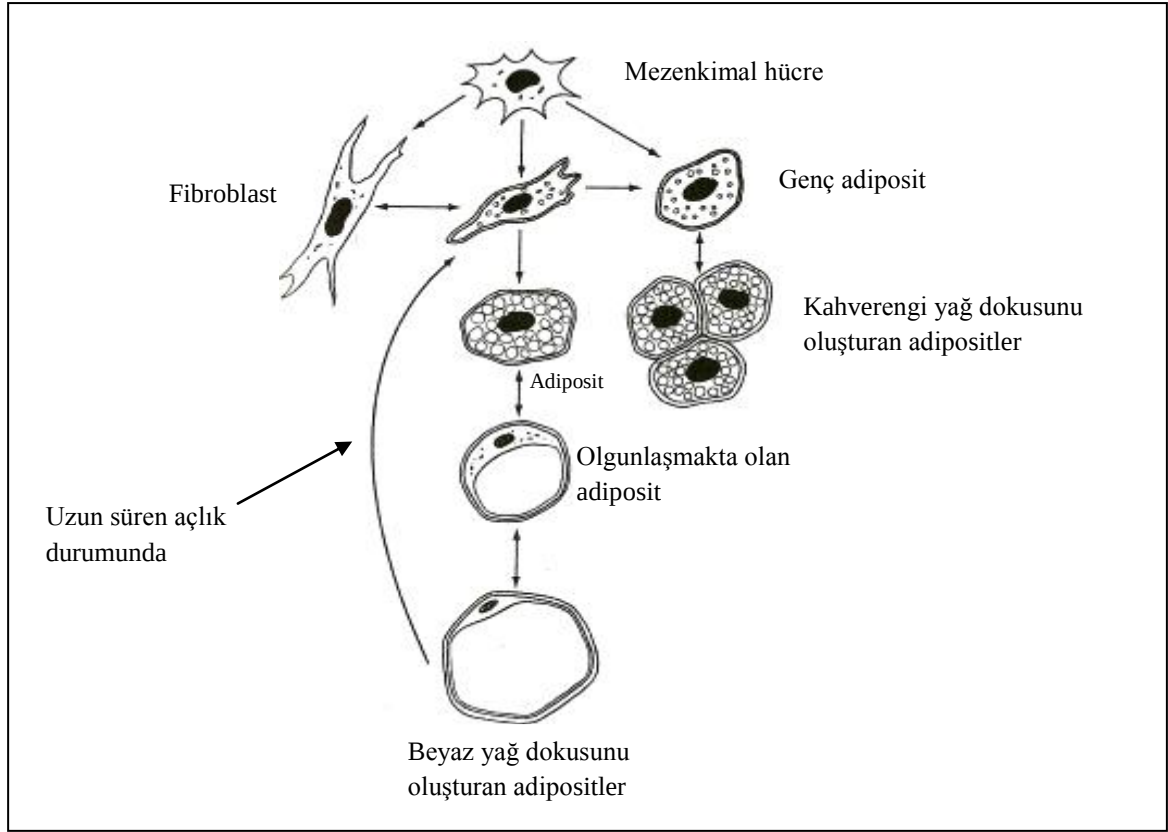
4. GENEL BİLGİLER

4.1. Adipoz Doku

Yağ dokusu veya adipoz doku, bağ dokusunun özel bir tipidir ve büyük oranda adiposit olarak adlandırılan lipid dolu hücrelerin gevşek bağlanmasıyla oluşmaktadır (6). Yağ dokusu hücre sayısı ve büyüklüğü bakımından yaşam boyu, enerji ihtiyacı ve tüketimine bağlı olarak sürekli hacim değişikliği gösteren bir dokudur (7, 8, 9, 10). Yağ dokusu vücutta en büyük enerji kaynağıdır ve bu enerji, açlıkta ve ihtiyaç duyulduğunda hızla dolaşıma yağ asitleri şeklinde geçebilecek trigliserid halinde depolanmıştır. Yağ hücrelerinden enerjinin (yağ asitlerinin), salgıladığı hormon ve sitokinlerin dolaşıma geçişi hormonal sinyallerle kontrol edilir. Yağ hücresine insülin, adrenalin, noradrenalin ve kortizon gibi maddeler etki ederek onun fonksiyonunu düzenlerler (11).

Preadipositler; mezodermal kökenli multipotent embriyonik kök hücrelerden oluşan ve adipositlere, kondrositlere, osteoblastlara dönüşebilen hücrelerdir. Preadipositler daha sonra beyaz yağ dokusu (tek damlalı yağ dokusu) ve kahverengi yağ dokusu (çok damlalı yağ dokusu) olarak adlandırılan, birbirinden farklı özellikteki farklı yağ dokusunu meydana getirmek üzere farklılaşmaya başlarlar. Fibroblastlara benzeyen genç adipositler sitoplazmasında farklılaşma sonucu küçük yağ damlacıkları birikmeye başlar. Hücrenin bir kutbunda birikmeye başlayan bu damlacıklar zamanla birbirleriyle birleşerek büyük, tek bir damla oluşturur. Sitoplazmayı tamamen dolduran yağ damlası, çekirdeği kenara iterek kendi etrafında çok ince bir sitoplazmik halka kalmasına yol açar. Kahverengi yağ dokusunda ise bu damlacıklar beyaz yağ dokusundaki gibi birleşmez ve sitoplazmasında çok sayıda yağ damlacığı bulundurur (Şekil 1) (12).

Puberteye kadar yağ hücre sayısı artmaya devam eder. Ergenlikten itibaren yağ hücresinde mitoz görülmez, hücreler sayıca artmaz, sabit kalır, sadece büyüklükleri değişir (11).



Şekil 1. Beyaz ve kahverengi yağ dokusunun oluşumu (12)

Adipositleri içeren doku amorf yapıdadır ve vücutta yaygın bir dağılım gösterir. Genç yetişkin bir insanın ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturur, bu ağırlığın yaklaşık %65'i triağılgiserol formundadır (13).

Yağ hücresinde enerji lipid damlacıkları halinde trigliserid olarak depolanır ve bu damlacıklar hücrenin yaklaşık %90'dan fazlasını, geri kalanı ise diğer hücre organellerini oluşturur (12). Adipositlere ek olarak adipoz doku; bağ doku bileşenleri (kollajen ve retiküler lif), sinir lifleri, vasküler stroma, lenf bezleri, bağışıklık hücreleri (lökositler, makrofajlar), fibroblast ve preadipositlerden bir matriks içerir (14).

Adipoz doku lipogenez ve lipoliz olaylarının gerçekleşmesi için gerekli olan tüm donanıma sahiptir. Ayrıca enerji depolama, fiziksel koruma, yağda eriyen vitaminleri depolama, termogenez gibi fonksiyonlarına ek olarak; adipositlerden ve adipoz stromal hücrelerden sentezlenen protein yapıları moleküller (adipokinler) sayesinde çeşitli fonksiyonlar göstermektedir (15). Adipoz dokunun sadece enerji kaynağı olmaması, birçok sitokin ve yağ dokusu kaynaklı peptidleri salgılama yeteneği olan aktif bir organ olmasından dolayı adipoz doku endokrin organ olarak kabul edilmektedir. Adipoz dokuda

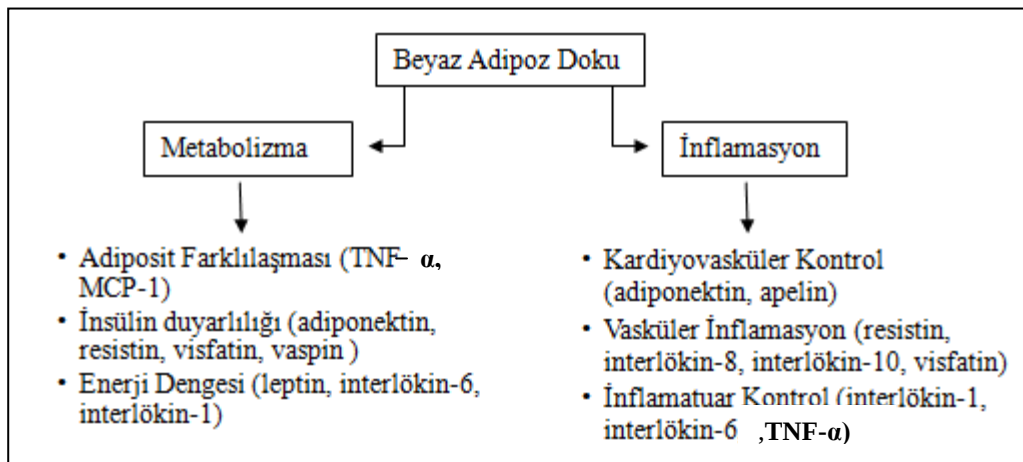
bulunan adiposit, preadiposit, makrofaj, endotel hücresi, fibroblast ve lökositler çeşitli hormon ve sitokinler salgılamakta, sonuçta endokrin, parakrin ve otokrin sinyallerle çeşitli metabolik etkiler oluşturmaktadır. (1, 6, 16, 17).

4.1.1. Adipokinler

Yağ hücresinden leptin, resistin, TNF- α , adiponektin, visfatin, apelin, vaspın, hepsidin, adipsin, IL-6, plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), transforming büyüme faktörü- α (TGF- α), anjiyotensinojen, asilasyon stimüle edici protein (ASP), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I), prostaglandin I₂ (PG I₂), prostaglandin F₂ α (PG F₂ α), gibi çok sayıda protein salgılandığı saptanmıştır (2, 18). Adipoz dokudan salgılanan bu proteinlere adipokin adı verilmekte ve bu proteinlerin metabolik, immünolojik pek çok fonksiyonları bulunmaktadır (17, 19, 20).

Adipokinler, enerji dengesi, glukoz ve lipid metabolizması, beslenmenin kontrolü, termogenez, insülin direnci, nöroendokrin fonksiyon, üreme, kan basıncı, immünite ve özellikle de kardiyovasküler fonksiyonlar üzerine önemli etkilere sahiptirler (21).

Yapılan çalışmalarda yağ dokusundan kaynaklanan adipokinlerin obezitenin komplikasyonları olan hiperlipidemi, diyabet, hipertansiyon, ateroskleroz ve kalp yetmezliği gibi hastalıkların patogenezinde rol oynadıkları gösterilmiştir. Ayrıca, bu maddelerin metabolik denge, immün yanıt, kan dolaşımı ve steroid metabolizmasında da rol oynadığı da bilinmektedir. Şekil 2’de beyaz adipoz dokusundan salgılanan belli başlı adipokinler ve genel fonksiyonları gösterilmiştir.

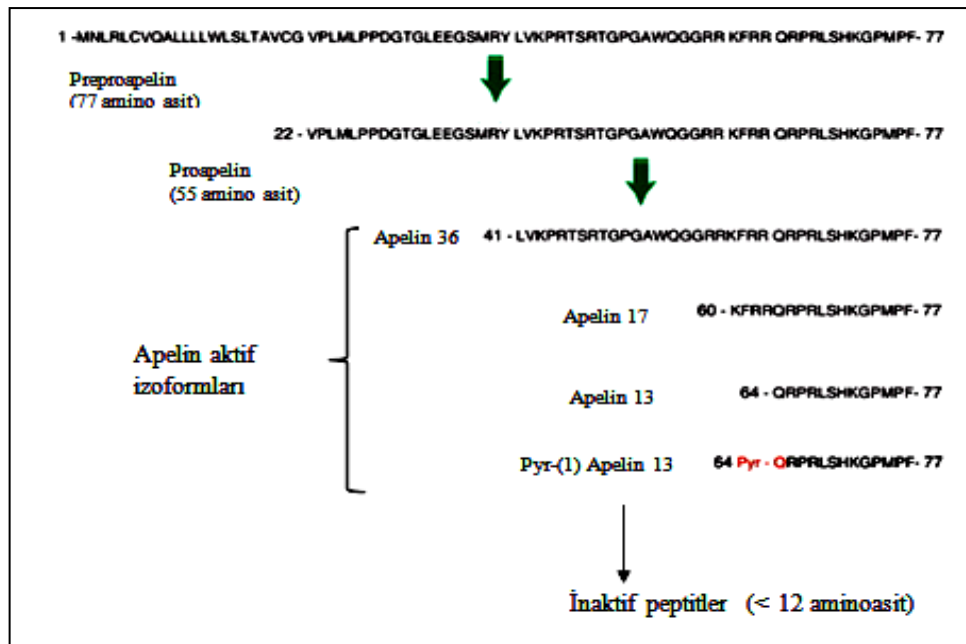


Şekil 2. Beyaz adipoz doku kaynaklı adipokinler ve fonksiyonları (22)

4.2. Apelin

Totemato ve arkadaşları tarafından 1998 yılında tanımlanan apelin, ilk olarak sığır midesinden izole edilmiştir. Bioaktif bir peptit olan apelin G proteinleri ile eşleşmiş reseptörlerin endojen ligandıdır. Apelinin santral sinir sistemi başta olmak üzere adipoz doku, karaciğer, böbrek, testis, kalp, yumurtalık, akciğer ve meme dokusu gibi birçok periferik dokuda sentezlendiği bulunmuştur (17). Apelin plazmada pikomolar konsantrasyonda bulunur (23).

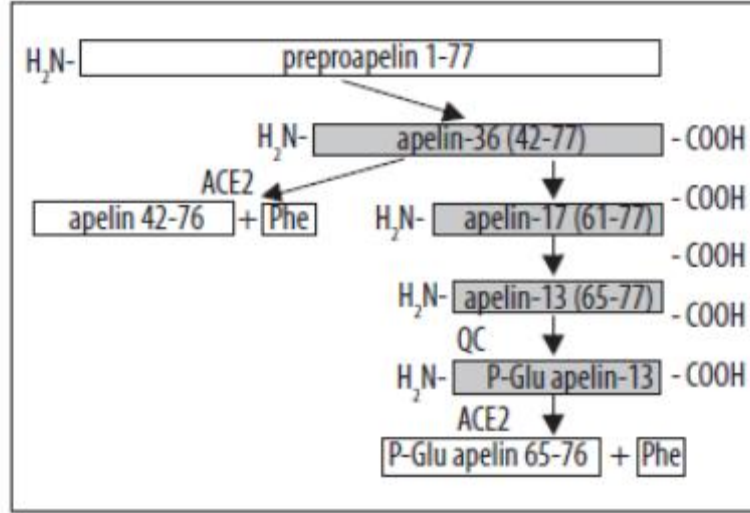
Apelin geni insanlarda Xq25-26.1 kromozomunda bulunur ve 77 aminoasitlik bir prepropeptid kodlar. Sentezlenen preproapelin daha sonra postranslasyonel mekanizmalarla daha kısa fakat aktif peptidlere ayrılmaktadır ki bunlar apelin-12, -13, -16, -17, -19 ve -36 olarak isimlendirilmektedir (Şekil 3). Birçok memelide (sıçan, fare, insan vb.) salınan preproapelinin sekansları yüksek düzeyde benzerdir (24). Apelin peptidlerinin biyolojik aktiviteleri peptid uzunluklarıyla ters orantılıdır (25).



Şekil 3. Apelin sentezi ve postranslasyonel mekanizmaları (26)

Son 12 C uç aminoasit formu en kısa aktif sıradır, apelin-11 ve daha kısa peptitler inaktiftirler (26). Apelin gen ekspresyonunun insülin ve TNF- α tarafından yükseldiği belirtilmiştir. Apelin ekspresyonunun insülinle direkt regülasyonu insan ve fare adipositlerinde gözlenmektedir (17).

Apelin molekülü, anjiotensin dönüştürücü enzim-2 ile metabolize edilir (Şekil 4). Apelinin C terminal fenilalanin kısmı, ACE-2 için alternatif bir substrat olur. Yani anjiotensinojen yerine apelin moleküllerini kullanır. Apelin-13 ve apelin-36'nın C uç kısmından fenilalanini ayıran enzim apelinin inaktif formlarına dönüştürür (27).



Şekil 4. Apelin peptidlerinin metabolizması. QC: glutaminil siklaz, ACE2: anjiotensin dönüştürücü enzim-2, P-glu: piroglutamilat, Phe: fenilalanin (Ercan'dan, 28).

4.2.1. Apelin Reseptörü

Apelin reseptörü (APJ) 1993 yılında O'Dowd ve arkadaşları tarafından 7-G-proteinlerine bağlı bir reseptör olarak tanımlanmıştır ve 380 amino asitten oluşmaktadır (17, 25, 29). Sıçan apelin reseptörü ise 377 aminoasitten oluşmuştur ve insan reseptörüyle % 89 diziliş benzerliği vardır. Bu reseptör için İnsan Genom Örgütü APLNR sembolü onaylanmıştır. AGTRL1, APJ, APJR ve FLJ90771 gibi birkaç isme sahiptir (30).

Apelin reseptörü olan APJ'nin ekspresyonu sıçanlarda, hemen hemen tüm perifer dokularda gösterilmiştir. Ancak özellikle beyin, kalp ve akciğerlerde daha yüksek bulunmaktadır (31). İnsanlarda apelin reseptörü ise (APJ); karaciğer, mide, pankreas, vasküler endotelial ve düz kas hücreleri, plasenta, adipoz doku, akciğerler, kalp, timus, prostat, testis, ovaryum, dalak, bağırsaklar ve beyin olmak üzere birçok merkezi ve perifer dokularda bulunmuştur (31, 32, 33).

Apelin reseptörü ile anjiotensin II reseptör (AT2) arasında benzer aminoasitler vardır (aminoasit dizilişi yönüyle % 30–40 benzerlik gösterir). Ancak buna rağmen,

anjiotensin-II reseptörleri, normalde anjiotensin-I'e bağlanırken benzer olan apelin reseptörüne bağlanmaz. Apelin reseptörü G-inhibitör proteine bağlanarak cAMP oluşumunu inhibe eder (33).

4.2.2. Apelinin Biyolojik Etkileri

Apelin birçok sistemi etkilediğinde özellikle kardiyovasküler sistem, immün sistem, santral sinir sistemi ve renin anjiotensin sistemi üzerine etkileri vardır.

Plazma apelin seviyeleri, vücut kitle indeksi (BMI) ile korelasyon gösterir. Obez hastalardaki bazal apelin plazma konsantrasyonu önemli ölçüde yüksektir (34). Födes ve arkadaşları normal insan plazmasında apelin seviyelerini 89.8 pg/ml bulmuştur. Obez hastalardaki apelin seviyesi ise 736 pg/ml gibi yüksek değerlere sahiptir (35).

Apelin kan beyin bariyerini basit difüzyonla geçebilir. Bu sayede iştah düzenleyen hipotalamik bölgelerde etkilidir. Ratların hipotalamusunda yeme alışkanlığını kontrol eden alanlarda, ventromedial nükleus ve paraventriküler bazı alanlarda da apelin mRNA tespit edilmiştir (36).

Apelinin sıvı elektrolit dengesini düzenlemedeki etkileri belirlenmiştir. Aynı zamanda, HIV ve santral sinir sistemi enfeksiyonlarında koreseptör olarak önemli bir role sahip olduğu Zhou ve ark.'nın yaptığı çalışmada gösterilmiştir (37).

Apelinin ROS bağımlı kardiyak hipertrofiyi serotonin ve H₂O₂ tarafından indüklenen serotonin ve oksidatif strese hipertrofik cevabı inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu etkisini katalaz aktivitesini ve mRNA ekspresyonunu arttırarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Apelinle hipertrofinin önlenmesi artan miyokardiyal katalaz aktivitesi ve azalmış plazma lipid hidroperoksitiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma ile apelinin katalaz aktivatörü gibi davrandığı ve serbest radikallere bağlı kardiyak hipertrofiyi önlediği gösterilmiştir (5).

Tablo 1. Apelinin etkileri (36)

Sistem	Etkileri
Kardiyak	Potent pozitif inotrop, kardiyomiyopatili hastalar ve hayvan modellerinde deęişen peptid ve reseptör konsantrasyonu.
Vasküler	Kan basıncı düşüklüğü (NO bağlantılı mekanizmanın kullanımı). Anjiotensin-2'nin basınca karşıt rolü.
Hipotalamik ve pitüiter adrenal aks	Apelin reseptörünün adrenalectomi akut ve kronik strese hipotalamik paraventriküler nükleuslardaki artışı, ACTH'da artan plazma seviyeleri.
Pitüiter	Hipotalamik nöronlardan vazopressin salınımının inhibisyonu, LH, FSH ve prolaktinin azalan plazma seviyeleri
Hipotalamus	Su tüketimini artırır. Ratların besin alımını değiştirir. Apelin reseptörünün hipertonic solüsyon tüketiminden sonra ve su kaybından sonra hipotalamik nükleuslardaki artışı.
GİS	Gastrik hücre proliferasyonun ve kolesistokinin salınımının artışı.
Adipoinsüliner aks	Adipokin salınımı insülinle uyarılır. Apelin konsantrasyonu obez kişilerde pozitif korelasyon gösterir. Hızlı insülin cevabını inhibe eder. (i.v. glukoz injeksiyonu ile)

4.3. Serbest Radikal Kaynakları

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar nedeniyle sürekli bir radikal oluşumu vardır. Hücrelerdeki metabolik olaylar sırasında farklı tür ve miktarlarda radikaller oluşmaktadır. Dokularda meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller; DNA, protein, karbohidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar verebilmektedir. Oksijen bulunan bir ortamda çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oksijen radikalleri yapılabilir. Özellikle oksijenin metabolize edildiği

canlılarda önemli derişimlerde radikal üretimi gerçekleşir. Serbest radikaller vücut dışından (eksojen) gelebileceğı gibi insan metabolizmasının doğal bir sonucu (endojen) olarak da oluşabilmektedir. Buna karşılık, canlı organizmalar serbest radikallerin potansiyel yıkıcı etkilerine karşı kendilerini korumak için çeşitli mekanizmalara sahiptir (38).

Endojen Kaynaklı Serbest Radikal Üretim Kaynakları

1. Mitokondriyal elektron transport sistemi reaksiyonları
2. Oksijenaz enzimlerinin reaksiyonları
3. Antimikrobiyal aktivite sırasında oluşan solunum patlaması
4. Otooksidasyon reaksiyonları

Eksojen Kaynaklı Serbest Radikal Üretim Kaynakları

1. Radyoaktivite
2. UV
3. Metal İyonları
4. Ksenobiyotikler (Yabancı kimyasallar)

4.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

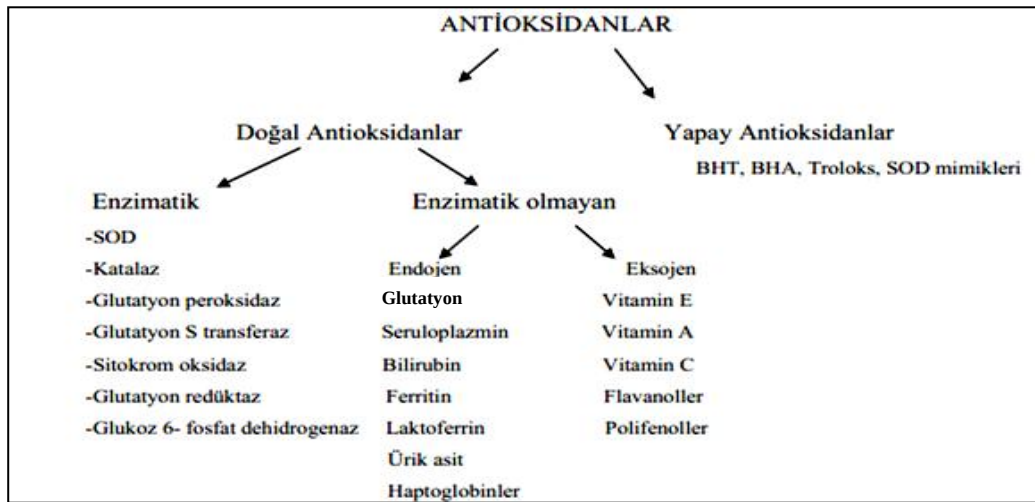
Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiğı hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlara “antioksidan savunma sistemleri” denir. Bu mekanizmada kullanılan moleküllere ise antioksidanlar denilmektedir (39). Vücuttaki fizyolojik aktivitenin doğal ürünü olan serbest radikalleri, organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanımla oksidan-antioksidan denge olarak tanımlayabilecek bir çizgide tutmaya çalışır. Yani sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli düzeyin üzerine çıkar veya antioksidanlar yetersiz olursa yani denge bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat ve nükleik asitler gibi hücrenin önemli yaşamsal yapılarında bütünlüğün bozulmasına ve canlıda patolojik olayların gelişmesine yol açarlar (40). Antioksidan savunma; radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin temizlenmesi, oluşan hücre deformasyonunun onarılması, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının

durdurulması ve endojen antioksidan kapasitenin artırılması olarak tanımlanan beş değişik şekilde yürür (4).

4.4.1. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar endojen (organizma tarafından sentezlenen) ve eksojen (dışarıdan besinlerle alınan) kaynaklı olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilir gibi; serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de sınıflandırılırlar (41). Hücre dışında ve hücrede farklı organellerde yerleşerek savunma mekanizmasında rol oynayan antioksidanlar; enzimatik yapıda olabilecekleri gibi non-enzimatik yapıda da olabilirler.

Enzimatik antioksidanlar, hücrenin çeşitli organellerinde etki gösteren süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi enzimlerden oluşurlar. Çeşitli metal iyonlarını bağlama, serbest radikalleri yakalama, hapsedme ve süpürme gibi etkilere sahip glutatyon, bilirubin, ferritin, seruloplazmin ve ürik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da mevcuttur. Sentezlendiği organizmada etki gösteren antioksidanlara endojen antioksidanlar adı verilir. Eksojen antioksidanlar ise daha çok bitkiler tarafından sentezlenen çeşitli vitamin ve fenolik maddeler olup dışarıdan organizmaya alınıp etkinlik göstermektedirler (42).



Şekil 5. Antioksidanların sınıflandırılması (42)

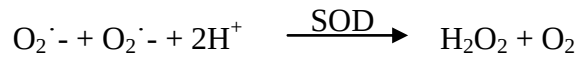
4.4.2. Antioksidan enzimler

Enzimler çok yüksek katalizleme gücüne sahip protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Bir canlıdaki yapım (sentez) ve yıkım reaksiyonlarının tümü enzimlerin katalitik aktiviteleri ve yöntemleriyle gerçekleştirilmektedir. Bu tanıma göre de, enzimler canlılığın oluşumu ve devamı için elzem maddelerdir. Canlı dışında da aktivite göstermeleri enzimlerin önemini bir kat daha artırmaktadır. Enzim üretimi genlerin kontrolü altında gerçekleştirilmekte (bir gen-bir enzim) ve her enzimin kendine özgü sıcaklık, iyon tepkimesi (pH) ve basınç koşulları bulunmaktadır.

En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu hidrojen peroksite dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve hidrojen peroksiti suya indirgeyen katalaz (CAT) dır. Bu endojen antioksidan enzimler serbest radikalleri zararsız hale getirirler. Böylece organizma serbest radikaller ve aktif oksijen türlerinden etkilenmez (43).

4.4.2.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1.), süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hücre bölünmelerindeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynayan bir metalloenzimdir



SOD gerçekte detoksifiye edici bir enzim değildir. Çünkü ürünü olan H₂O₂ toksik bir ajandır. Ancak bu reaksiyon reaktif oksijen radikallerinin detoksifikasyonuna giden yolun ilk basamağıdır. İkinci basamak katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından H₂O₂ in suya dönüşmesini katalizler (43, 44).

İnsanda SOD'nin iki tipi bulunmaktadır.

- a) Sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD) tek disülfid bağı ile birbirine bağlı iki aynı alt birimden oluşur ve alt birim başına birer çinko ile bakır içerir.
- b) Mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden izomerlerdir (Mn SOD). Genel olarak hücrede bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dir (45).

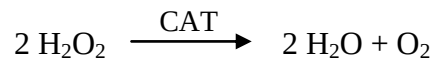
SOD fagosite edilmiş bakterilerin hücre içinde etkisiz hale getirilmesinde de rol oynar. Bu yüzden SOD, granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır. SOD enziminin yüksek katalitik aktivitesi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez (46).

SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO₂ artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde hücre içi süperoksit düzeyi düşük tutulur. SOD'ın hücre dışı aktivitesi çok düşüktür (43).

4.4.2.2. Katalaz

Katalaz (EC 1.11.1.6) 4 tane hem grubu bulunduran hemoproteindir. Her alt birim ayrıca bir molekül NADPH içerir. Bu molekül enzimin kararlılığında rol oynamaktadır. Enzim sitokrom sistemi içeren tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde mevcuttur. Katalaz esas olarak peroksizomlarda olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde yoğunudur. Aktivitesi; karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir.

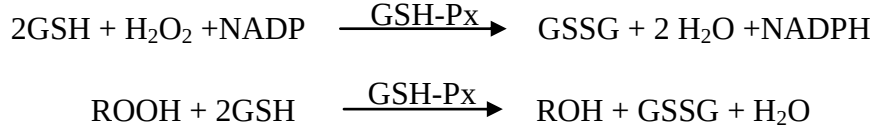
Görevi, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak; bu enzim bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir (4).



Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez (47).

4.4.2.3. Glutasyon Peroksidaz

GSH-Px, hücrede H₂O₂'nin temizlenmesinden sorumlu iki enzimden birisidir. Glutasyon peroksidaz (EC 1.11.1.19), glutasyon tarafından hidroperoksitlerin (ROOH ve H₂O₂) indirgenmesini sağlayarak, memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı koruyan 4 selenyum içeren tetramerik yapıda sitozolik bir enzimdir. Ayrıca büyüme, gelişme ve üreme için gerekli bir iz element olan selenyumu yapısında bulundurur. Selenyum eksikliğinin, bu enzimin aktivitesini azalttığı bilinmektedir (48, 49).



Genel olarak GSH-Px'ın H_2O_2 'e karşı en belirgin savunma sistemi olduğu düşünülmektedir. Tetramerik yapıda olan enzim en çok karaciğer ve eritrositte aktif olarak bulunmaktadır. Kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta ise düşük aktivitede bulunur. % 60-75'i sitoplazmada, % 25-40'ı mitokondride yer alır. Selenyuma bağımlı ve bağımsız iki tipi mevcuttur. Selenyuma bağımlı olan GSH-Px (Se-GSH-Px) sitozol ve mitokondride bulunmaktadır. Hem H_2O_2 hem de lipid hidroperoksitleri metabolize eder. Selenyumdan bağımsız olan GSH-Px (non-Se GSH-Px) ise sadece lipid hidroperoksitleri metabolize eder. Bu fonksiyonu ile lipid peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini önlemektedir (50).

4.5. Karaciğer ve Fonksiyonları

Karaciğer vücudumuz için hayati önemi olan birçok alanda görev alır. Büyüklük olarak, vücutta en büyük organ olma özelliğine sahiptir. Karaciğerin kendini onarma ve yenileyebilme gibi özellikleri vardır. Temel yapı birimi hepatositlerdir ve karaciğerin temel fonksiyonel elemanlarıdır. Bu hücreler hem iç hem de dış salgılama işlevlidir; bazı maddelerin sentezini yapar ve biriktirir, bazılarını detoksifiye eder, bazılarını da taşırlar.

Karaciğer, yaşam için gerekli birçok farklı fonksiyona sahiptir. Kendisi için gerekli proteinlere ek olarak, salgılamak üzere çeşitli plazma proteinlerini de (albümin, protrombin, fibrinojen ve lipoproteinler) sentezler. Ayrıca aminoasitleri, karbohidratları, lipidleri, vitaminleri, mineralleri alır, işler ve depolar. Karaciğer aynı zamanda bütün esansiyel olmayan amino asitlerin yapıldığı yerdir. Aynı zamanda karaciğer; tiroid, steroid ve diğer hormonların başlıca katabolizma yeridir ve plazma hormon düzeylerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (51).

Karaciğer metabolizma için önemli bazı maddeleri depolar. Alyuvarlardaki hemoglobine ek olarak, karaciğer demir, A, D ve B_{12} gibi bazı vitaminler için de önemli bir depo yeridir.

Karaciğer hücrelerinin düz endoplazmik retikulumu birçok maddenin kimyasal dönüşümünden sorumlu çeşitli enzim ve kofaktörleri bulundurur. Endoplazmik

retikulumdaki diğer enzimler birçok bileşiğin glukuronik asit, glisin ve glutatyonla birleşmesini sağlar. Karaciğerde yapılan dönüşümlerin çoğu, bileşiklerin böbreklerden kolayca atılmalarını sağlamak, suda çözünebilir yapmak içindir. Bazı metabolizma artık ürünleri safra içine salınır.

Karaciğerin sindirim sistemine en önemli katkısı safranın salgılanmasıdır. Karaciğer hücresi tarafından üretilen safra, safra asitleri, kolesterol, fosfolipidler ve safra pigmentlerini içerir. Bütün bu bileşikler, elektrolit yoğunluğu plazmaya benzeyen izotonik bir sıvıyla birlikte safra kanalcıkları içine verilir. Safra kanalcıkları daha büyük kanallara katılır ve en sonunda bir tek büyük safra kanalına boşalır. Safra kanallarını döşeyen epitelyum hücreler karaciğeri terk eden safra hacmine katkıda bulunan sulu, bikarbonatça zengin bir sıvı salgılar.

Reaktif oksijen türleri, oksidatif fosforilasyon, mitokondriyal elektron transportu, ksenobiotik metabolizması ve inflamasyon gibi hücre süreçlerinin bir parçası halinde devamlı olarak oluşturulurlar. Eğer bu radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşarlarsa hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi önemli bileşenlerinde hasara neden olurlar. Serbest oksijen radikalleri, karaciğer gibi yoğun fizyolojik ve metabolik olayların seyrettiği bir organda sürekli olarak üretilmekte ve detoksifiye edilmektedir. Ayrıca ilaçlar ve toksinler gibi eksojen bileşiklerin detoksifikasyonunda da primer organdır. Yani karaciğer, vücutta birikmesine izin verildiği takdirde zararlı olabilecek birçok maddenin temizlenmesini ve detoksifiye edilmesini sağlarken çok sayıda metabolik reaksiyonu idare eder (52, 53).

4.6. Malondialdehit (MDA)

Serbest radikallere bağlı hücre hasarındaki en önemli mekanizmalardan biri membranlardaki lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu, doymamış yağ asitlerinin radikaller tarafından peroksitler, alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipid peroksidasyonu sonucu membranlarda yapısal ve fonksiyonel hücre hasarı oluşur. Lipid peroksitlerinin yıkımından oluşan ürünlerden biri MDA'dır. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile meydana gelir Bu bileşik protein ve fosfolipidlerle çapraz

bağ ve polimerizasyon yaparak özelliklerinin kaybolmasını sağlar. MDA miktarı , lipid peroksidasyonunun derecesini gösterir

MDA, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi hücre fonksiyonlarını etkileyen olayları değiştirir. Hücrenin her tarafına dağılarak, özellikle sülfidril içeren enzimleri inaktive eder. Nükleik asitlerle etkileşmeye girerek genetik şifrede mutasyonlara yol açar (54).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. GEREÇ

5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve malzemeleri üretici firmaları ile birlikte Tablo 2’de listelenmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Etüv	Gallenkamp
Jel görüntüleme sistemi	Gel Logic 200 Imaging System
Elektroforez güç kaynağı	Thermo EC250-90
Elektroforez tankı	Thermo EC320
Vorteks	Nüve, NM 110
ELISA pleyti	Bioscience
Real Time PCR Cihazı	Roche Light Cycler 480 II
Santrifüj	Heraeus
Magnetik karıştırıcı	Ikamag RH
ELISA Okuyucusu	VERSA max
Otomatik pipet,10-100 µL	Eppendorf Research
Otomatik pipet,100-1000 µL	Eppendorf Research
Otomatik pipet,1-5 mL	Eppendorf Research
Mikro dalga fırın	Altus ALMD 171
pH metre	Hanna Instruments
Homojenizatör	Ultra-Turrax T25
Saf su cihazı	Aquatron 4 AD
Hassas analitik terazi	Metler Toledo AB 204-S
Deney tüpleri	SH&GLASS
Spektrofotometre	Beckman-Coulter
Kuartz Küvet	Agilent Technologies
Soğutmalı santrifüj	Allegra 64R Centrifuge
Steril DNAaz, RNAaz free pipet uçları	Greiner

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmalar, ürün kodları ve bazılarının saflık düzeyleri Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici firma, ürün kodu ve saflığı
Agaroz	Serva, 11404-250G
Etidyum bromür	Sigma, E7637-1G
DEPC	Sigma, D5758
Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)	Merck, >%99.5 (6329)
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Lancaster %98, 13098
Sülfürik asit (H_2SO_4)	Carlo Erba, %96 (d=1.84 g/mL)
Ksantin	Sigma, X-0626
EDTA	Carlo Erbo Reagent, Code No 303227
Nitro blue tetrazolium (NBT)	Sigma, 97596L5
Sığır Serum Albumin (BSA)	Sigma, Lot#058K0726
Amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Merck, Art 1216
Bakır klorür (CuCl_2)	Lancaster, 13167
Ksantin oksidaz	Sigma, Lot#SLBB1574V
Etanol	Sigma, Lot#34870, %99.8
Triton X-100	Merck, Art 11869
Potasyum klorür (KCl)	Merck, Art 4935
Fosforik Asit (H_3PO_4)	Merck, Art 563, %85
Asetik asit (CH_3COOH)	Merck, Art 56, %99.5
Tris-HCl	AppliChem, Lot 5X002338 %99
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, 35050
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 314, %37
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Sigma, A6011
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck, Art 4871
Potasyum klorür (KCl)	Merck, Art 4935
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma, Lot#99H1198
1,1,3,3-tetrametoksipropan	Sigma, Lot 76H3424, %99
Kloroform	Merck, UN 1888, %99
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck K16290176

5.2. YÖNTEM

Yapılan deneylerin tümü Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2012/5 protokol no'lu etik kurulu başvurusunun onayı ile yapıldı.

Bu çalışmada KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezinden temin edilen 32 adet erkek sıçan kullanıldı. Çalışma başlamadan önce deney hayvanlarının vücut ağırlıklarına göre dengeli bir şekilde ayarlanarak deney grupları belirtildi. Hayvanlar oda sıcaklığında (21 ± 2 °C), ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışık fazında tutuldu. Sıçanlar deney düzeneğine adaptasyonları için enjeksiyonlardan iki gün önce kafeslere yerleştirildi.

5.2.1. Deney Grupları

Gruplara (dört grup, her grup için sekiz sıçan) ayrılmış olan sıçanlar kafeslere yerleştirildikten sonra enjeksiyonlar sabah 9.00-10.00 saatleri arasında uygulandı. Apelin-13 çözeltisi günlük hazırlandı. Çözücü olarak serum fizyolojik kullanıldı.

Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu.

- 1.grup: Kontrol:** 1 mL/kg /gün (i.p.) Serum Fizyolojik
- 2.grup: Apelin- 13:** 30 µg/kg /gün (i.p.)
- 3.grup: Apelin- 13:** 100 µg/kg /gün (i.p.)
- 4.grup: Apelin- 13:** 300 µg/kg /gün (i.p.)

5.2.2. Deney Planı

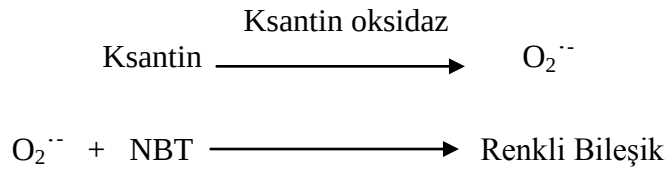
Çalışmada kullanılan sıçanlar yukarıda belirtilen gruplara uygun olarak 15 gün süreyle apelin 13 uygulaması yapılmıştır. Hayvanların dekapitasyonunu takiben, karaciğer dokuları alındı ve elde edilen doku örnekleri bir kısmı kuru buz içine yerleştirilmiş 1 mL'lik plastik ependorf tüplere konuldu ve enzim aktivitesi ölçümüne kadar -80°C dondurucuda saklandı. Bir kısmı ise, kuru buz üzerinde dondurularak DNaz, RNaz içermeyen steril ependorflara alınarak, gen ekspresyonu analizi için çalışmanın yapılacağı zamana kadar -80°C'de saklandı.

5.2.3. Karaciğerde Antioksidan Enzimlerin Ölçülmesi

Dokular 50-60 mg olacak şekilde, pH'sı 7.4 olan 50 mM'lık 2 mL Tris-HCl (0.5 mL/L Triton X-100) soğuk tampon çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenatlar 3 000 rpm de +4°C'de santrifüj edildikten sonra 1mL homojenat çözeltisinden alınıp 0.5 mL etanol-kloroform (2:3 oranında) ile karıştırıldı ve +4°C'de 10 000 g'de 30 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanda SOD, CAT, GSH-Px aktivite ölçümleri yapıldı. Etanol-kloroformla çöktürme yapılmayan süpernatanda ise protein tayini yapıldı.

5.2.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Süperoksit dismutaz aktivitesi Sun ve Oberley'in (55) metoduna göre ölçüldü. Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sisteminin oluşturduğu süperoksit radikallerinin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgeyerek oluşturduğu rengin 560 nm'de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Bu indirgenme enzimin olmadığı ortamda meydana gelir ve mavi-mor renk oluşur. Ortamda SOD olduğunda ise indirgenme olmaz, enzimin miktar ve aktivitesine bağlı olarak daha açık bir renk oluşur. SOD' un ortamdaki süperoksit radikallerini uzaklaştırması sonucu optik dansitede meydana gelen azalmadan yararlanılarak SOD tarafından katalizlenen reaksiyonun % inhibisyonu hesaplandı. % 50 inhibisyona karşı gelen SOD miktarı bir enzim ünitesi olarak alındı.



SOD Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltilerin hazırlanışı:

1. 0.3 mM ksantin çözeltisi: 3.65 mg ksantin 80 ml deiyonize suda çözüldü.
2. 0.6 mM EDTA çözeltisi: 8.93 mg EDTA 40 mL deiyonize suda çözüldü.
3. 150 µM NBT çözeltisi: 4.9 mg NBT 40 mL deiyonize suda çözüldü. NBT günlük hazırlandı.
4. 400 mM Na₂CO₃ çözeltisi: 1.01 gr Na₂CO₃ 24 mL deiyonize suda çözüldü.
5. %0.1 BSA (sığır serum albümini): 12 mL deiyonize suda 12 mg BSA çözüldü.

Reaksiyon karışımı; 80 mL 0.3 mM ksantin çözeltisi, 40 mL 0.6 mM EDTA çözeltisi, 40 mL 150 µM NBT çözeltisi, 24 mL 400 mM Na₂CO₃ çözeltisi, 12 mL BSA karıştırılarak hazırlandı.

6. 2M amonyum sülfat: 2.64 g amonyum sülfat 10 ml deiyonize suda çözöldü.

7. 167 U/L ksantin oksidaz çözeltisi: 3.3 U/mL'lik orijinal şişeden 100.9 µL alınıp 2 mL'ye amonyum sülfatla tamamlandı. Ksantin oksidaz günlük hazırlandı.

8. 0.8 mmol/L CuCl₂ çözeltisi: 5.37 mg CuCl₂ 50 mL deiyonize suda çözöldü.

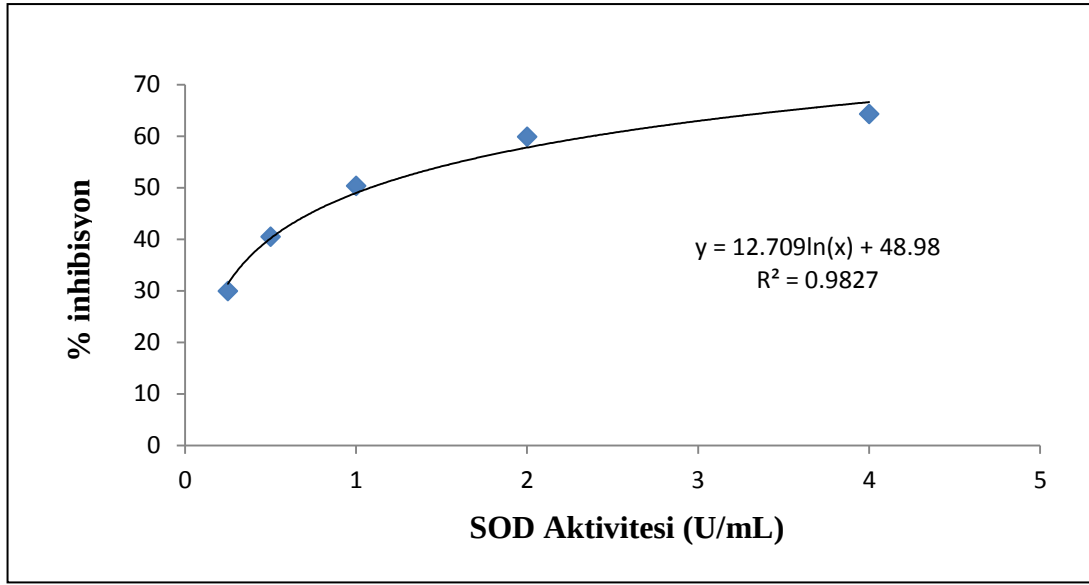
9. SOD standartları; 0.125, 0.5, 1, 2, 4 ünite/ml olarak, pH'sı 7.4 olan 50 mM'lık Tris-HCl çözeltisi ile dilue edilerek hazırlandı. Hesaplamalar için kullandığımız kör Tris-HCl tamponu ile hazırlandı.

Tablo 4. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan karışım

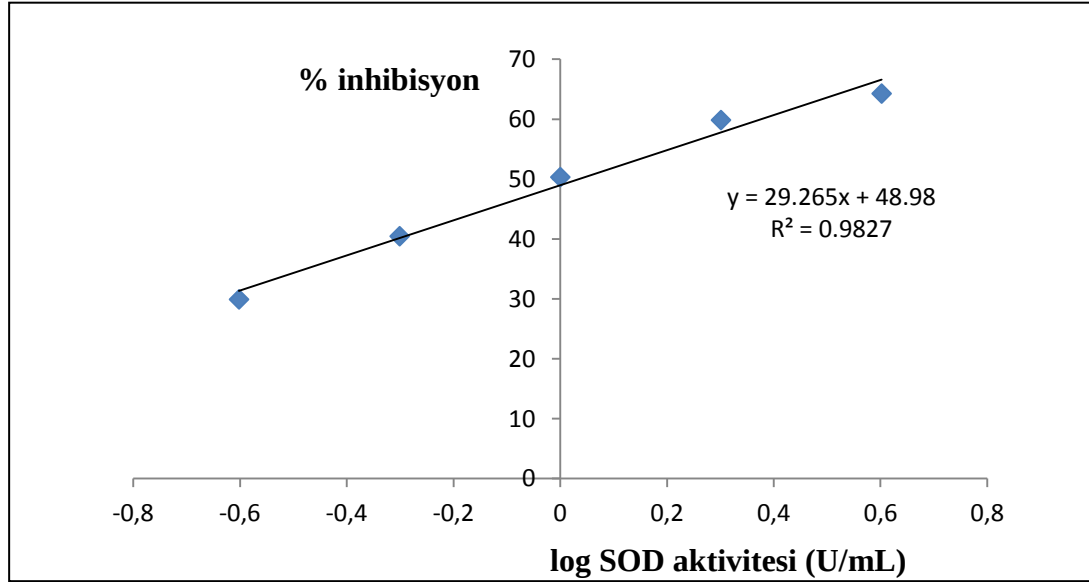
Çözeltiler	Hacim (ml)
Reaksiyon karışımı	1.25
Numune	0.25
Ksantin oksidaz	0.025
25 ⁰ C da 20 dakika su banyosunda karanlıkta inkübasyona bırakıldı.	
Bakır klorür	0.5
560 nm'de absorbans ölçöldü.	

Enzimin inhibisyonu Eş.1 kullanılarak hesaplandı. Şekil 6'daki standart grafiğı, SOD aktivitesinin logaritması alınarak şekil 7'deki lineer standart grafiğıne dönöştüröldü. Bu standart grafiğınden yararlanılarak numunelerin % inhibisyonları bulunup SOD aktivitesine dönöştüröldü. Sonuçlar protein miktarına bölünerek U/g protein olarak hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A_{\text{Kör}} - A_{\text{Numune}})}{A_{\text{Kör}}} \times 100 \quad (1)$$



Şekil 6. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği



Şekil 7. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonların logaritmasına karşı % inhibisyon grafiği

5.2.3.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini

Hidrojen peroksidin oksijen ve suya hidrolizini katalizleyen katalaz aktivitesinin tayininde Aebi (56) metodu kullanıldı. Bu metodun esası, H_2O_2 'nin CAT tarafından parçalanması sonucu 240 nm'deki absorbans düşüşüne dayanmaktadır.

Katalaz Ölçümünde Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanması

1. 50 mM fosfat tamponu (pH:7.00): 3.405 g KH_2PO_4 ve 4.45 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 500'er ml deiyonize suda çözüldüler. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1.5 oranında karıştırıldı ve pH'sı 7.0'a ayarlandı.

2. 30 mM H_2O_2 (hidrojen peroksit): 0.34 mL %30'luk H_2O_2 alınarak fosfat tamponu ile 100 mL' ye tamamlandı. Günlük hazırlandı.

Doku homojenatları fosfat tamponu ile 50 kat seyreltilerek ölçüm yapılacak numuneler oluşturuldu.

Deneyin yapılışı: Numune için gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra tablo 5'de belirtildiği gibi pipetlemeler yapıldı.

Tablo 5. Katalaz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı

	Kör(mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	1.00	-----
Numune	2.00	2.00
H_2O_2	-----	1.00

Kuvartz küvete hidrojen peroksit ilave edilir edilmez 30 s boyunca 10 s aralıklarla 240 nm'deki absorbanslardaki düşüş izlendi.

Katalaz aktivitesinde birim olarak birinci derece reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. 10 s'lik zaman aralığı için Eş. 2'den yararlanılarak aktivite hesaplandı.

$$k = (2.3/10) \times \log (A_1/A_2) \text{ s}^{-1} \quad (2)$$

A_1 = Başlangıç absorbansı

A_2 = 10 s sonraki absorbans

Eş. 2'ye göre bulunan k değeri seyreltme faktörü ile çarpıldı. Daha sonra karaciğer dokularında g protein başına katalaz aktivitesi hesaplandı (k/g protein).

5.2.3.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Tayini

Glutasyon peroksidaz, glutasyon tarafından hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlayarak, memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı koruyan selenyum içeren tetramerik yapıda sitozolik bir enzimdir.

Glutasyon peroksidaz aktivite tayininde katalog numarası #ADI-900-158 olan Enzo Life Science firmasına ait glutasyon peroksidaz kiti kullanıldı. Enzim aktivitesi 340 nm’de kinetik olarak ölçüldü. Sonuçlar U/mL cinsinden hesaplandı. Daha sonra karaciğer dokularında g protein başına glutasyon peroksidaz aktivitesi U/g cinsinden hesaplandı. Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi Eş. 3’e göre hesaplandı.

$$\text{Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi} = \frac{\Delta A_{340} / \text{dak.}}{0.00373 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0.19 \text{ mL}}{0.02 \text{ mL}} \quad \text{Dilüsyon (3)}$$

5.2.4. Protein Tayini

Protein miktar tayini Bradford yöntemine (57) göre yapıldı. Yöntem organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek mavi renk oluşturmaları esasına dayanır.

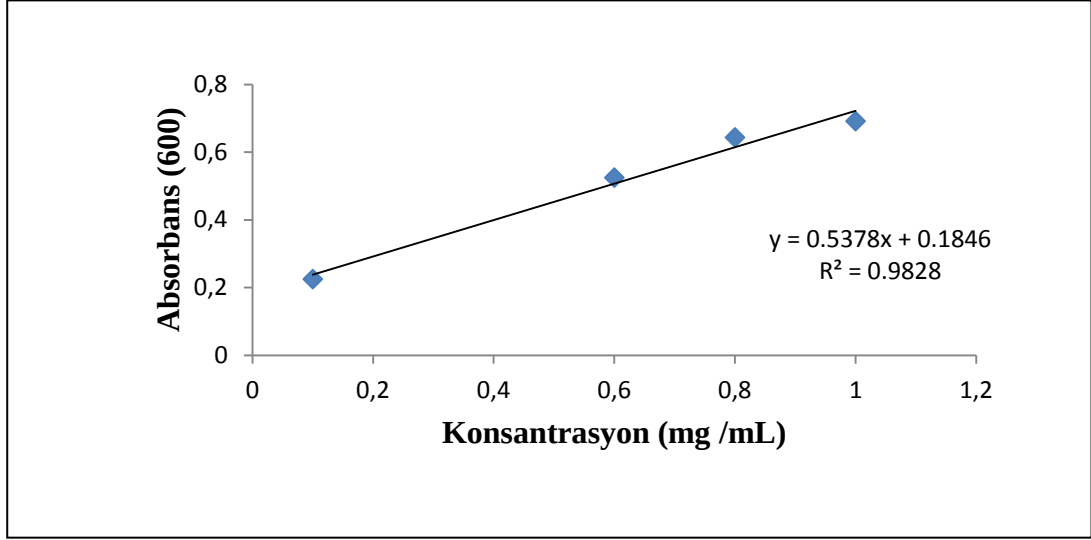
Protein Tayini Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler:

Bradford Reaktifi: 25 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 12.5 mL %95’lik etanolde çözüldükten sonra üzerine 25 mL %85’lik H₃PO₄ eklendi. Son hacim 250 mL’ye tamamlandı.

%20’lik HCl çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 27.03 mL %37’lik HCl’den alındı son hacim saf su ile 50 mL’ye tamamlandı. Kullanılan cam malzemelerdeki olabilecek protein kalıntılarını uzaklaştırmak için yıkama çözeltisi olarak kullanıldı.

Standart çözeltiler: Standartlar Sığır Serum Albumin (BSA)’dan hazırlandı. 25 mg BSA bir miktar suda çözüldükten sonra son hacim saf su ile 10 mL’ye tamamlandı. Bu çözeltilerden protein tayin standartları 1, 0.8, 0.6, 0.1 (mg/mL) konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı.

Reaksiyon karışımı, Bradford Reaktifi 100 µL, homojenat tamponu (pH'sı 7.4 olan 50 mM'lık Tris-HCl) ile yirmi kat seyreltilmiş numuneden 10 µL alınarak hazırlandı. Bu miktarlar pleyte yüklendikten sonra pipetaj yapılarak karıştırıldı. Spektrofotometrede 600 nm'de ölçüm yapıldı. Sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı.



Şekil 8. Protein tayininin standart grafiği

5.2.5. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü

MDA ölçümü Mihara ve Uchiyama yöntemine (58) göre yapıldı. Bu metodun esası, MDA' nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu rengin 532 nm'deki absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır.

Karaciğer dokusunun yaklaşık 50-60 mg'lık kısmı 2mL %1.15'lik KCl (0.5 mL/L Triton X-100 içeren) çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenatlar 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek elde edilen süpernatantlarda ilgili ölçümler yapıldı.

Malondialdehit Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler:

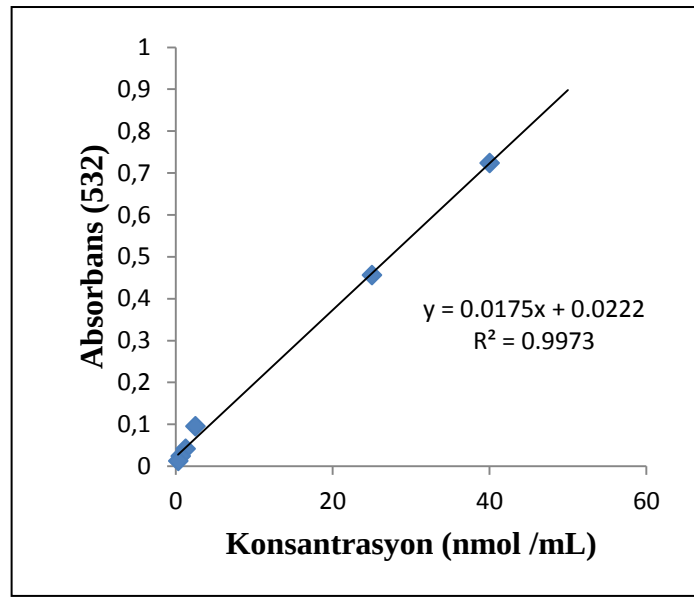
Doku homojenizasyon tamponu: 1.15 g KCl hassas terazide tartıldı ve son hacim distile su ile 1 L' ye tamamlandı. Oluşan çözeltinin üzerine 0.5 mL Triton X-100 eklendi.

%1'lik H₃PO₄ çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL %85'lik H₃PO₄ alındı ve son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi: 0.67 g TBA tartıldı, 50 mL distile ve 50 mL asetik asit ilave edilerek magnetik bar yardımıyla karıştırılıp çözüldü.

Standart çözeltiler: 43 µL 0.01 M HCl alındı ve 50 ml saf suya eklendi. Üzerine 82.5 µL 1,1,3,3 tetrametoksipropan çözeltisi eklendi ve 50°C’ de 1 saat inkübe edildi. Bu şekilde hazırladığımız ana stok çözeltisinden çeşitli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 nmol/mL’lik standart çözeltiler hazırlandı.

0.5 mL doku homojenatı, 3 mL H₃PO₄ ve 1 mL tiyobarbitürik asit eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı ve vortekslendi. Ardından 100°C’de 45 dk etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra tüpler 4000 rpm’ de 10 dk santrifüj edildi. Her numunenin süpernatantından 300’er µL pleyte yüklendikten sonra 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Sonuçlar ise nmol/g doku olarak hesaplandı.



Şekil 9. MDA standart grafiği

5.2.6. Karaciğer Dokusundan RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu EZ-RNA total RNA (cat. No. 20-400-100) izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. Kit prosedürüne göre sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı.

1. 30-50 mg arasında tartılan karaciğer dokularının üzerine 0.5 mL denatürasyon çözeltisi (guanidin tiyosiyanat) eklendi ve kuvvetlice karıştırılarak pipet ucuyla iyice parçalanması sağlandı.

2. Homojenize edilen örnekler oda sıcaklığında 5 dk bekletilerek nükleoproteinlerin ayrılması sağlandı.
3. Her örneğin üzerine 0.5 mL ekstraksiyon çözeltisi (fenol-kloroform) eklendi ve 15 saniye dikkatlice karıştırılıp oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
4. Çözelti 12000 g'de +4°C'de 15 dk santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonunda berrak üst faz alındı ve üzerine 0.5 mL izopropil alkol eklendi, ağzı kapatılıp 10-20 s vortekslendi.
6. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek RNA çökeleği oluşması sağlandı.
7. Çökeleğin ayrılması için 12000 g'de +4°C'de 10 dk santrifüj edildi ve ardından süpernatant atıldı.
8. Dipteki RNA pelletinin üzerine 1 mL %75'lik etanol eklendi ve vortekslendi.
9. 7500 g'de +4°C'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
10. Tamamen kurumasına müsaade edilmeden fazla etanol uzaklaştırıldı.
11. RNA pelleti 100 µL dietil pirokarbonatlı (DEPC) su ile pipetaj yapılarak tekrar çözüldü ve 55°C'da 12 dk thermomixer' de bekletildi.

Elde edilen RNA örnekleri 1/25 oranında (2µL RNA + 48 µL DEPC'li su) seyreltilerek 260/280 nm'de konsantrasyonları ve absorbans oranları nanodrop kullanılarak belirlendi (Elde edilen RNA'nın saflığı 260/280 absorbans oranına bağlıdır ve iyi bir RNA izolasyonu için bu oranın 1.6-1.9 arasında olması gerekir).

İzole edilen RNA örneklerinden bazıları agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Daha sonra reverse transcription ile cDNA elde edildi

5.2.7. Reverse Transcription-PCR ile RNA' dan cDNA Elde Edilmesi

Ekstraksiyon sonunda elde edilen total RNA, komplementer DNA (cDNA) sentezi için kalıp olarak kullanıldı. Bu amaçla Promega ticari RT-PCR kiti kullanıldı ve aşağıdaki işlemler sırası ile uygulandı.

4 µL 25 mM MgCl₂, 2 µL RT 10x tampon, 2 µL dNTP karışımı 10mM, 0,5 µL Recombinant RNAaz inh., 0,7 µL Enzim(AMV) Rev.Tr., 1 µL Oligo(dT)₁₅ primer, 2 µL son konsantrasyonu 1 µg/µL toplam RNA, 7.8 µL Nükleaz free su karıştırılarak 20 µL' lik reaksiyon ortamı hazırlandı.

RNA örneklerine hazırlanan reaksiyon ortamına 42°C’de 15 dakika, 95°C 5 dakika, 4°C 5 dakika olmak üzere Reverse Transcription-PCR protokolü uygulandı. Örneklerin bir kısmı agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Elde edilen cDNA örnekleri -80°C Real-Time PCR yapılana kadar saklandı.

5.2.8. Real Time PCR

Real Time PCR’da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarlarıyla orantılı olarak artan floresans boyanın verdiği sinyalin izlenmesiyle belirlenir. Real time PCR da ilgili genlerin ekspresyonlarını belirlemek için SYBR Green boyası kullanıldı. SYBR Green yalnızca çift zincirli DNA’ya bağlandığında floresans ışımaya veren bir boyadır. Çözeltideki bağlanmamış boya çok düşük floresans ışımaya yapar. SYBR Green’in DNA’ya bağlanması arttıkça 530 nm dalga boyunda floresans ışımaya yükselmektedir. PCR süresince SYBR Green floresans ışımadaki artış direkt olarak üretilen çift zincirli DNA oranına bağlı olarak artmaktadır (62). Real Time PCR işlemi Roche LightCycler 480 II marka cihazda katalog no: 11782-200/01K olan invitrogen Universal EXPRESS SYBR GreenER qPCR SuperMixes and Two-Step qRT-PCR kiti prosedürü doğrultusunda yapıldı. Bu kit kullanılırken ek olarak elde ettiğimiz cDNA’lara ve kullanacağımız enzimlerin PCR primerlerine ihtiyaç vardır. Tablo 6’da Real Time PCR’da kullanılan primer dizileri verildi.

Tablo 6. Real Time PCR’da kullanılan primer dizileri (60)

Primer adı		Primer sırası
β-aktin	forward	5’-CTG ACC GAG CTG GCT AC- 3’
	reverse	5’-CCT GCT TGC TGA TCC ACA - 3’
Katalaz	forward	5’- GGC AGC TAT GTG AGA GCC- 3’
	reverse	5’- CTG ACG TCC ACC CTG ACT3’
GSHpx	forward	5’- CTC TCC GCG GTG GCA CAG T- 3’
	reverse	5’-CCA CCA CCG GGT CGG ACA TAC-3’
SOD (Cu-Zn)	forward	5’-GTT CCG AGG CCG CGC GT-3’
	reverse	5’-GTC CCC ATA TTG ATG GAC-3’

5.2.8.1. Real Time PCR Protokolü

1- Amplifikasyonun (Büyütme) başlangıcında, reaksiyon karışımı denatüre DNA'yı, primerleri ve SYBR Green boyasını içerir

2- Primerlerin yapışması (Annealing): Bu aşamada primerlerin ortamda bulunan hedef DNA komponenti ile birleşmesi ve tekrar ayrışması olayı sonrasında, çok az boya molekülü çift zincire bağlanabilir. DNA'ya bağlanma sonucunda uyarıma bağlı olarak SYBR Green moleküllerinin ışığı yaymasında önemli bir artış olur.

3- Uzama (Elongasyon) sürecinde, daha çok boya yeni sentezlenen DNA'ya bağlanır. Yeni sentezlenen çift sarmal yapılı DNA molekülünün yapısına boya katılarak zaman içerisinde floresans miktarında artışa neden olur. Gelecek ısıtma döngüsü için DNA denatürasyonuna bağlı olarak boya molekülleri salınırlar ve floresans ışımaya sinyali düşer.

Her PCR döngüsünün uzama basamağının sonunda floresans ışık şiddeti ölçümü amplifiye olmuş DNA'nın miktarındaki artışı monitörden izleyebilmek için yapılır. Sadece istenen PCR ürününün amplifiye olduğundan emin olmak için erime eğrisi analizi PCR'dan sonra yapılabilir. Erime eğrisi analizinde reaksiyon karışımı yavaşça 95C⁰'ye kadar ısıtarak çift zincirli DNA eritilir ve SYBR Green I floresansındaki sürekli azalış tespit edilir. Floresans ışık şiddetindeki bu azalış erime piki olarak monitörden görülebilir. Her bir erime piki DNA ürün partikülünün karakteristik erime sıcaklığını (T_m) gösterir. Erime sıcaklığı (T_m), çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA'ya dönüşümünün %50'sinin tamamlandığı sıcaklıktır.

cDNA'ları oluşturulan her bir örnek için Tablo 7'deki gibi pipetlemeler yapıldıktan sonra LightCycler 480 II (Roche, Germany) cihazında Tablo 8'deki program eşliğinde Real Time PCR yapıldı (59).

Tablo 7. Örneklerin Real Time PCR için hazırlanması

Enzimler için eklenecek Reaktifler	1 örnek için hacim	32 örnek için hacim
SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal	10 µL	380 µL
10 µM forward primer (500 nM final)	1 µL	38 µL
10 µM reverse primer (500 nM final)	1 µL	38 µL
Nükleaz free su	3 µL	114 µL
cDNA (her örnek için)	5 µL	

Tablo 7’de verilen miktarlar kullanılarak beta aktin ve enzimler için ayrı ayrı reaksiyon karışımı hazırlandı. β -aktin 32 örnek için iki kez çalışıldı. Bu yüzden reaksiyon karışımı diğerlerinin iki katı olacak şekilde hazırlandı. Roche LightCycler 480 II marka qPCR cihazının özel pleytine beta aktin, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz PCR karışımları 32 numune için kuyucuklara 15 µL pipetlendi. Bu kuyucuklara her örneğe ait cDNA örneklerinden 5 µL ilave edilerek toplam hacim 20 µL’ye tamamlandı. Her örneğe ait cDNA yüklendikten sonra pleytin üzeri kaplayıcı ile iyice kaplandı. Pleyt kısa süreli santrifüjlendikten sonra Roche LightCycler 480 II marka qPCR cihazına yerleştirildi. Aşağıdaki tabloda verilen protokol doğrultusunda qPCR programı uygulandı ve qPCR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 8. Real-Time Protokolü

Program	Döngü	Analiz Modu
Ön inkübasyon	1	-
Amplifikasyon	50	Kantifikasyon
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrileri
Soğutma	1	-

Hedef Sıcaklık (°C)	Elde Etme Modu	Süre(hh:mm:ss)	Sıcaklık Artış Hızı (°C/s)
Ön inkübasyon			
95	-	00:05:00	4.4
Amplifikasyon			
95	-	00:00:10	4.4
Primer Tm	-	00:00:10	2.2
dakikada 5 °C			
72	Tek	00:00:10	4.4
Erime Eğrisi			
95	-	00:00:05	2.0
65	-	00:01:00	2.0
97	Devamlı		
Soğuma			
40	-	00:00:10	2.0

5.2.9. Ürünlerin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

RNA izolasyonu sonunda elde edilen RNA örnekleri, cDNA örnekleri ve qPCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütüldü ve elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı ve görüntüler kaydedildi. Jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

TAE (Tris-asetikasit-EDTA) elektroforez tamponu: 242 g Tris, 37.2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bir miktar deiyonize suda çözündü ve üzerine 57.1 asetik asit ilave edildi. 1N NaOH ile pH 8.5'a ayarlandı ve son hacim 1L'ye tamamlandı. Hazırladığımız TAE tamponunu 50 kat seyreltildi ve hem elektroforez tamponunu hazırlamada, hem de agaroz jelin hazırlanmasında kullanıldı.

Etidyum Bromür Çözeltisi: 100 mg etidyum bromür 10 mL deiyonize suda çözündü (10mg/mL). Buzdolabında (+4°C'de) saklandı.

% 2'lik agaroz jel hazırlanması: Beher içerisine 0.8 g agaroz 40 mL TAE (tris-asetikasit-EDTA) tamponuna ilave edildi ve karışım mikrodalga fırında 30 saniye çözünmesi sağlandı. Elde edilen jele 10 µL etidyum bromür eklendi ve hazırlanan agaroz, jel tablasına döküldü. Jel tamamen donduktan sonra taraklar çıkartıldı ve elektroforez tankına yerleştirildi.

Ürünlerin Jele Yüklenmesi: Her bir örnekten 6 µL ve 6 µL yükleme boyası karıştırıldı ve elektroforez tankındaki agaroz jele zarar verilmeden kuyucuklara yüklendikten sonra 90 voltta 30 dk ürünlerin göçü sağlandı. Yürütme işleminin sonunda elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı ve kaydedildi.

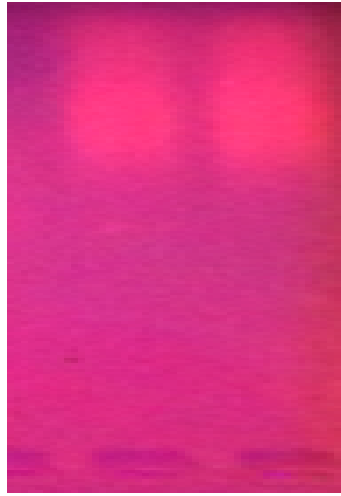
5.2.10. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler:

Elde edilen sonuçların ortalama ve standart sapmaları incelendi. Normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak hesaplandı. Grup ortalamalarının karşılaştırılmasında ANOVA testi, Post-Hoc olarak Bonferroni düzenlemesi yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

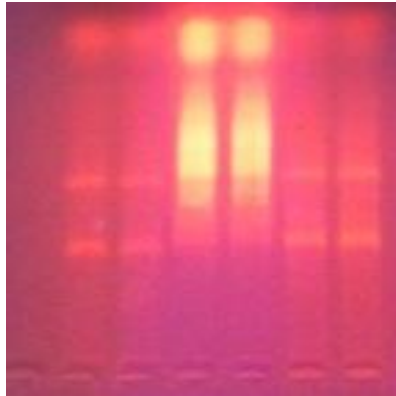
6. BULGULAR

6.1. AgaroZ Jel Elektroforez Görüntüleri

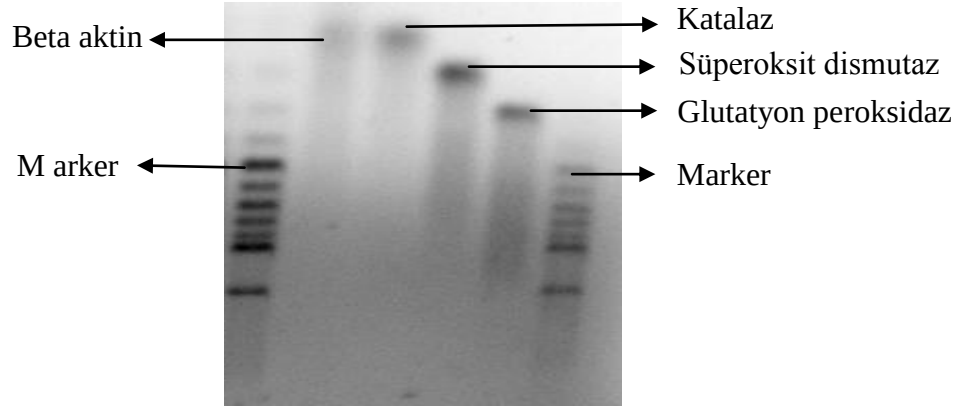
Elde ettiğimiz tüm ürünler % 2'lik agaroZ jelde yürütüldü ve elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına atıldı ve görüntü kaydedildi. Jel görüntüleri incelendiğinde RNA izolasyonunu gerçekleştirdiği gözlemlendi (Şekil 10). Reverse Transcription işlemi sonu cDNA' ların elde edildiği gözlemlendi (Şekil 11). qPCR ürünleri agaroZ jel elektroforezde yürütüldü ve ürünler Şekil 12'de gösterildiği gibi ayrıldı.



Şekil 10. RNA izolasyon sonuçlarının jel elektroforez görüntüsü



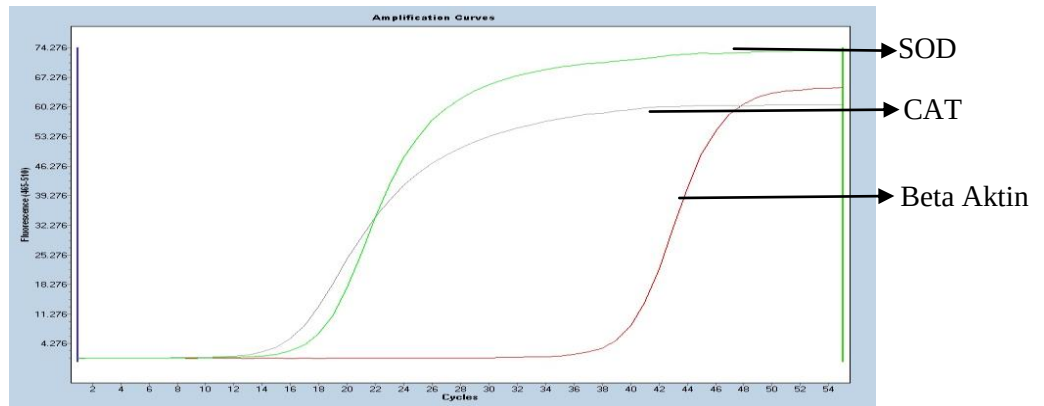
Şekil 11. cDNA örneklerinin jel elektroforez görüntüsü



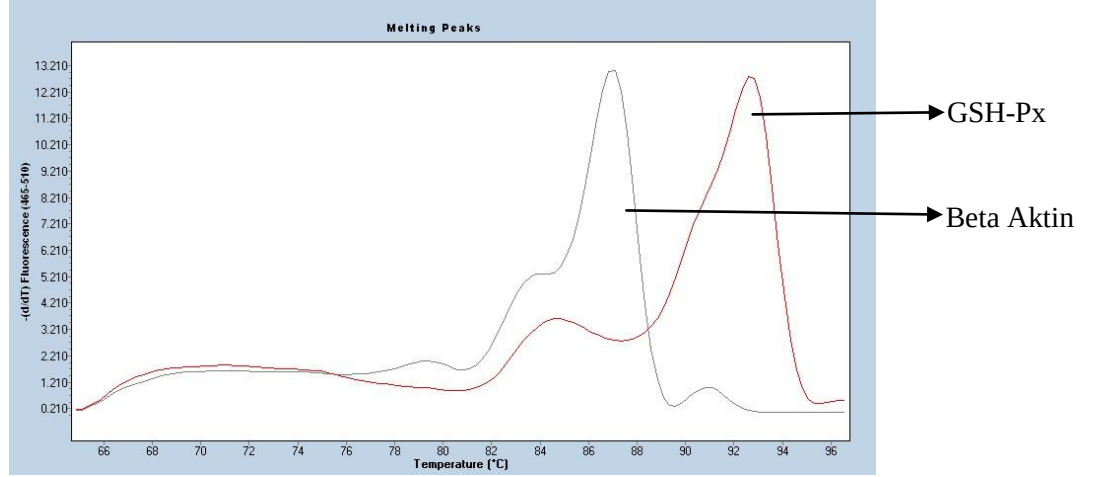
Şekil 12. qPCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü

6.2. Real Time PCR Sonuçları

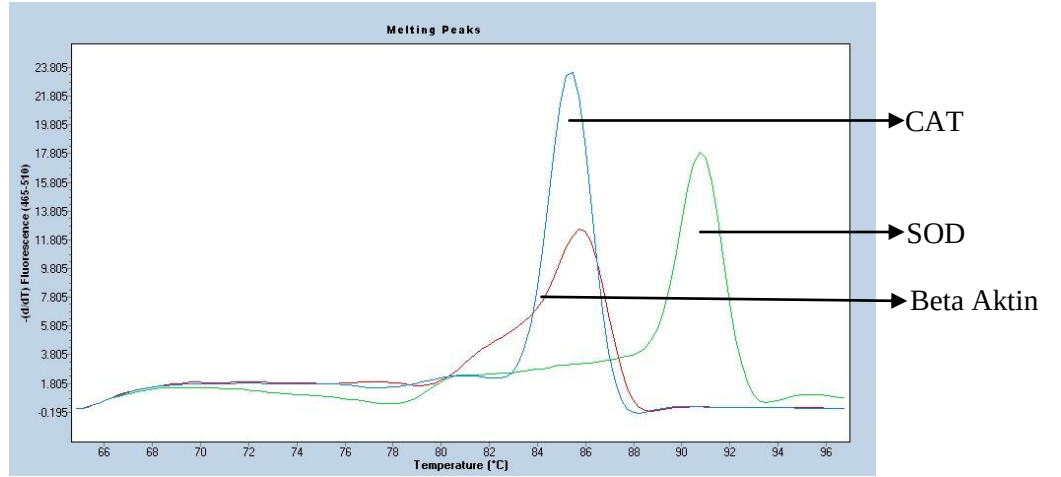
Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz qPCR sonuçlarına göre kullanıldığımız primerlerin çalışmamıza uygun olduğu ve yan ürün oluşmadığı gözlemlendi (Şekil 13, 14, 15).



Şekil 13. Amplifikasyon eğrileri



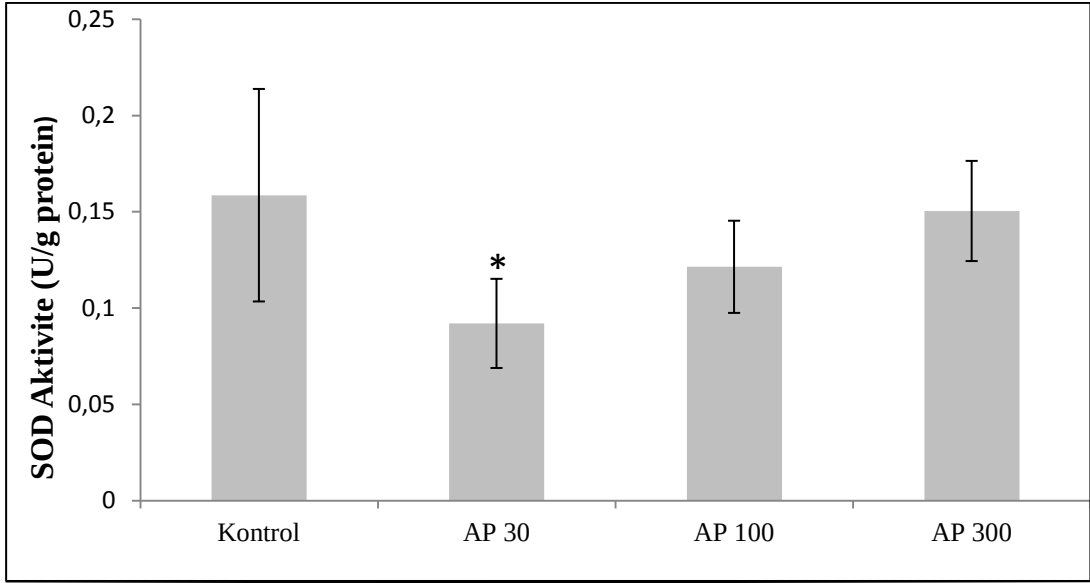
Şekil 14. Glutatyon peroksidaz ve beta aktin erime eğrisi



Şekil 15. Katalaz, süperoksit dismutaz, beta aktin erime eğrileri

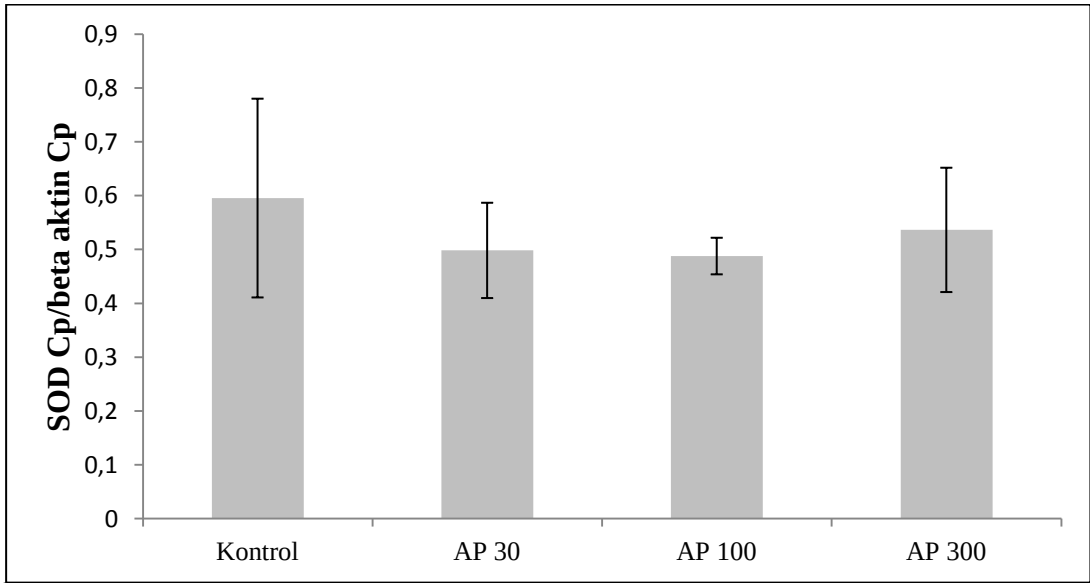
6.3. SOD Aktivite ve Gen Ekspresyonu Ölçüm Sonuçları

Karaciğer dokularında yapılan SOD aktivitesi ölçümleri sonucunda kontrol grubunda ortalama SOD aktivitesi 0.158 ± 0.055 U/g protein olarak bulundu. AP 30 grubunda ortalama SOD aktivitesi ise, 0.092 ± 0.023 U/g protein olarak gözlemlendi. Bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.004$). AP 100 grubunda ortalama SOD aktivitesi 0.121 ± 0.023 U/g protein, AP 300 grubunda ise 0.150 ± 0.026 U/g protein olarak bulundu. Her iki gruptaki ortalamaların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel bir fark bulunamadı. Grupların SOD aktivitesi ölçümlerinin ortalama değerleri ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16. Çalışma gruplarında SOD aktivitesi. *AP 30 grubu kontrol grubundan $p < 0.05$ düzeyinde farklıdır.

Grupların SOD gen ekspresyonu ölçümlerinin ortalama değerleri ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri Şekil 17’de gösterilmiştir. Süperoksit dismutaz gen ekspresyon sonuçlarında gruplar arasında bir fark gözlenmedi.

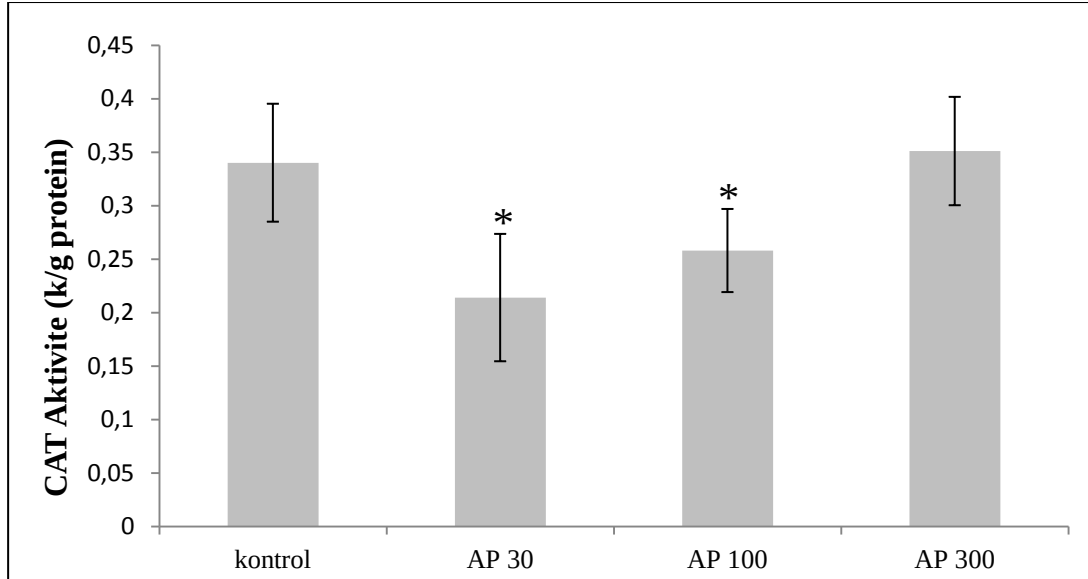


Şekil 17. SOD gen ekspresyonu

6.4. Katalaz Aktivite ve Gen Ekspresyonu Ölçüm Sonuçları

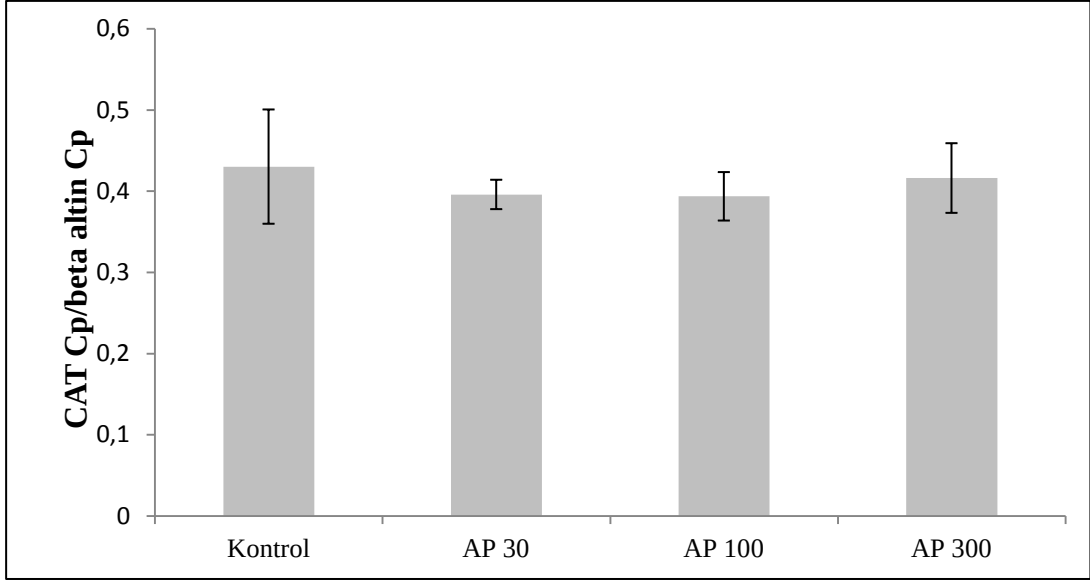
Karaciğer dokularında yapılan katalaz aktivitesi ölçümleri sonucunda günde 1 mL/kg serum fizyolojik enjekte edilen kontrol grubunda ortalama katalaz aktivitesi 0.340

± 0.055 k/g protein, AP 30 grubunda ortalama CAT aktivitesi 0.214 ± 0.059 k/g protein olarak bulundu. Bu düşüş kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.0001$). AP 100 grubunda ortalama katalaz aktivitesi, 0.258 ± 0.038 k/g protein olarak gözlemlendi. Kontrol grubuna göre düşüş, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.02$). AP 300 grubunda katalaz aktivitesi 0.351 ± 0.050 k/g protein olarak bulundu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel bir fark bulunamadı. Karaciğer dokusunda yapılan katalaz aktivitesi ölçümlerinin ortalama değerlerinin ve istatistiksel olarak anlamlılık derecelerinin gruplar arası dağılımı grafiksel olarak Şekil 18’de gösterilmiştir.



Şekil 18. Çalışma gruplarında CAT aktivitesi. *AP 30 ve AP 100 kontrol grubuna göre $p<0.05$ düzeyinde farklıdır.

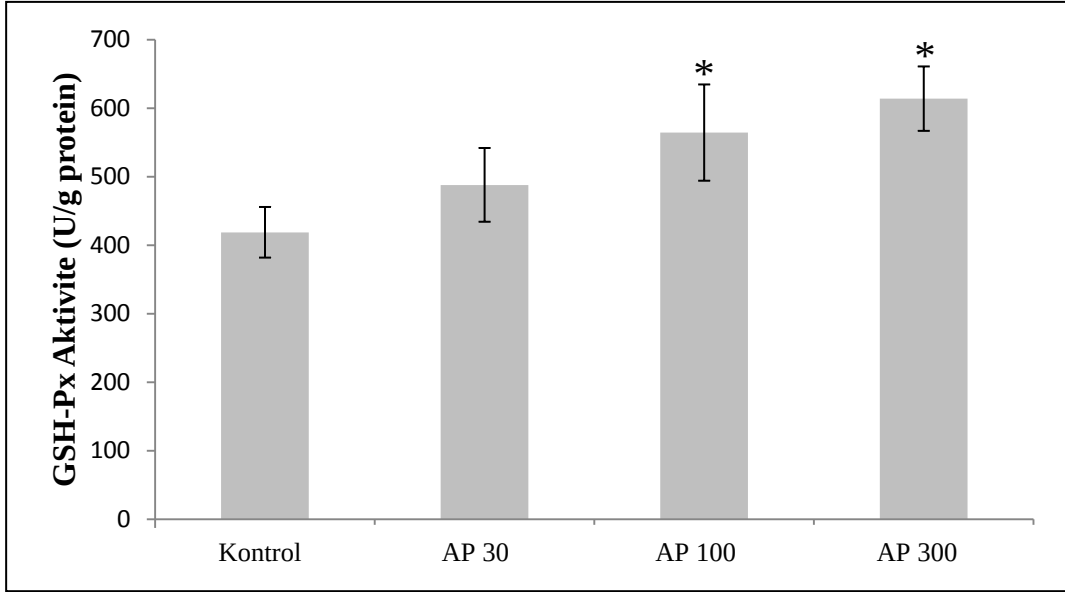
Grupların katalaz gen ekspresyonu ölçümlerinin ortalama değerleri ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri şekil 19’da gösterilmiştir. Süperoksit dismutaz gen ekspresyon sonuçlarında gruplar arasında bir fark gözlenmedi.



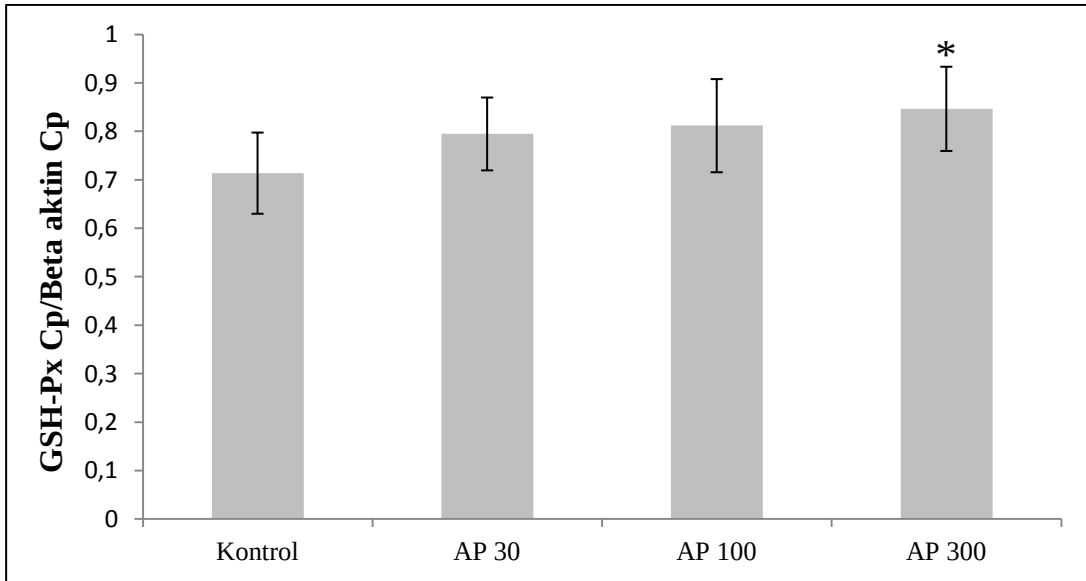
Şekil 19. CAT gen ekspresyonu

6.5. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Gen Ekspresyonu Ölçüm Sonuçları

Karaciğer dokularında yapılan glutasyon peroksidaz aktivitesi ölçümleri sonucunda kontrol grubunda ortalama glutasyon peroksidaz aktivitesi 418.71 ± 36.91 U/g protein, AP 30 grubunda ortalama GSH-Px aktivitesi 487.90 ± 53.80 U/g protein, AP 100 grubunda ortalama GSH-Px aktivitesi, 564.18 ± 70.22 U/g protein olarak bulundu. Bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.0001$). AP 300 grubunda ise 613.70 ± 47 U/g protein olarak bulundu. Bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.0001$). Karaciğer dokusunda yapılan GSH-Px aktivite ölçümlerinin ortalama değerlerinin ve istatistiksel olarak anlamlılık derecelerinin gruplar arası dağılımı grafiksel olarak Şekil 20’da gösterilmiştir.



Şekil 20. Çalışma gruplarında GSH-Px aktivitesi. * AP 100 ve AP 30. kontrol grubuna göre $p < 0.05$ düzeyinde farklıdır.

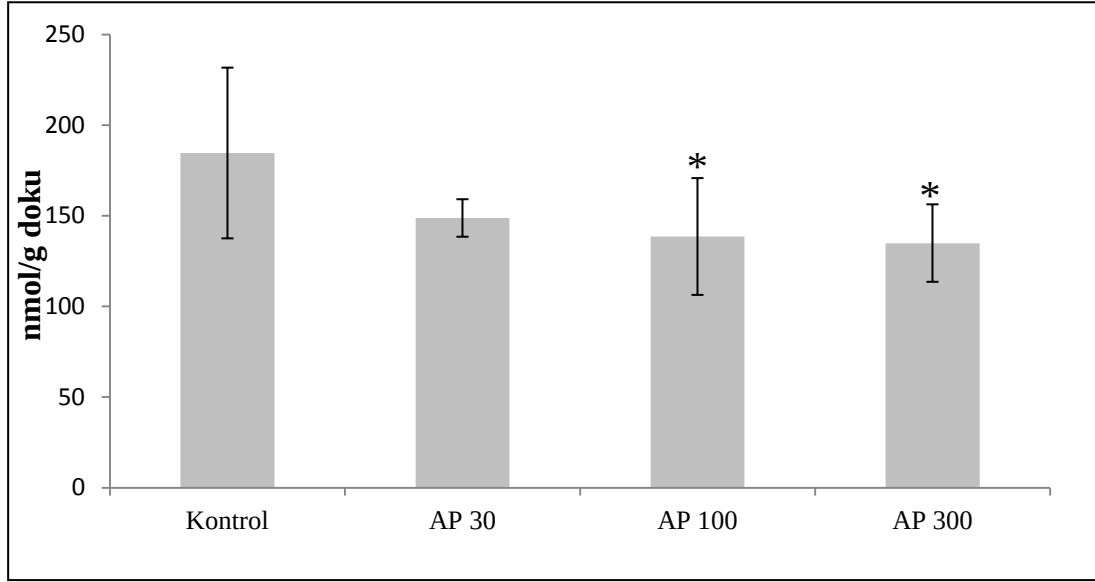


Şekil 21. GSH-Px gen ekspresyonu. *AP 300 grubunda kontrole göre bir artış gözlemlendi ($p < 0.05$).

6.6. MDA Seviyesi Ölçüm Sonuçları

Karaciğer dokularında yapılan malondialdehit ölçüm sonucunda kontrol grubunda ortalama MDA aktivitesi 184.518 ± 47.08 nmol/g doku, AP 30 grubunda ortalama MDA aktivitesi 148.683 ± 10.344 nmol/g doku, AP 100 grubunda ortalama MDA aktivitesi, 138.474 ± 32.203 nmol/g doku olarak bulundu. Kontrol grubuna göre bu düşüş

istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.035$). AP 300 grubunda ise 134.843 ± 21.37 nmol/g doku olarak bulundu. Bu düşüş kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.02$). Karaciğer dokusunda yapılan MDA ölçümlerinin ortalama değerlerinin ve istatistiksel olarak anlamlılık derecelerinin gruplara dağılımı grafiksel olarak Şekil 22’ de gösterilmiştir.



Şekil 22. Çalışma gruplarında MDA düzeyi ölçümü. *AP 100 ve AP 300 grupları kontrol gruplarına göre düşük bulundu ($p<0.05$).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Apelin kalp kasının kasılmasını ve kan basıncını azalttığı için kardiyovasküler fonksiyon ve sıvı alımının düzenlenmesinde rol alan bir adipokindir. 77 amino asitten oluşan preproapelin olarak sentezlenen apelin, daha sonra 55 amino asitlik proapeline yıkılır ve ileri bir yıkımlama ile dolaşımda en bol bulunan 36 amino asitlik peptit oluşur. Dolaşımda yine aktif olan apelin 12, 13 ve 17 formlarında da bulunur. Bu formların hepsi aktiftir. Apelin ratlarda merkezi sinir sisteminde, akciğerde, yağ dokusunda, meme bezinde ve kalpte sentezlenir. Apelin çeşitli dokularda bulunan ve G_i proteini ile eşleşmiş anjiotensin-like reseptör 1 (APJ) ile etkisini gösterir. Bu reseptör ratlarda başta beyin olmak üzere akciğer, kalpte bol olarak sentezlenirken böbrek korteksinde en düşük seviyede bulunur. İnsanda ise, ratlarda olduğu gibi merkezi sinir sisteminde sentezlenir. Ancak ratlardan farklı olarak, periferel dokular içerisinde dalak ve plasentada bol olarak sentezlenir (17, 22, 23).

Apelin ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu peptidin kardiyomiyositlerde serotonin ile uyarılan oksidatif strese karşı hücreyi koruduğu ve bunu CAT aktivitesini ve gen ekspresyonunu artırarak yaptığı ortaya konmuştur. Yine farelere 0.1 $\mu\text{mol/kg/gün}$ dozda, dört hafta boyunca apelin uygulamasının plazma MDA seviyelerini azaltırken CAT aktivitesini miyokartta arttırdığı gözlenmiştir (5).

Karaciğer enerji metabolizmasının merkezinde yer alan bir organdır. Birçok biyomolekülün katabolizması ve anabolizması detoksifikasyon reaksiyonları bu organda yapılır. Karaciğer; gerek yüksek oksidatif kapasitesiden dolayı mitokondriyal, gerekse de ilaç ve ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu kökenli oksidan bileşiklere yoğun olarak maruz kalan bir organdır. Yine amino asit oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, nitrik oksit sentaz, sülfidril oksidaz, NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz gibi enzimler sürekli olarak ROS'ları üretmektedir. Oluşan bu oksidan etkili bileşiklere karşı başta enzimatik olmak üzere (SOD, CAT, GSH-Px, peroksiredoksinler, glutaredoksin, tiyoredoksin, sülfiredoksin gibi) enzimatik olmayan antioksidanlarlada (Vit A, C, E, GSH, urat, bilirubin gibi) hücreler, savunma sistemlerini oluştururlar. Reaktif oksijen türleri; hepatit, karaciğer yetmezliği, alkolle indüklenmiş karaciğer harabiyeti ve karaciğer naklinde karşılaşılan iskemi-reperfüzyon hasarı gibi karaciğer hastalıklarında patolojisinde önemli rol oynarlar (61).

Yaptığımız çalışmada, Sprague Dawley ırkı erkek sıçanlara 15 gün süreyle üç farklı dozda intraperitoneal apelin uygulaması yapılmış ve karaciğer dokusunda SOD, CAT, GSH-Px enzimlerinin aktivitesi ve gen ekspresyonları ölçülerek kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda karaciğerde oksidatif hasarı uyaracak herhangi bir işlem yapılmamış, kronik apelin uygulamasının hasar görmemiş sağlıklı karaciğerdeki belirtilen enzimlere etkisi incelenmiştir.

Apelin enjekte edilen çalışma gruplarında, 30 µg/kg/gün uygulanan grupta SOD aktivitesi kontrol grubuna göre düşük bulundu. ($p=0.004$). Doz artışına bağlı olarak SOD aktivitesinin arttığı ve tekrar kontrol seviyelerine döndüğü gözlemlendi. (Bkz. Şekil 16). SOD gen ekspresyonu değerlendirildiğinde AP 30 grubunda kontrole göre bir düşüklük gözlemlense de bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Bkz. Şekil 17). Her iki sonuçta birlikte değerlendirildiğinde SOD aktivitesindeki azalışın enzimin sentezinden daha çok aktivitesini etkileyen faktör ya da faktörlerce düşürüldüğü düşünülebilir. Karaciğerde birçok enzimatik reaksiyonla ve mitokondriler aracılığıyla süperoksit anyonu üretilmektedir (61). Apelinin düz kas hücrelerinde ve nöronlarda NADPH oksidaz enziminin ekspresyonu artırdığı gösterilmiştir (62, 63). Bu enzim bir başka süperoksit kaynağıdır ve karaciğerde de sentezlenmektedir. (61). Oluşan bu anyon SOD tarafından hızlı bir şekilde H_2O_2 'ye dönüştürülmektedir. CAT ve GSH-Px H_2O_2 'yi H_2O 'ya ve O_2 'ye dönüştürerek hücrede birikimini engeller (62). Eğer bu yol inhibe edilirse, biriken H_2O_2 SOD aktivitesini inhibe eder (64). Yaptığımız çalışmada, AP 30 grubunda H_2O_2 'yi kullanan bir enzim olan CAT aktivitesinde bu inhibisyonla uyumlu olarak düşük bulunmuştur. Apelinin artan dozlarının karaciğerde H_2O_2 'yi substrat olarak kullanan peroksiredoksin ve tiyoredoksin gibi çalışmamızda ölçülmeyen enzimlerin ekspresyonlarını daha yüksek dozlarda artırarak SOD üzerindeki bu inhibisyonu ortadan kaldırmış olabilir. Karaciğer dokusunda yapılan MDA ölçümlerinde artan apelin dozlarında dokuda oksidatif sürecin baskılandığı yönündedir (Bkz. Şekil 22). Apelin uygulamasının insülin duyarlılığını, kas dokusunda glukoz kullanımını ve lipid oksidasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (30). Her ne kadar kullanılan ratlarda insülin direnci ile ilgili bir problem bulunmasa da, bu süreç karaciğer dokusunun oksidatif kapasitesinin azalmasına ve daha az mitokondri kaynaklı süperoksit oluşumuna sebep olabilir. Ancak bu sürecin daha iyi değerlendirilmesi için karaciğerde süperoksit

oluşturan ve bunu uzaklaştıran enzimlerin daha detaylı bir araştırma ile incelenmesi gerekmektedir.

CAT tüm biyolojik sistemlerde geniş bir doku dağılımı gösteren Hem grubu içeren bir enzimdir. Memelilerde en bol karaciğer ve böbrekte bulunurken en düşük düzeyde bağ dokusunda bulunur (56). Çalışmamızda, SOD aktivitelerinde benzer şekilde AP 30 grubunda CAT aktivitesi düşüktü ($p=0.0001$). Ayrıca, AP 100 grubunda da CAT aktivitesi kontrol grubuna göre daha düşük gözlemlendi ($p=0.0001$) (Bkz. Şekil 18). Çalışma gruplarında karaciğerde CAT ekspresyonları incelendiğinde hem AP 30 hem de AP 100 grubunda azalışlar gözlemlense de, CAT aktivitesindeki düşüşü açıklayabilecek düzeyde değildi (Bkz. Şekil 19). Kalp kasında yapılan çalışmaların aksine (5), apelin karaciğer dokusunda CAT ekspresyonu üzerine bir etkiye sahip değildi. CAT karaciğerde bulunan veya metabolize edilen askorbik asit, metanol, etanol ve asetat gibi bileşiklerle inhibe edilebilir (56). Ayrıca, CAT süperoksit anyonunca da inhibe edilir (65). Yukarıda da bahsedildiği gibi apelinin karaciğer hücresinde de önemli bir süperoksit üreticisi olan NADPH oksidaz enzimi üzerine çeşitli dokularda indükleyici özelliği gösterilmiştir (62, 63). Yine AP 30 ve AP 100 gruplarında SOD inhibisyonunda hücrede süperoksit artışına ve bu da CAT inhibisyonuna neden olabilir. AP 300 grubunda CAT aktivitesinin kontrol grubu değerlerine ulaşmasında H_2O_2 'yi kullanan diğer enzimlerin aktivitesindeki artışa bağlı azalan süperoksit miktarı etkili olabilir.

GSH-Px dört alt gruptan oluşan ve her bir alt grupta bir adet Se atomu içeren önemli bir antioksidan enzimdir (51). Hücre içinde farklı yerleşim gösteren izoformları vardır. Aktivitesinin yaklaşık % 70'i sitozolik fraksiyonda bulunur. En yüksek GSH-Px aktivitesi karaciğerde gözlenirken, en düşük aktivite beyin ve lenste gözlenir (64). Karaciğerde GSH-Px enziminin farklı genlerce eksprese edilen izoenzimleri bulunmaktadır. Çalışmamızda, tüm hücrelerde sentezlenen ve H_2O_2 'ye ilgisi en fazla olan GSH-Px-1 primerleri kullanılmıştır. GSH-Px, H_2O_2 'yi glutatyon kullanarak H_2O ve moleküler oksijene dönüştürürken glutatyonu indirgeyen bir enzimdir. Glutatyonunda en bol bulunduğu organ karaciğerdir. Karaciğerde gerçekleşen detoksifikasyon olaylarında GSH kullanılır. Ayrıca, normal metabolizma sonucu oluşan hidroperoksitlerin hücre bileşenlerine zarar vermesinin engellenmesinde de GSH-Px'in bir substratı olarak glutatyon önemlidir (66). Çalışma gruplarımızda, GSH-Px aktivitesi AP 100 ve AP 300

grubunda kontrole göre daha yüksek bulundu ($p=0.0001$) (Bkz. Şekil 20). AP 30 grubunda da bir artış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Gen ekspresyonları incelendiğinde (Bkz. Şekil 21) aktivite ile uyumlu olarak apelin uygulanan bütün gruplarda artış gözlenmesine rağmen sadece AP 300 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik gözlemlendi ($p=0.027$). Bu sonuçlar doğrultusunda, çalışmamızda gözlenen GSH-Px aktivitesi artışları bu enzimin artan ekspresyonlarının sonucudur. Kalp kasında apelinin hem GSH-Px aktivitesi hem de gen ekspresyonları üzerine herhangi bir etkisi bulunmamış (5) olmasına rağmen bizim çalışmamızda, aktivite ve protein miktarında artış gözlenmiştir. Bu farklılık, enziminin her iki doku içinde farklı düzenlenme mekanizmalarını kullanmasının bir sonucu olabileceği gibi, kalp kasındaki çalışma oksidatif bir atağın varlığında yapılmışken, bizim çalışmamızda bazal bir durum varlığıyla ilgili olabilir. Önemli bir antioksidan enzim olan GSH-Px'in H_2O_2 'ye olan ilgisi CAT'dan daha fazladır (64). Hidrojen peroksit kaynaklı doku hasarının önlenmesinde önemli olduğu gibi bazal seviyede de artan miktarı H_2O_2 miktarını azaltabilir. Bu sonuçla uyumlu olarak, doku MDA seviyelerinde anlamlı azalışlar gözlenmiştir (Bkz. Şekil 22).

Apelin ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu peptidin damar gevşetici ve pozitif inotropik etkileri sayesinde hipertansiyon ve kalp yetmezliği olan hastalarda ilaç olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu bildirilmiştir (17). Ayrıca, apelinin sirozda karaciğerdeki fibrogen ve anjiogenezde etkili olduğu ve apelin sistemi üzerinden etki gösteren bileşiklerin tedavide kullanılabileceği belirtilmiştir (67). Yaptığımız çalışmada, karaciğer dokusundaki oksidatif stresi yansıtabilecek sınırlı sayıda belirteç ölçülüp değerlendirilmiş olmakla beraber, elde edilen sonuçlar doğrultusunda apelinin karaciğerde oksidatif süreci baskıladığı gözlenmiştir. Hepatit, karaciğer yetmezliği, kronik alkol kullanımı ve karaciğer nakillerinde görülen karaciğerdeki iskemi reperfüzyon hasarının patolojilerinde oksidatif stresin katkısı vardır (61). Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, apelinin bu hastalıkları tedavisinde kullanılma potansiyeli olan bir bileşik olduğunu gözlemledik. Daha geniş oksidan ve antioksidan belirteçler ve farklı deney protokolleri ile bu potansiyel araştırılabilir.

Sonuç olarak, ratlara farklı dozlarda apelin uygulamasının karaciğerde GSH-Px aktivite ve gen ekspresyonunu arttırarak oksidatif süreci baskıladığı ve bu etkisi ile

karaciğerin oksidatif hasarla ilgili hastalıklarında kullanılabilme potansiyeli olduğu kanaatine varıldı.

8. KAYNAKLAR

1. Vazquez-Vela M, Torres N, Tovar A (2008). White adipose tissue as an endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* 39: 715-728.
2. Susan E, Eldo E, Frezza D (2008). Adipose tissue: a new endocrine organ? A review article. *Digestive Diseases and Sciences* 12: 287-295.
3. Dündar Y, Aslan R (1999). Oksidan Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi* 9: 32-39.
4. Akkuş İ (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Birinci baskı. Mimoza Yayınları; 17.
5. Foussal C, Lairez O, Calise D, Pathak A, Guilbeau-Frugier C, Valet P, Parini A, Kunduzova O (2010). Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett* 584: 2363-2370.
6. Görar S, Çulha C, Demir YD, Serter R, Aral Y (2010). Visfatin: Obezite ve Metabolik Sendrom ile ilişkisi. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism* 14: 35-38.
7. Ergün A (1999). Leptin (ob Protein). *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri* 19: 130-136.
8. Stepan CM, Lazar MA (2002). Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Tren Endoc & Metab* 13: 18-23.
9. Fernández-López JA, Remesar X, Foz M, Alemany M (2002) Pharmacological approaches for the treatment of obesity. *Drugs* 62: 915-944.
10. Schling P, Löffler G (2002). Cross talk between adipose tissue cell, impact on pathophysiology. *News in physiological sciences* 17: 99-104.
11. Ergün A (2005). Adipose Tissue and The Adipocyte: Review. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 25: 412-420.
12. Akay T (2006). Genel Histoloji. 6. Baskı. Palme Yayıncılık, Ankara; 81-87.
13. Nelson DV, Cox MM (2005). Principles of biochemistry. *Biyokimyanın ilkeleri*. 3 th ed. Çeviren: Nedret KILIÇ. Palme yayıncılık, Ankara; 873-875.
14. Ahima RS, Flier JS (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11: 327-332.
15. Gimble JM (2003). Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy* 3: 705-713.

16. Kim C, Newton KM, Knopp RH (2002). Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 25: 1862-1868.
17. Kleinz MJ, Davenport AP (2005). Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacology & Therapeutics* 107: 198-211.
18. Berköz M, Yalın S. (2008). Yağ dokusunun immünolojik ve inflamatuvar fonksiyonları. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilim Dergisi* 1: 1-9.
19. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW (2003). Obesity is associated with macro-phage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808
20. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Tartaglia LA, Chen H (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821-1830.
21. Trujillo ME, Scherer PE (2006). Adipose tissue derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 27: 762-78.
22. Ercan E (2009). Polikistik over sendromlu olgularda kan apelin düzeyi ve insülin direnci ile inflamasyon göstergeleri arasındaki ilişki. Uzmanlık Tezi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi'nin iç Hastalıkları Bilim Dalı, Ankara
23. Gedik A (2009). Akromegalik kardiyomiyopati ve apelin ilişkisi. Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara
24. Kunduzova O, Alet N, Delesque-Touchard N, Millet L, Castan-Laurell I, Muller C, Dray C, Schaeffer P, Herault JP, Savi P, Bono F, Valet P (2008). Apelin/APJ signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes. *The FASEB Journal* 22: 4146-4153.
25. Tatemoto K, Fujii R, Fujino M (1998). Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251: 471-6.
26. Tatemoto K, Kumaki I, Kumano K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Fujimiya M (2001). The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 99: 87-92.
27. Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T (2005). Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 146:231-236.

28. Ercan Z (2011). Apelinin sıçanlarda in vitro uterus kasılmaları üzerindeki etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı, Elazığ.
29. O'Dowd BF, Chan A, George SR, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, Nguyen T (1993). A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 136: 355–60.
30. Pitkin SL, Maguire JJ, Bonner TI, Davenport AP (2010). International union of basic and clinical pharmacology. LXXIV. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function. *Pharmacol Rev* 62: 331-42.
31. Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, Davis RP, Ellis C, Winborn KY, Lawrie KW, Hervieu G, Riley G, Bolaky JE, Herrity NC, Murdock P, Darker JG (2003). Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem* 84: 1162–1172.
32. Leprêtre N, Mironneau J (1994). Alpha 2-adrenoceptors activate dihydropyridine-sensitive calcium channels via Gi-proteins and protein kinase C in rat portal vein myocytes. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 429: 253–61.
33. Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH, George SR, O'Dowd BF (2000). Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* 74: 34-41.
34. Heinonen MV, Purhonen AK, Miettinen P, Paakkonen M, Prineas E, Alhava E, Akerman K, Herzog KH (2005). Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. *Regul Pept* 130: 7-13.
35. Földes G, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Mäyränpää M, Sárman B, Seres L, Skoumal R, Lakó-Futó Z, Dechâtel R, Ruskoaho H, Tóth M (2003). Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 480-485.
36. Çılgin H (2010). Histopatolojik olarak endometriozis tanısı konulan olgularda tenascin ve apelin'in serum ve doku düzeylerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Elazığ.
37. Zhou N, Zhang X, Fan X, Argyris E, Fang J, Acheampong E, DuBois GC, Pomerantz RJ (2003). The N-terminal domain of APJ, a CNS-based coreceptor for HIV-1, is essential for its receptor function and coreceptor activity. *Virology* 317: 84-94.

38. Sies H (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Wien Klin Wochenschr* 69: 965-968.
39. Berköz M, Yalın S (2009). Normal ve preeklampatik gebelerde lipid peroksidasyonu ve antioksidan aktivite. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 10: 52-58.
40. Hevesi BT, Houghton PJ, Habtemariam S, Kery A (2009). Antioxidant and Antiinflammatory Effect of *Epilobium parviflorum* Schreb. *Phytotherapy Research* 23: 719-724.
41. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross EC (1992). Free radical, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119: 598-620.
42. Eu JP, Liu L, Zeng M, Stamler JS (2000). An apoptotic model for nitrosative stres. *Biochemistry* 39: 1040-1047.
43. Harris ED 1992. Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB Journal* 6: 2675-2683.
44. Fridovich I (1983). Superoxide radical: An endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 23: 239-257.
45. Helle RA, Jesper BN, Fleming N (1997). Antioxidative enzyme activities in human erithrocytes. *Clinical Chemistry* 43: 562-68.
46. Kurt N (2008). Yaşa bağlı olarak antioksidan enzimlerinin süperoksit dismutaz (sod), katalaz (cat) aktivitelerinin ve malondialdehit (mda) seviyesinin incelenmesi. Yüksek Lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Adana.
47. Jenkins RR, Tengı J (1981). Catalase Activity in Skeletal Muscle of Varying Fiber Types. *Experimentia* 37: 67-68.
48. Arosio B, Gagliano N, Fusaro LMP, Parmeggiani L, Galetti P, De Castri D, Moscheni C, Annoni G (2000). Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. *Pharmacology & Toxicology* 87: 229-233.
49. Karagül H, Fidancı UR, Altıntaş A, Sel T (2000). Klinik biyokimya. Birinci Baskı, Meteksan, Ankara; 430.
50. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, Cu-Zn superoxide dismutase for cell survival against oxidative stres. *Free Radical Biology & Medicine* 17: 235-248.

51. Yıldız O (2011). Bir gıda maddesi olarak kestane polenin kimyasal bileşimi, biyoaktif özellikleri ve karaciğer hasarını önlemedeki rolü. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
52. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA (2008). Physiology. Fizyoloji. 5th ed. Çeviren: Türk fizyoloji bilimleri derneği, Güneş Kitapevi, Ankara 190.
53. Ganong's Review of Medical Physiology. Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi. Yirmi üçüncü baskı. Çeviren: Gökbel H, Nobel tıp Kitabevi, İstanbul 479-487.
54. Niki E (1987). Antioxidant in relation to lipid peroxidation. Chem Phys Lipids 44: 227-253.
55. Sun Y, Oberlay LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxidedismutase. Clin Chem 34: 487-500.
56. Aebi HE (1987). Catalase. In Bergmeyer, Methods of Enzymatics Analysis, 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie 3: 273-285.
57. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal biochem 72: 248-254.
58. Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem 86: 271.
59. Çolak M (2009). Arı poleni ve propolisinin metastatik insan prostatkanser hücre serilerinde voltaj kapılı sodyum kanalları ekspresyonu üzerine etkisi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
60. Cederberg J, Galli J, Luthman H, Eriksson UJ. Increased mRNA levels of mn-sod and catalase in embryos of diabetic rats from a malformation-resistant strain. Diabetes 49: 101-107.
61. Mari M, Colell A, Morales A, Montfort C, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC (2010). Redox control of liver function in Health and Disease. Antioxid Redox Signal 12: 1295-1331.
62. Hashimoto T, Kihara M, Imai N, Yoshida S, Shimoyamada H, Yasuzaki H, Ishida J, Toya Y, Kiuchi Y, Hirawa N, Tamura K, Yazawa T, Kitamura H, Fukamizu A, Umemura S (2007). Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stres-linked atherosclerosis. Am J Pathol 171: 1705-12.

63. Yao F, Modgil A, Zhang Q, Pingili A, Singh N, O'Rourke ST, Sun C (2011). Pressor effect of apelin-13 in the rostral ventrolateral medulla: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide. *J Pharmacol Exp Ther* 366: 372-380.
64. Kulikowska-Karpinska E, Moniuszko-Jakoniuk J (2004). The Antioxidative barrier in the organism. *Polish Journal of Environmental Studies* 13: 5-13.
65. Kono Y, Fridovic I (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257: 5751-5754.
66. Perricone C, Carolis C, Perricone R (2009). Glutathione: A key player in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 8: 697-701.
67. Principe A, Melgar-Lesmes P, Fernández-Varo G, del Arbol LR, Ros J, Morales-Ruiz M, Bernardi M, Arroyo V, Jiménez W (2008). The hepatic apelin system: A new therapeutic target for liver disease. *Hepatology* 48: 1193-1201.

9. ETİK KURUL ONAYI

**T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI**



**KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ**

Çalışmasının Adı : "Kronik Apelin Uygulamasının Karaciğer Antioksidan Enzimleri (CAT, SOD, GSH-Px) Üzerine Etkisinin İncelenmesi"
Çalışmacılar : Doç.Dr.Ahmet ALVER, Yük.Lis.Öğr.İmran İNCE, Doç.Dr.Sinan CANPOLAT, Dok.Öğr.Sinan SARAL
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya ABD.

Etik Kurul Dosya No 2012/5	Etik Kurul Toplantı Tarihi 20.03.2012	Etik Kurul Toplantı No 2012/10	Etik Kurul Karar No 1
---	--	---	--------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN'ın başkanlığında "Kronik Apelin Uygulamasının Karaciğer Antioksidan Enzimleri (CAT, SOD, GSH-Px) Üzerine Etkisinin İncelenmesi" başlığını taşıyan tez çalışmasının, Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (20.03.2012)

Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport No :38495120484
Soyadı, Adı :İNCE, İmran
Uyruğu :T.C.
Doğum tarihi ve yeri :11.03.1988
Medeni hali : Bekar
Telefon :0539 501 00 92
E-Posta :narmince@hotmail.com
Yazışma adresi :Esiroğlu orman işletme şef. loj.
Maçka/TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	-
Lisans	Atatürk Üniversitesi	2009
Lise	Trabzon Lisesi	2005

YABANCI DİL :İngilizce

HOBİLER :Kitap okumak, satranç oynamak, resim ,
yapmak, fotoğraf çekmek