



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**WİSTAR ALBİNO TİP RAT KARACİĞERİNDE SİSPLATİN VE cAMP'NİN
TOKSİK VE ANTİTOKSİK ETKİLERİN GEN İFADESİ DÜZEYİNDE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Kumbirai Deon MANDEBERE

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER
ADLİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof Dr. E. Sümer ARAS**

**ANKARA
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**WİSTAR ALBİNO TİP RAT KARACİĞERİNDE SİSPLATİN VE cAMP'NİN
TOKSİK VE ANTİTOKSİK ETKİLERİN GEN İFADESİ DÜZEYİNDE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Kumbirai Deon MANDEBERE

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER
ADLİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. E. Sümer ARAS**

**ANKARA
2019**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "WİSTAR ALBİNO TİP RAT KARACİĞERİNDE SİSPLATİN VE cAMP'NİN TOKSİK VE ANTİTOKSİK ETKİLERİN GEN İFADESİ DÜZEYİNDE KARŞILAŞTIRILMASI" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafından yazılmıştır. Tezimin fikri tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışmalar ve araştırmalar tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yükarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Kumbirai Deon MANDEBERE

Tarih: 21/06/2019

İmza:



Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında

Kumbirai Deon MANDEBERE tarafından hazırlanan

*“Wistar Albino Tipi rat Karaciğerinde Sisplatin ve cAMP'nin Toksik ve Antitoksik Etkilerinin
Gen İfadesi Düzeyinde Karşılaştırılması .”* adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

21.06.2019



Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN
Ankara Ü. Fen Fakültesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Emine Sümer ARAS
Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Kürşat DERİCİ
Kırıkkale Ü. Tıp Fakültesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
KABUL VE ONAY	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖNSÖZ	vi
SIMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	viii
ÇİZELGELER	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Model Organizma	3
1.2. Adli Toksioloji	4
1.3. Sisplatin	5
1.3.1. Sisplatinin hücreye alınımı ve hücredeki hedefleri	7
1.4. Siklik Adenozin Mono Fosfat (cAMP)	7
1.4.1. cAMP'nin temel özellikleri	9
1.5. Gen İfadesi	10
1.6. Gerçek Zamanlı (RT-PCR) PCR	12
1.6.1. TBP geni	13
1.6.2. Sitokrom P450 genleri ve <i>CYP1A1</i> geni	14
2. GEREÇ VE YÖNTEM	17
2.1. Model Organizmaların Temin Edilmesi	17
2.2. Karaciğer Homojenizasyonu ve Çalışma Gruplarının Belirlenmesi	18
2.3. Çalışılacak Genlerin Belirlenmesi	18
2.4. Total RNA İzolasyonu	19
2.5. cDNA Sentezi	20
2.6. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Çalışmaları	21
2.7. Normalizasyon	21
3. BULGULAR	22

4. TARTIŞMA	27
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	29
ÖZET	30
SUMMARY	31
KAYNAKLAR	32
EKLER	37
EK-1 Etik Kurul Onayı	38
EK-2 Bilimsel Çalışma İzni	39
ÖZGEÇMİŞ	40



ÖNSÖZ

Bu araştırmada, Wistar tip rat karaciğerinde sisplatin ve cAMP'nın toksik ve antitoksik etkilerinin gen ifadesi düzeyinde karşılaştırılması amaçlanmıştır. Tez çalışmasını gerçekleştirme fırsatı vererek akademik hayata ilk adımımı atmamı, araştırmayı, bilimsel çalışmayı öğrenirken her yönüyle desteğini esirgemeyen yol gösterici, çalışmalarım süresince bilimsel katkıları için, zengin akademik birikimiyle bana destek sağlayan değerli danışmanım sayın Prof. Dr. Sümer Aras'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamın yürütülmesi esnasında gösterdiği ilgi ve çalışmalarımdaki destekleri ile kıymetli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, sayesinde çok şey öğrendiğim ve yüksek lisans hayatım boyunca gösterdiği anlayış ve fedakarlıklardan dolayı değerli arkadaşım ve hocam Dr. F. şeyma GÖKDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Yıllar önce kariyerimi gerçekleştirmek istediğim alan olan Adli Bilimler ile Yüksek Lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren bilgi ve deneyimleriyle bana katkı sağlayan çok değerli Adli Bilimler Enstitüsü öğretim üyelerine, ideallerim doğrultusunda ilerlememde her zaman destek oldukları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak gösterdikleri anlayış ve fedakarlıklardan dolayı, uzakta olsalar da her zaman yanımda hissettiğim, varlıklarıyla güç bulduğum değerli aileme, canım anneme ve sevgilime sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
µl	mikro litre
C	Santigrat
cm	Santimetre
DNA	Deoksiribonükleik asit
ml	Mililitre
ng	nanogram
°	Derece
PMI	Ölüm zamanı (Postmortem interval)
RNA	Ribonükleik asit
cAMP	Siklik adenozin monofosfat

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Sisplatinin yapısı	5
Şekil 1.2. cAMp sentezi ve yıkımı	8
Şekil 1.3. Geni yapısı	10
Şekil 1.4. Gen ifadesi	11
Şekil 1.5. Proteinleri sentezis mekanizması (Translasyonu)	11
Şekil 1.6. SYBR Green tekniği	13
Şekil 1.7. TBP geni lokasyonu	14
Şekil 3.1. Örneklerinden izole edilen DNA'ya ait jel elektroforez görüntüsü	22
Şekil 3.2. TBP genine ait erime sıcaklığı pikleri ve erime eğrisi	25

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Çalışma grupları, saat ve biyolojik tekrar sayıları	18
Çizelge 2.2. Çalışılacak genler ve primer dizileri	19
Çizelge 3.1. Çalışılan örneklerin Ct değerleri, Nanodrop ölçümleri ve RNA'nın saflılığı	23
Çizelge 3.2. RNA'nın Nanodrop ölçümleri $\mu\text{l}/\text{ng}$	24
Çizelge 3.3. Örneklerden Nanodrop ölçümleri A260/A280	24
Çizelge 3.4. Relative normalizasyon değerlerine göre gen ifadesi farklılıkları	25



1. GİRİŞ

DNA'nın keşfi ve nükleik asitlerdeki baz dizilerinin belirlenmesi ve DNA moleküllerinin yapısal bileşiminin ve süreçlerinin anlaşılması, DNA teknolojilerindeki ilerlemelerle elde edilmiştir. DNA'nın keşfedilmesinden bu yana bu teknolojilerin gelişmesi, biyolojik sorulara yaklaşımda devrim yaratmıştır ve bugün bu teknolojilerin kullanımı biyolojik araştırmaların ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir.

1990'ların ortalarına kadar, gen ifadesi çalışmaları bir veya birkaç genin transkripsiyonunun ölçülmesiyle sınırlıydı. Ancak mikro dizin teknolojileri bunu değiştirerek yüzlerce çalışmayı bir seferde binlerce transkripsiyona dönüştürdü. Böylece, bu teknolojik ilerlemeler, biyolojinin birçok alanında, temel araştırmalardan insan hastalıklarının anlaşılmasına ve tedavisine kadar önemli katkılarda bulunmuştur (Schena ve ark., 1995).

Kemoterapi ilaçlarının çoğunluğu kanser tedavilerinde sürekli olarak kullanılmasına rağmen, ilaçların ters doğası önemli bir sağlık problemleri olarak kalmıştır. Sisplatin ile ilgili önceki araştırmalardan elde edilen sonuçlar, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde büyük başarılarla rağmen, ilacın bazı sınırlamalara sahip olduğunu göstermiştir (Miller ve ark.,2010).

Kanser tedavilerinde veya hatta intihar vakalarında toksik kimyasal sisplatine maruz kaldıdıktan sonra gen ifade seviyeleri değişikliklerinin nasıl olduğu konusunda henüz bir çalışma yapılmamıştır. Bu araştırmada, farklı kimyasal maddelerin hücreyi etkilediği karmaşık mekanizmaların araştırılmıştır. Ökaryotik hücrelere saldırı, virüslerden, kimyasallara kadar geniş bir aralıktaki maddeler tarafından indüklenebilir. DNA'nın ve farklı ajanların kapsamlı bir şekilde anlaşılması, toksikolojiye yeni yolların tanımlanmasına yol açan hasar süreçleri konusuna yeni bakış açıları sağlamıştır (Cruz, 2013). Bununla birlikte, hücrenin DNA'sına yapılan

saldırının, araştırmacıların sisplatin kaynaklı hücre hasarını önleyen bir dizi radikal ajan bulmaya çalıştıkları görüldü. Bu güne değin yapılan çalışmalar, cAMP'nin, endotoksinleri inhibe eden antienflamatuvar etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Mishima ve ark.,2006). Bununla birlikte, cAMP'nin sitokrom p450 ve hepatotoksisite ifadesinde cAMP'nin rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışmada sıçan karaciğer hücrelerinde cAMP'nin sisplatin üzerindeki antioksidan etkileri araştırılmıştır.

Moleküler biyolojinin merkezi dogması ardışık bilginin transferi ile ilgilidir. Nükleik asitlerdeki bilginin aktarılabilirdiği veya devam ettirilebileceği, ancak bilginin proteinlere aktarılmasının geri dönüşümsüz olduğu ileri sürülmektedir. Bu nedenle bu araştırmanın odak noktası, cisplatin'in karaciğer hücrelerine girişi ile ilişkili gen ifade değişikliklerine dayanmaktadır. Sisplatin toksik etkilerinin ve cAMP antioksidan etkilerinin in-vitro karşılaştırılmalı analizi yapılmıştır. Bu çalışmada sitokrom CYP1A1 gen ifade seviyeleri araştırılmış ve kontrol olarak TBP housekeeping geni kullanılmıştır. İnsan örneklerinin çalışılmasının, etik ve teknik sınırlamaları, insan P450 gen ifade paternlerinin ontojenik ifadesini kontrol eden mekanizmaların derinlemesine anlaşılmasını engellemiş olmasından dolayı hayvan denmeleri avantajlı bir durum olmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada denemeler için sıçan model olarak seçilmiştir. Sıçanlar, 102'den fazla P450 enzimine sahip olduğu bilinmektedir (Nelson ve arkadaşları, 2004) ancak ilaç metabolizmasında yer alan kesin sayı tam olarak açık değildir.

Bu çalışmanın, karşılaştırılmalı toksikoloji vakalarına alternatif bir bakış açısı sunması ve adli toksikoloji ile bağlantılı vakaların aydınlatılmasında yol gösterici olması amaçlanmıştır.

1.1. Model Organizma

Model organizmalar, bilim insanlarının biyolojik süreçleri anlamalarına yardımcı olmak için laboratuvar ortamında kullanılan insan olmayan, bakımı ve üretimi kolay türlerdir. Model organizma; organizma modelinde yapılan keşiflerin diğer organizmaların işleyişi hakkında bilgi sağlayacağı beklentisi ile belirli biyolojik olayları anlamak için kapsamlı olarak incelenen insan dışı bir türe denir. Model organizmalar *in vivo* modellerdir ve hastalıkları araştırmak için yaygın şekilde kullanılırlar. Bu strateji, tüm canlı organizmaların yaşam sürecinde metabolik, gelişimsel yolların ve genetik materyalin korunmasıyla mümkün olur. Model organizmaları incelemek bilgilendirici olabilir ancak bir organizmadan diğerine dışa aktığında dikkatli olunmalıdır. Çok sık kullanılan model organizmalar; Maya (*Saccharomyces cerevisiae*), meyve sinekleri (*Drosophila melanogaster*), nematod kurdu (*Caenorhabditis elegans*), batı tırtıllı kurbağa (*Xenopus tropicalis*), sıçan (*Mus musculus*), zebra balığı (*Danio rerio*) gibidir. Bu çalışmada, laboratuvar sıçanı olarak bilinen Wistar tipi albino rat karaciğeri kullanılmıştır. Laboratuvar sıçanlar olarak gruplandırılan sıçanlar, deneylerde kullanılmak üzere laboratuvar koşullarında ve oldukça kısa bir sürede yetiştirilir. Kısa süre içerisinde, oldukça fazla sıçan üretilir. Dolayısıyla, laboratuvar ortamında kullanılmak için üretilebilecek en düşük maliyetli canlılardan birisidir. Hızlı ve sık üremeleri laboratuvar araştırmaları için oldukça faydalıdır. Sıçanların birkaç yıllık yaşamları, bilim insanlarının farklı nesilleriyle kolaylıkla çalışabilmesine imkan sunmaktadır. Ayrıca, sıçanlar bilim insanlarına bu avantajlardan çok daha fazlasını sunarlar. Örneğin; İnsanların ve sıçanların % 90'dan fazla ortak geni bulunmaktadır. Bu durum, insan genlerinin bazı durumlara ve etkenlere nasıl tepki vereceğinin anlaşılabilmesi için mükemmel bir çalışma alanı yaratır. Genetiğin ötesine, sıçanın tüm biyolojik sistemleri (organlar gibi) de insanlarınkine benzer şekilde çalışmaktadır. İnsan hastalıklarının bir modeli olarak sıçan, diğer deneysel organizmalara kıyasla birçok avantaj sunmaktadır (Iannaccone ve ark.,2009).

Aslında sıçanlar, tıbbi araştırmalarda genel olarak en çok kullanılan organizmalardır ve kök hücre çalışmalarında da bir çok avantaj sunmaktadır..

Sıçanlar, özellikle inme, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar için mükemmel modellerdir. Sıçanların fizyolojisi, kolay izlenebilmektedir ve birçok durumda, insan fizyolojisi ile benzerdir. Sıçan insan üremesi için mekanik çalışmalarda tercih edilen birincil modeldir. Diyabet modellerinde sıçan modeli, çevresel etkenlerin (örneğin, toksinler, stres, diyet ve aşılama) hastalığı değiştirme yetisi de dahil olmak üzere, insandaki hastalık gibi gelişmektedir. İlaç çalışmaları için, sıçanın büyüklüğü seri kan çekimine olanak tanır (Iannaccone ve Jacob, 2009).

1.2. Adli Tokikoloji

Adli toksikoloji, adli bilimler içerisinde önemli bir yere sahiptir. Ani ve şüpheli ölümlerde ölüm nedeni veya nedenlerinin ortaya çıkarılması önemli bir hukuki sorumluluk gerektirmektedir. Bir ölüm sebebi olarak zehirlenme söz konusu ise, cesetten alınacak materyalde toksik madde gösterilmeksizin böyle bir iddiada bulunulamaz. İlaç ve toksik maddelerin birçoğu, vücutta karakteristik değişimlere yol açmadığından, toksik incelemelerden kaçınıldığında ya ölüm sağlam bir kanıt olmaksızın intoksikasyona bağlanabilir, ya da intoksikasyon kaynaklı bir ölüm başka bir sebebe bağlanabilir. Ölümün doğrudan zehirlenmeye bağlı olmadığı birçok durumda bile adli toksikoloji ve farmakoloji adalet için çok kıymetli veriler sunabilir (Battal, 2012).

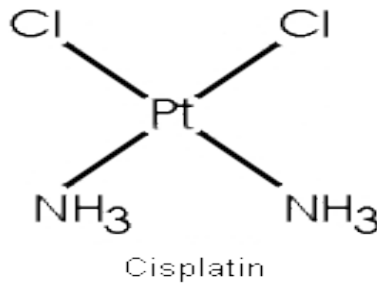
Zehirlenme faktörü olan kimyasal maddenin belirlenmesinde, nicel veya nitel (kalitatif/kantitatif) analizlerde belirli bir sıraya göre izlenen yöntemlere sistematik toksikolojik analiz (STA) adı verilir. STA; olgunun öyküsü, kullanılacak analize uygun örnek seçimi ve toplanması, örneğin korunması ve laboratuvara gönderilmesi, toksikolojik analiz ve analitik bulguların değerlendirilmesi olarak sıralanabilir (Levine 2003, Vural 2000).

Bazı farmakokinetik kimyasallar, canlı metabolizmasında, özellikle ilaç metabolize edici enzimler (Örn: P450) üzerinde bazı değişiklikler meydana

getirebilir. Böyle durumlarda toksikogenetik adı verilen multidisipliner bir bilim dalı yardımcı olmaktadır. Bu tez çalışmasında; toksik kimyasal olarak sisplatinin etkisini indirmek için antioksidan ajan olarak cAMP seçilmiştir. Biyokimyasal ve enzimatik düzeyde cAMP'nin, sisplatinin toksik etkisini azalttığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır (Akbal, 2006). Bu çalışmada ise; enzimatik düzeydeki bu farklılığın gen ifadesi düzeyinde gösterilmesi amaçlanmaktadır. Sisplatinin toksik etkisi ve cAMP'nin antioksidan etkisi *CYP1A1* gen ifadesi düzeyinde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

1.3. Sisplatin

Sisplatin (cis-diammine-dichloroplatinum II, cis-(NH₃)₂PtCl₂), sisplatin, cis-DDP), yatay düzlemde cis pozisyonunda platinin klor ve amonyum atomları tarafından sarılması ile oluşan inorganik bir komplekstir. Sisplatin 1845'te Michel Peryone ilk defa sentezlemiştir ve yapısını 1893'te Alfred Wegner tanımlamıştır. Sitotoksik özellikleri 1965'te Barnett Rosenberg tarafından tanımlanmıştır. 1978'de Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) sisplatinin servikal, baş, boyun, yumurtalık, testis, mesane gibi kanserlerin klinik tedavisinde kullanımını onaylamıştır (Chirino ve Pedraza- Chaverri, 2009).



(Sisdiamindikloroplatin(II))

Şekil 1.1 Sisplatinin yapısı

Sisplatin, çeşitli tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan oldukça etkili, platin içerikli kemoterapötik bir ajandır. Çeşitli kanser malignitelerini tedavi

etmede ilacın büyük başarısına rağmen, indüklenen toksisitesi geniş kullanımında önemli bir sınırlayıcı faktördür (Elizabeth ve ark, 1999). Sisplatin kaynaklı toksisiteler arasında nefrotoksisite, hepatotoksisite ve ototoksisite sayılabilir. Barabas ve arkadaşları (2001) sisplatin, hepatotoksisitesi en iyi bilinen ve klinik olarak önemli olan bir kimyasal olduğunu varsaymışlardır. Yıllar boyunca yapılan araştırmalar, sisplatin kaynaklı hücre ölümünün altında yatan hücresel mekanizmaları aydınlatmayı hedeflemişlerdir. Sisplatin, neden olduğu hücre ölümü ve diğer yan etkilere rağmen, kanser tedavisinin standart bir bileşeni olmaya devam etmektedir. Elizabeth (1999), araştırmalarında sisplatinin DNA'yı ve DNA'ya bağlı hücresel fonksiyonları nasıl etkilendiğini incelemiştir ve hücrelerin sisplatin'e karşı biyolojik tepkisine aracılık eden proteinlerin tanımlanmasını yapmıştır.

Sisplatin, hücrelere pasif difüzyon ile girmekte ve gen ifadesini etkilemektedir. Miller ve ark. (2010), genel olarak DNA'nın hücrelerdeki sisplatinin birincil hedefi DNA'yı etkilemek olduğunu önermişlerdir, ancak sisplatinin neden olduğu hücre hasarının mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır ama bu konuda çeşitli teoriler geliştirilmiştir. Bugüne kadar, gen ifadesinde sisplatin toksisitesine pek odaklanılmamıştır.

Barabas ve ark. (2001), sisplatin araştırmalarının geliştirilmesinden bu yana, sisplatinin böbrekleri olumsuz etkilemeden terapötik dozlar vermesini sağlamak için nefrotoksisiteyi hafifletme yolları üzerinde durmuşlardır ve bu çalışmada sisplatinin sıçan karaciğeri üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Sonuçlara göre; sisplatin başlangıçta tüm dokulara dağılır, ancak uygulamadan sonraki ilk saatlerde karaciğerde, böbreklerde, kaslarda ve deride birikme eğilimi gösterir. Sisplatin etkileri sonunda nihai olarak DNA hasarına yol açar. Sisplatinin kanserli hücreler üzerindeki birincil etkisinin ötesinde, DNA sentezini de inhibe eder. Sisplatinin DNA sentezini inhibe etme yeteneği, RNA ve protein sentezini inhibe etmek için gerekli olan dozlardan daha düşük dozlarda gerçekleşir (Ronald ve ark. 2010)

Kemoteropatik ajan sislpatin, birçok hücrese makromoleküllerle adduktlar meydana getirebilir. Onun sitotoksik özelliklerinin biofonksiyonal-DNA adduktlarının oluşması sonucu meydana gelmesi bunun bir kanıtı olarak gösterilebilir (Sweetman, 2002).

1.3.1 Sislpatinin hücreye alınımı ve hücredeki hedefleri

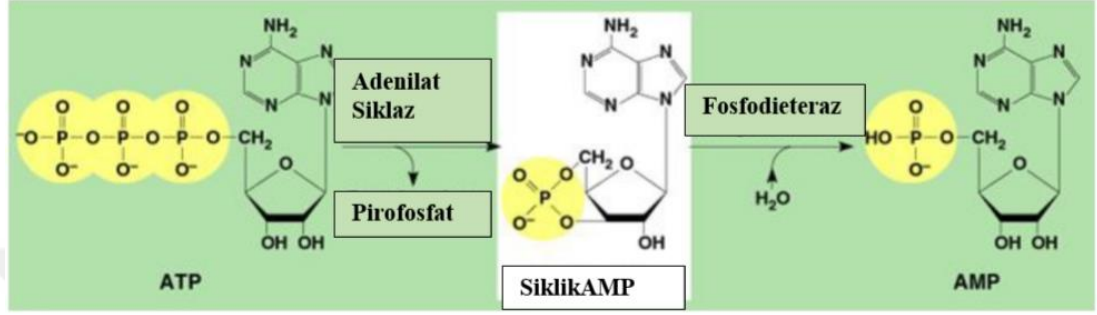
Sislpatin, kanser hastalarına steril bir tuz çözeltisi (sodyum klorür) içerisinde intravenöz olarak verilir. Sislpatin kan dolaşımına katılır, yüksek konsantrasyondaki klor iyonları sebebiyle (~100 mM) bozulmadan kalır. Bu nötral bileşik daha sonra ya pasif diffüzyonla ya da aktif taşımayla hücre içine girer. Nötral sislpatin molekülü hücre içinde hidroliz olur. Klor, bir su molekülü ile yer değiştirir ve pozitif yüklü moleküller meydana gelir. Hidroliz, klor iyonlarının çok düşük konsantrasyonu (~3-20 mM) ve bununla birlikte suyun çok yüksek konsantrasyonu sebebiyle hücre içinde meydana gelir (www.chemcases.com/cisplat/cisplat12.htm).

Sislpatin alınımı ve salınımı, bakır ve sislpatinin karşılıklı taşınımına izin veremeyeceği hipotezini savunan bakır metabolik yoluna bağlı gibi görünür (Ohashi ve ark., 2003). Aslında, bakır ve sislpatinin her ikisinde, bir diğlerinin alınım hızını azaltır ve CTR1'in delokalizasyonunu ve degridasyonunu tetikler. Dahası, bakır ve sislpatin aynı zamanda iki yönlü çapraz-direnç (cross-resistance) gösterir (Katano ve ark., 2002). İnsan karsinoma hücrelerindeki ATP7B'nin ifadesi iki ajanın daha hızlı salınımına neden olarak sislpatin ve bakırın her ikisine de duyarlılığını modüle eder (Komatsu ve ark., 2000).

1.4 Siklik Adenozin Mono Fosfat (cAMP)

Siklik adenozin monofosfat (cAMP), 1965 yılında Dr. Earl Shuttlerland tarafından keşfedilmiş. cAMP, "ikinci haberci" ailesinin asıl üyesidir.

cAMP, hücre içi haberleşmede son derece önemli bir sinyal molekülüdür ve birçok hücrel faaliyetin kontrolünden sorumludur. Isıya dayanıklı son derece işlevsel bir moleküldür. Bu tek molekül, birçok hormonun aktivasyonuna ve bunun sonucu olarak yüksek bitkileri ve mikroorganizmaları içeren tüm canlı yapılardaki hücrel aktivitenin düzenlenmesine aracılık eder (Kleiner ve Harvey, 1979).



Şekil 1.2 cAMP sentezi ve yıkımı (Akbal, 2010)

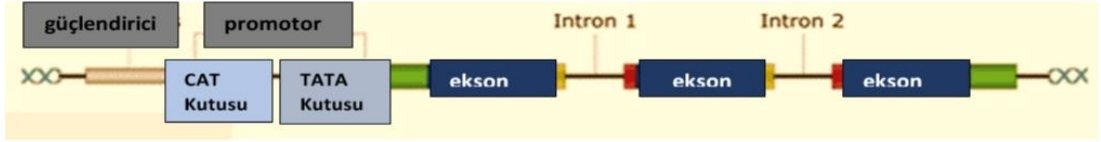
cAMP, adenosin trifosfattan elde edilir ve çeşitli organizmalarda cAMP bağımlı yolda hücre içi sinyal iletiminde kullanılır. Siklik adenosin monofosfat (cAMP) G proteinine bağlı reseptörlerin hormonlar, otokoidler, prostaglandinler ve farmakolojik ajanlar dahil olmak üzere ligandlarla bağlandıktan sonra adenil siklazın aktive edilmesi sonucunda oluşur. cAMP, şu anda amipler, bitkiler ve insanlar dahil organizmalardaki hücrel işlevin ortak bir düzenleyicisi olarak kullanılmaktadır. cAMP aracılı biyolojik süreçler hafıza, metabolizma, gen regülasyonu ve bağışıklık fonksiyonlarını içerir. Bu molekül, adenil siklazın etkisiyle adenosin trifosfattan oluşan bir siklik nükleotid mono fosfattır. İkinci mesajcı olarak bilinen bu siklik bileşik, katekolaminlerin, vasopressinin, adrenokortikotropik hormonun ve diğer pek çok hormonun etkisine katılır. Adenosin 3' 5'- siklik monofosfat da denir. Hücre içi cAMP, inflamatuvar mediatör üretimi ve fagositoz ve mikropların öldürülmesi gibi doğuştan gelen bağışıklık fonksiyonlarına yardımcı olur (Mosenden ve Tasken, 2011).

1.4.1 cAMP'in etki mekanizması

1. cAMP, hücre metabolik hızını kontrol eden en önemli faktördür.
2. cAMP düzenleyici (regülatör) ve etki edici (katalitik) alt ünitelerden meydana gelmiş proteinkinazlara etki ederek daha küçük alt birimlerine ayrılmasını sağlar.
3. cAMP düzenleyici alt birime bağlanarak enzim aktif hale geçmesine neden olur.
4. Hücre metabolizmasında cAMP olmadığı zaman düzenleyici alt birimi katalitik alt birimi yok eder.
5. cAMP gen aktive edici proteinlerle birleşerek bazı durumlarda mRNA sentezlenmesini sağlar.
6. cAMP her zaman aktiviteyi arttırmak değil çoğu zaman inhibe edici olarak görev alır.
7. cAMP hücre içerisinde olan değişikliklerden etkilenmez, sadece hücre dışındaki değişikliklerden etkilenir.
8. cAMP asit ve alkali etkilere karşı dayanıklıdır.
9. Ortamın pH'sından çok fazla etkilenmez. cAMP'nin yenilenme hızı yüksektir.

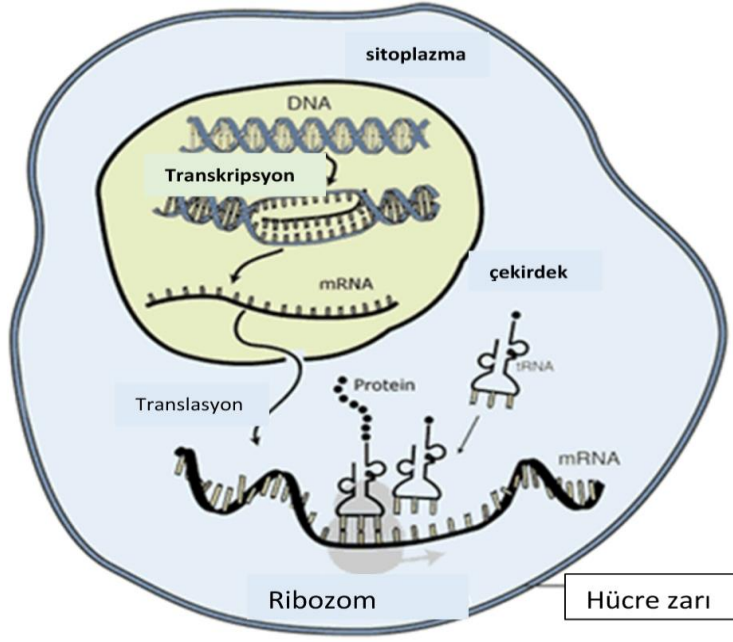
1.5.Gen İfadesi

Ökaryotik gen ifadesi genetik bilginin gen ürünlerini sentezlemek için kullanıldığı, bir proteinin gerçek sentezinden önce çeşitli aşamaları içeren karmaşık bir süreçtir (Cruz, 2013). Bu işlemler, bir genin birincil RNA ürününe transkripsiyonunu, işlenmiş mRNA transkriptinin sitoplazmaya taşınmasını ve son olarak mesajcı RNA'nın proteine dönüştürülmesi basamaklarını içerir. Çok az istisna dışında, tüm protein kodlayan genler bu yolu takip etme eğilimindedir.

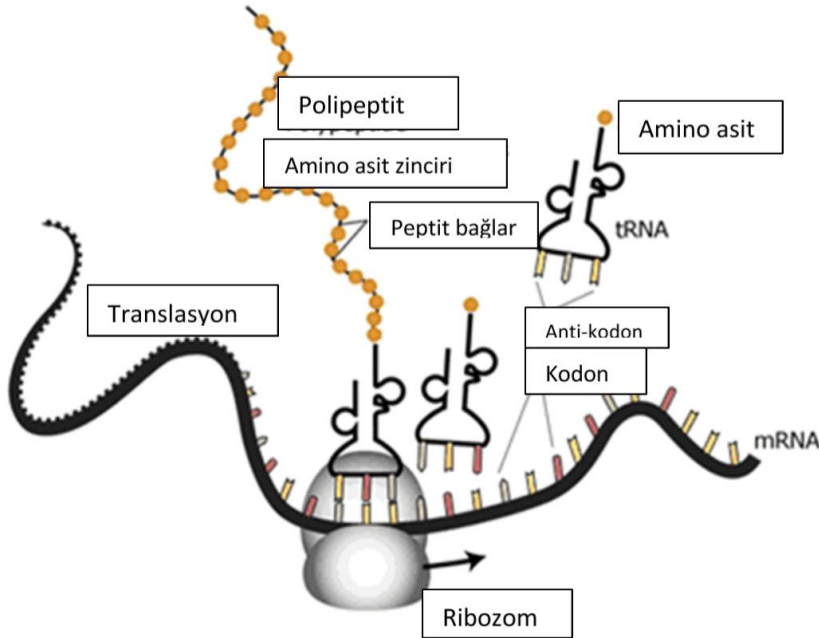


Şekil 1.3 Geni yapısı (<https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780128094686000279-f27-02-9780128094686.2019>)

Belirli bir hücrede ifade edilen genler, bu hücrenin neler yapabileceğini belirler. Herhangi bir zamanda bir hücrede mRNA moleküllerinin miktarları ve tipi, bu proteinin sentetik ve degradatif biyokimyasal yolları arasındaki dengeyi yansıtır. Bu dengenin sentetik tarafında, proteinlerinin üretimi transkripsiyon ile (DNA'dan RNA'ya) başlar ve translasyon ile (RNA'dan proteine) devam eder. Böylelikle, bu süreçlerin kontrolleri, bir hücrede hangi proteinlerin mevcut olduğunu ve hangi miktarlarda bulunduğunu belirlemede kritik bir rol oynar. Ek olarak, bir hücrenin RNA transkriptlerini ve yeni üretilen proteinleri işleme biçimi de protein seviyelerini büyük ölçüde etkiler (Cruz, 2013).



Şekil 1.4 Gen ifadesi (National Human Genome Research İnstitute (<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQC9OS9E1kh26aP-TfUPi8eaPLwMt48VxZ9dXXS5rqyXjNxUCTQaQ>))



Şekil 1.5 Proteinleri sentezis mekanizması (Translasyonu) : (<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRitlk0XGuv1mmACuAc1xWslGU-k-sBbq1dl0aQVUiVbXRhlQS8>)

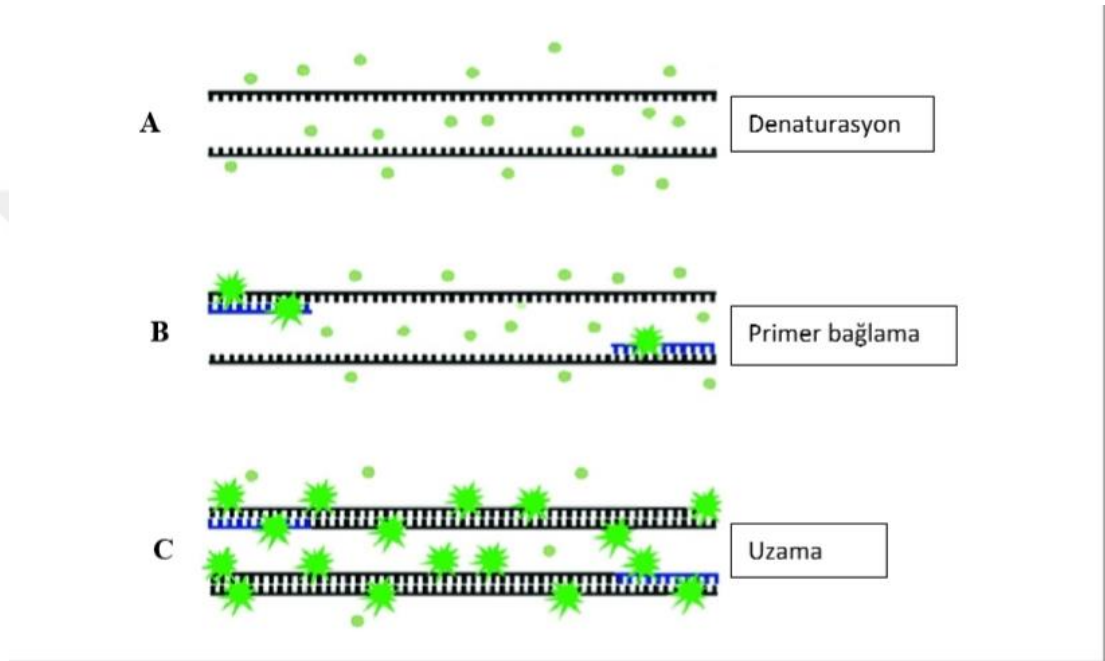
1.6 Gerçek Zamanlı (qRT-PCR) PCR

qRT-PCR, genetik analizler, gen ekspresyonu gibi konularda yaygın olarak uygulanan bir yöntemdir. RT-PCR, bir örnekte DNA veya RNA'nın miktarını belirlemek için kullanılan standart PCR tekniğinin bir varyasyonudur. Diziyeye özgü primerler kullanılarak, belirli bir DNA veya RNA dizisinin kopya sayısı belirlenebilir. PCR döngüleri sırasında her bir aşamada amplifiye edilen ürünün miktarını ölçerek, nicelleştirme mümkündür. Örnekte belirli bir DNA veya RNA dizisi bol miktarda ise, önceki döngülerde amplifikasyon görülür; eğer dizi az ise, sonraki döngülerde amplifikasyon gözlenir (ThermoFisher Scientific, 2016).

Amplifiye edilmiş ürünün nicelleştirilmesi, floresan probaları veya floresan DNA bağlama boya ve PCR için termal döngüyü gerçekleştirirken floresan ölçen gerçek zamanlı PCR cihazları kullanılarak elde edilir. qRT-PCR'de, her bir döngüden sonra, üretilen PCR ürünü moleküllerinin (amplikonlar) sayısı ile doğru orantılı olarak artan floresan sinyali veren floresan boyalar yoluyla DNA miktarı ölçülür. Reaksiyonun üstel fazında toplanan veriler, amplifikasyon hedefinin başlangıç miktarı hakkında niceliksel bilgi verir. qRT-PCR'de kullanılan floresan raportörler, çift sarmallı DNA (dsDNA) bağlayıcı bağları veya amplifikasyon sırasında PCR ürünleri ile hibritlenen PCR primerleri veya problemlerine bağlanmış boya molekülleri içerir (ThermoFisher Scientific, 2016)..

qRT-PCR; bir ters transkriptaz kullanılarak total RNA veya poli (A) RNA'nın cDNA (komplementer DNA)'ya ters transkripsiyonu ile başlar. Bu birinci iplikli cDNA sentez reaksiyonu, rastgele primerleri, oligo (dT) veya gen spesifik primerler kullanılarak hazırlanabilir. cDNA sentezi için kullanılan sıcaklık seçilen ters transkriptaza bağlıdır. Ters transkripsiyondan sonra, cDNA'nın yaklaşık % 10'u, gerçek zamanlı PCR için ayrı bir tüpe aktarılır (ThermoFisher Scientific, 2016).

qRT-PCR teknolojisi; sarmalına bağlanarak floresan ışımaya yapan özel boyalarla (SYBR Green, SYTO9 gibi) veya yıkıma bağlı sinyal oluşturan prob diziler aracılığı ile amplifikasyon miktarının tespit edilmesini sağlamaktadır. Her PCR döngüsü sonunda tüp içinde oluşan çift zincirli ürün miktarının ölçülebilmesini ve kantitatif analizlerin yapılmasını sağlar (Bustin ve ark. 2005, Nolan ve ark. 2006, Yüzbaşıoğlu, 2008).

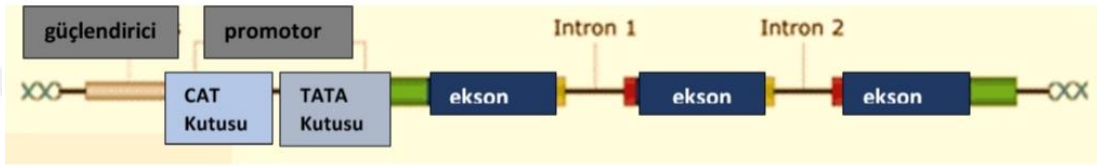


Şekil 1.6. PCR amplifikasyonu sırasında SYBR Green tekniği: **A.** Reaksiyonun başlangıcında boya floresans yoktur. **B.** Primerlerin bağlanması ile sonucu SYBR Green oluşan çift zincirli DNA, az miktarda floresans sinyali açığa çıkar. **C.** Uzama sırasında, bağlanma ile floresansı artırır. Bu boyanın floresansı, çift zincirli DNA'nın küçük oyuna bağlandığında 100 ila 200 kat artar. Bu, PCR reaksiyonunun uzama aşamasının sonunda bulunan DNA miktarını ölçmek için kullanılır. (Fraga ve ark., 2008)

1.6.1 TBP Geni

TBP, TATA kutusu bağlayıcı protein olarak adlandırılan bir proteinin üretimini bildiren bir genidir. Bu protein vücuttaki tüm hücrelerde ve dokularda

aktiftir ve diğer genlerin aktivitesini düzenlemede kritik bir rol oynar. TATA kutusu bağlayıcı protein, birçok genin başlangıcına yakın DNA'nın düzenleyici bölgelerinde görünen TATA kutusu adı verilen spesifik DNA dizisine bağlanır.. TBP geninin bir bölgesi, bir CAG / CAA trinükleotit tekrarı olarak bilinen özel bir DNA segmenti içerir. Bu bölüm, bir satırda birden çok kez görünen üç DNA nükleotid serisinden oluşur. CAG / CAA segmenti, spesifik bir gen içerisinde 25 ila 42 kez tekrarlanır (Gao ve ark, 2008).



Şekil 1.7 TBP geni lokasyonu (Clinical Tools.Inc) (<https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780128094686000279-f27-02-9780128094686.jpg>)

1.6.2 Sitokrom P450 genleri ve *CYP1A1* geni

Sitokrom P450 genleri (CYP) ilaç farmako-kinetiğinde ve yanıtında önemli bir değişkenlik kaynağıdır (Zanger ve Schwab, 2013). CYP1'e ait olan yaklaşık olarak bir düzine enzim, CYP1'e ait olan 57 kadar insan CYP'sinin 2, 3'ü, klinik kullanımdaki tüm ilaçların % 70-80'i dahil olmak üzere çoğu yabancı maddenin biyotransformasyonundan sorumludur. Karaciğerde en yüksek ifade edilen CYP formları CYP 3A4, 2C9, 2C8, 2E1 ve 1A2 iken, 2A6, 2D6, 2B6, 2C19 ve 3A5 daha düşüktür ve CYP'ler 2A2, 1A1, 1B1 olarak esasen ekstrahepatik olarak ifade edilir. Her bir CYP'nin ifadesi, esas olarak, ksenobiyotiklerle indüksiyon dahil olmak üzere, mekanizmanın ve faktörlerin benzersiz bir kombinasyonundan etkilenmektedir. CYP'lerin çoğunluğu karaciğerde özellikle CYP 3A5'lerde yüksek oranda ifade edilir. Karaciğerde CYP1A2'nin nispeten yüksek ifade, klinik olarak önemli bazı ilaçların metabolizmasında önemli bir rol oynar (Güneş ve Dahl, 2008, Zhou ve ark. 2009).

Sitokrom P450'ler, çoğu ilacın ve diğerk lipofilik ksenobiyotiklerin oksidatif biyotransformasyonunu katalize edebilen majör enzim ailesini oluşturur ve bu nedenle klinik farmakoloji için özel bir önem taşırlar (Nelson, 2004, Zanger, ve ark 2008). Sorumlu enzimlerin ifadesini ve işlevini etkileyen içsel ve dışsal faktörlerin bilinmesi, değışken farmakokinetiklerin ve ilaç tepkisinin tahmini için bir ön koşuldur.

Sitokrom P450 genlerinin klonlanması nedeniyle, insan karaciğerklerindeki bazı P450 genlerinin ontojenik ifadesi bildirilmiştir (de Wildt ve ark, 1999, Blake ve ark, 2005).

Bir heme-tiolat monoksijenaz olan bir sitokrom P450 (CYP450), CYP1, CYP2 ve CYP3 familyasının üyelerinin geniş substrat spesifikasyonları sergilediğı, uyuşturucu ve ayrıca hem insan yapımı hem de doğal olarak oluşan kimyasallar ve farmasötik gibi kseno-kimyasalların detoksifikasyonunda önemli bir rol oynadığı bir gen süperfamilyasını içerir (Gonzalez, 1989). P450 formları sadece karaciğerkde değil, bağırsak, böbrek, akciğerk, beyin, böbrek üstü bezi, deri ve plasenta gibi ekstrahepatik dokularda da ifade edilir (Gonzalez, 1989; McKinnon ve McManus, 1996; Ding ve Kaminsky, 2003). Ksenobiyotik maruziyetinde, organizmalar, genellikle P450 genlerinin transkripsiyonunu aktive ederek kimyasalları vücuttan etkin bir şekilde yok etmek için metabolik aktivitelerini arttırabilirler (Conney, 1967; Gonzalez, 1989). Karaciğerk, kseno-kimyasalları metabolize eden ana organdır, ancak akciğerk, deri ve burun mukozası gibi maruz kalan dokulardaki metabolize edici enzimler, kimyasal maddelerin vücut sirkülasyonuna girmeden önce toksisitesini azaltmada önemli rol oynarlar (Blizard ve ark., 2001).

Bu çalışmada; adli toksikoloji kapsamında nefrotoksik etkisi olan sisplatin ve antitoksik etkiye sahip siklik adenozin monofosfat cAMP'nin wistar tipi rat karaciğerkinde, toksikoloji ile alakalı olan sitokrom P450 geninin ifadesindeki değışimlerine bakılmıştır. Biyokimyasal ve enzimatik düzeyinde cAMP'nin, sisplatinin toksik etkisini azalttığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmada ise; enzimatik düzeydeki bu farklılığın gen ifadesi düzeyinde gösterilmesi

amaçlanmıştır. Bu sayede toksik etkiye maruz kalınmış adli durumlarda (İntihar, zehirlenme vb.), adli toksikologların durum değerlendirmesinde kullanılmak üzere literatüre gen ifadesi düzeyini aydınlatan önemli bir kaynak kazandırılması hedeflenmiştir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Model organizmanın temin edilmesi

Daha önce Ondokuz Mayıs Üniversitesi; biyoloji bölümünde “*Sisplatin verilmiş ratlarda cAMP ve coQ'nun karaciğer radikal süpürücü enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin ve hasar giderilmesindeki rollerinin araştırılması*” isimli doktora tezinde kullanılmış karaciğer örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Laboratuvarında yetiştirilip üretilen Wistar albino tipi ratlar kullanılmıştır. Çalışma için 01.06.2007 tarihli ve HEK/28 nolu etik kurul raporu ve örneklerin kullanımına dair izin belgesi mevcuttur.

Sıçanlar servikal dislokasyon yöntemiyle öldürüldükten sonra karın ve göğüs kısımları açılmıştır. Karaciğer %0.9'luk NaCl perfüze edildikten sonra çıkarılmış ve kurutma kağıdı ile fazla suyu alınmıştır. Karaciğerler hassas terazide tartılmış ve kimyasal uygulama işlemine geçmeden önce 0.25 M'lık sükröz çözeltisinde saklanmıştır. Daha sonra kullanılacak çalışma grupları oluşturularak, karaciğerlere; sisplatin (10 mg/kg), coenzimQ (370mg/kg), cAMP (15mg/kg) uygulanmıştır. Bu tez çalışmasında sisplatin ve coenzimQ verilmiş sıçan karaciğerleri kullanılmıştır. - 80 °C de saklanmış olan karaciğerler, kuru buz ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Biyokimya Laboratuvarından, Ankara Üniversitesi, Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarına taşınmıştır. Kuru buz karaciğerlerin bulunduğu sıcaklığı muhafaza etmek için ve herhangi bir denatürasyonu engellemek için kullanılmıştır.

2.2. Karaciğerlerin Homojenizasyonu ve Çalışma Gruplarının Belirlenmesi

Sükroz çözeltisi içerisinde saklanan karaciğerlere homojenizasyon ve/veya sonikasyon işlemi uygulandıktan sonra RNA izolasyonunda kullanılmak üzere -20 °C’de depolanmışlardır, Çalışma grupları için 12, 24 ve 48 saatlik örnekler ve kontrolleri seçilmiştir. Çalışılan grup aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. Çalışmalar 2 biyolojik tekrarlı olarak yürütülmüştür. Çalışma grupları ve biyolojik tekrar sayıları **Çizelge 2.1**’de verilmiştir.

Çizelge 2.1: Çalışma grupları, saat ve biyolojik tekrar sayıları

Grup/Saat	12. saat	24. saat	48. saat
Kontrol	2	2	2
Sisplatin	2	2	2
cAMP	2	2	2
SisP+cAMP	2	2	2

2.3. Çalışılan Genlerin Belirlenmesi

Karaciğer dokularındaki sisplatinin toksik ve cAMP’nin antitoksik etkilerinin karşılaştırılabilmesi için sitokrom *CYP1A1* geni ile çalışılmıştır.. İlgili gene ileri ve geri primerleri tasarlanmıştır. Normalizasyon için gerekli olan housekeeping gen olarak da TBP (TATA Binding Protein) geni tercih edilmiştir. *CYP1A1* geninin ve housekeeping gen olan *TBP*’nin gen dizileri NCBI’den temin edilmiştir. Dizilere uygun olan ileri ve geri primerler Tablo 2’deki gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 Çalışılan genler ve primer dizileri

Gen Adı	İleri Primer	Geri Primer	NCBI Accession Numaransı /Referans
TBP (TATA binding protein)	5'- TGCACAGGAGCCAAGAG TGAA-3'	5'- CATCACAGCTCCCCACCA- 3'	NM_003194
CYPIA1	5- GATGCTGAGGACCAGAA GACC GC	5 -CAG GAG GCT GGA CGA GAA TGC	NP_036672.2

2.4. Total RNA İzolasyonu

-80°C'de muhafaza edilen karaciğer örneklerinden 2 biyolojik tekrarlı olacak şekilde alınarak Trizol protokolüne göre Total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA miktarı spektrofotometrik ölçümlerle Thermo Nanodrop Lite-*spectrophotometer* cihazı ile belirlenmiştir.

Trizol protokolü;

1. Karaciğer örneklerine 1 ml trizol çözeltisi eklenmiştir ve tüp içerisinde homojenizatör ile homojenizasyon işlemi yapıldı. Homojenize örnekler oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
2. Tüplerin üzerine 200µl kloroform eklendi ve 10 saniye boyunca tüpler dikkatlice alt üst edildi.
3. 15000 rpm'de, 4 °C'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
4. Üstte kalan süpernatant kısmı dikkatlice yeni bir tüpe aktarıldı.
5. 1:1 oranında *iso*-propanol eklenmiştir ve hafif pipetaj yapılmıştır.
6. 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilen örneklere 15000 rpm'de, 4 °C'de 10 dakika santrifüj yapıldı.
7. Üstteki dibe çöken beyaz pellete dikkat edilerek üstteki sıvı uzaklaştırıldı.

8. 1 ml % 70'lik etil alkol eklenmiştir.
9. 15000 rpm'de, 4 °C'de 5 dakika santrifüj yapıldı..
10. Pellete değmeden etil alkol uzaklaştırılmıştır, 5-10 dakika oda sıcaklığında kurutuldu.
11. 40-60 µl ddH₂O eklenerek kalıtsal materyalin çözülmesi sağlandı.
12. Tüpler 55-60 °C'de 10-15 dakika boyunca inkübe edildi ve nanodropta ölçüm yapıldı.

Ölçüm yapıldıktan sonra izole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. %1'lik agaroz jel hazırlamak için; 1 g agaroz, 100 ml 1XTBE içerisinde çözülmüş ve mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Çözelti, el yakmayacak soğukluğa, yaklaşık 65 °C'ye geldikten sonra 4 µl etidyum bromid (10 mg/ml) eklenmiş ve agaroz jel tankına dökülerek 30 dk boyunca donması beklenmiştir. Etidyum bromid RNA'nın UV ışık altında görüntülenmesini sağlamaktadır. Daha sonra 1 µl yükleme boyası, 6X loading dye, 3 µl RNA örneği 80-100 voltta, 30 dk boyunca yürütülmüştür. Jel UV-Transilimünatör'de gözlemlenmiştir.

2.5. cDNA sentezi

RNA örneklerinden BioLabs First Strand cDNA sentez kiti protokolü (E6300) kullanarak, komplementer DNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Protokol aşağıdaki şekilde yürütüldü;

RNA : 1000 ng

Oligo (dT) 23VN (50µl) : 2 µl

Nuklease free-Water : Son hacim 8 µl olacak şekilde ilave edildi.

Yukarıdaki bileşenler steril Rnase-free mikrofüj tüpüne konuldu ve 70°C de 5 dk denetürasyon yapıldı. Ardından tüpler hızlı bir şekilde buza alındı. Tüplere;

M-MuLv Reaction mix : 10µl

M-MuLv Enzyme mix : 2 µl ilave edildi.

Ardından 42 °C’de 1 saat, 80°C de 5 dk olacak şekilde Biometra-Thermocycler PCR cihazında cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezini takiben cDNA’lar qRT-PCR aşamalarında kullanılmak üzere 50 kat seyreltilerek saklandı.

2.6. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Çalışmaları

Uygun miktar ve kalitede cDNA sentezi yapıldıktan sonra; hedef gen olan CYP1A1 (accession number: NP_036672.2) geni ve housekeeping gen olarak seçilmiş TBP (TATA binding protein; accession number NM_003194) genleri ile qRT-PCR çalışmaları gerçekleştirildi. Real Time PCR uygulamaları Light Cycler Nano (Roche) cihazıyla SYBR Green I içerikli Go-Taq 2X master mix kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan qRT- PCR protokolü aşağıdaki gibidir;

Go-Taq	(2x)	:	2.5µl
Forward primer	(10 uM)	:	0.7µl
Revers primer	(10 uM)	:	0.7µl
cDNA		:	1µl
ddH2O		:	0.1µl

qRT-PCR esnasında Ct değerleri oluşan pik profilleriyle belirlenmiştir. Reaksiyon esnasında oluşan Ct değerleri ve erime eğrileri dikkate alınarak, normalizasyon ve istatistik analiz yapıldı. Çalışmalar 2 biyolojik tekrarlı olarak yapıldı.

2.7. Normalizasyon

Farklı kimyasallara maruz kalmış karaciğer örneklerinde, CYP1A1 genine ait gen ifadeleri housekeeping gen olan TBP ile karşılaştırılmıştır. Ct olarak bilenen gen ifadesi verilerinin değerlendirilmesi ve normalizasyonu $2^{-\Delta Ct}$ metoduna göre yapılmıştır. (Rao ve ark., 2013).

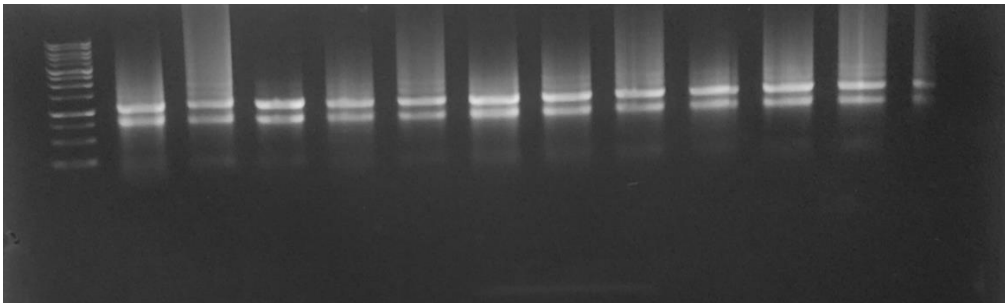
3. BULGULAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, istatistiksel anlamlılıkları belirleyerek tablo ve şekil olarak bu bölümde sunulmuştur. Araştırmada kullanılan çalışma grupları ve incelediğimiz genlerin qRT-PCR Ct değerleri ve nanodrop ölçüm miktarlarıyla, saflıkları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Agaroz jel elektroforezi görüntüsü ise Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Tüm örneklerden RNA izole edilmiş ve elde edilen cDNA’ların saflığı incelenmiştir.

Sisplatin ve cAMP gibi farklı kimyasallara maruz kalmış karaciğer örneklerinde, *CYP1A1* genine ait gen ifadeleri housekeeping gen olan TBP ile karşılaştırılmıştır. Ct olarak belirlenen gen ifadesi verilerinin değerlendirilmesi ve normalizasyonu gösterilmiştir (Çizelge 4.5). RT-PCR sonrasında örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek amplifikasyonun gerçekleştiği gösterilmiştir (Şekil 4.1).

CYP1A1 ve *TBP* housekeeping geni olmak üzere sisplatin ve cAMP genlerin ifadesi üzerinde etkisi incelenmiştir.

RT-PCR esnasında Ct değerleri, oluşan pik profilleriyle belirlenmiştir. Reaksiyon esnasında oluşan Ct değerleri ve erime eğrileri dikkate alınarak normalizasyon yapılmıştır.



Şekil 3.1 Örneklerden izole edilen DNA’ya ait jel elektroforez görüntüsü

Agaroz jel elektroforezi görüntü sonuçlarına göre; jel üzerinde RNA örneklerinde beklenen çift bantlar gözlenmiştir. Çift bantlardan ileride olan 18S rRNA diğeri ise 28S rRNA'yı temsil etmektedir.

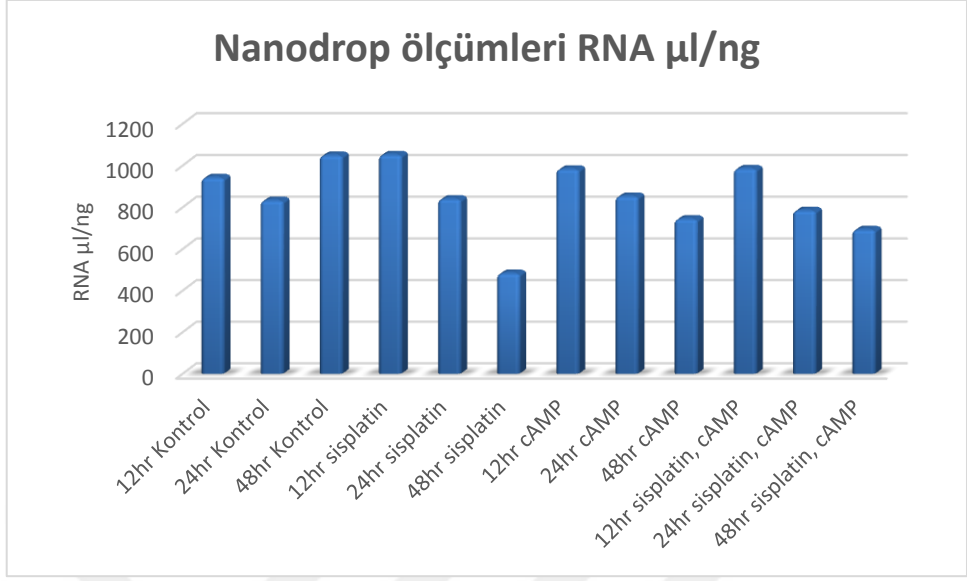
Çizelge 3.1 Çalışılan örneklerin Ct değerleri, nanodrop ölçümleri ve RNA'nın saflılığı

Çalışılan grup isimleri	housekeeping gene TATA binding cQ	C1A1 gene cQ	Nanodrop ölçümleri RNA μ /ng	A260/A280
12hr Kontrol	22.3	34.3	942.7	2.01
24hr Kontrol	23.4	33.2	833.5	2
48hr Kontrol	23.8	35.1	1049.6	2
12hr sisplatin	28.3	36.2	1052.5	2
24hr sisplatin	32.5	37.3	840.6	1.99
48hr sisplatin	33	40	483.7	1.99
12hr cAMP	29.3	38.2	983.6	2.01
24hr cAMP	31.5	38.9	853.4	1.98
48hr cAMP	34	40.2	744.8	2.01
12hr sisplatin+cAMP	29.5	35.3	985.7	2.01
24hr sisplatin+cAMP	36.1	34.2	785.4	2.01
48hr sisplatin+cAMP	35	40.1	693.8	2.02

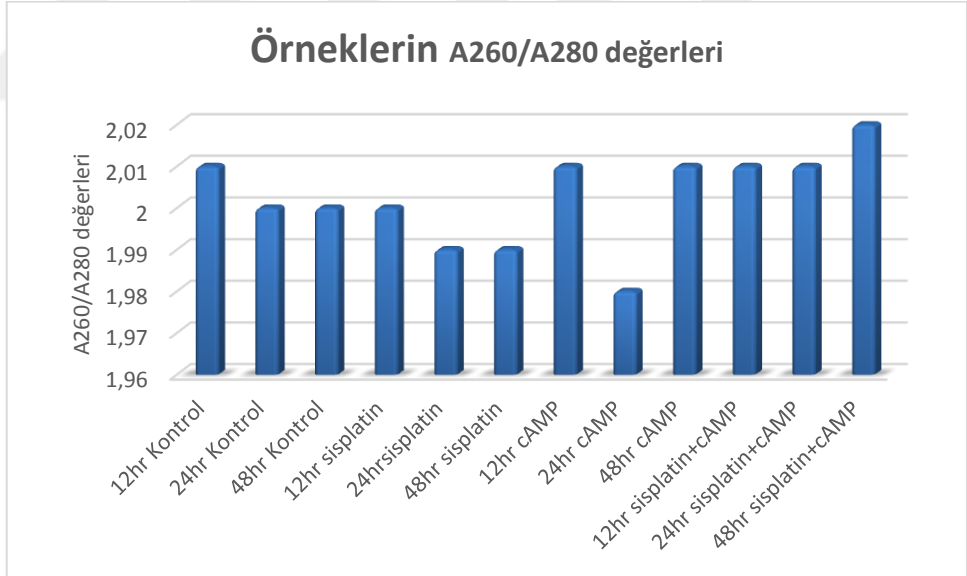
Çizelge 3.1'de çalışma örneklerinin RNA izolasyonundan sonra elde edilen nanodrop ölçümleri (ng/ μ l) ve saflık miktarları verilmiştir (A260/A280). Örneklerin RNA miktarları 483,7 ile 1052,5 ng/ μ l arasında değişim göstermiştir (Çizelge 3.2). Saflık değerleri ise RNA'dan beklenen gibi 1,99 ile 2,01 (Çizelge 3.3) arasındadır.

Ayrıca, RT-PCR çalışmalarını takiben elde edilen Ct değerleri de çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Değerler 22,3 ile 40 arasında dağılım göstermektedir.

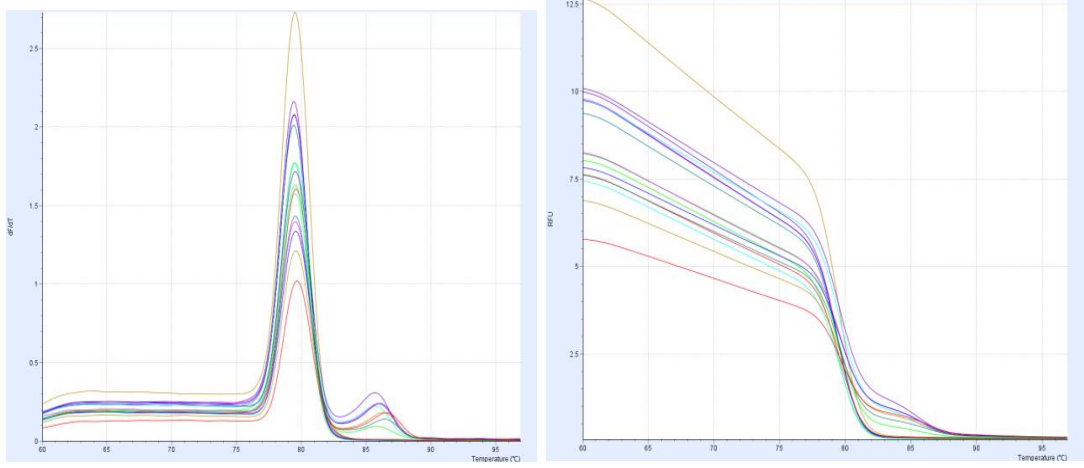
Çizelge 3.2 RNA örneklerinin nanodrop ölçümleri $\mu\text{l}/\text{ng}$



Çizelge 3.3 Örneklerden Nanodrop ölçümleri A260/A280



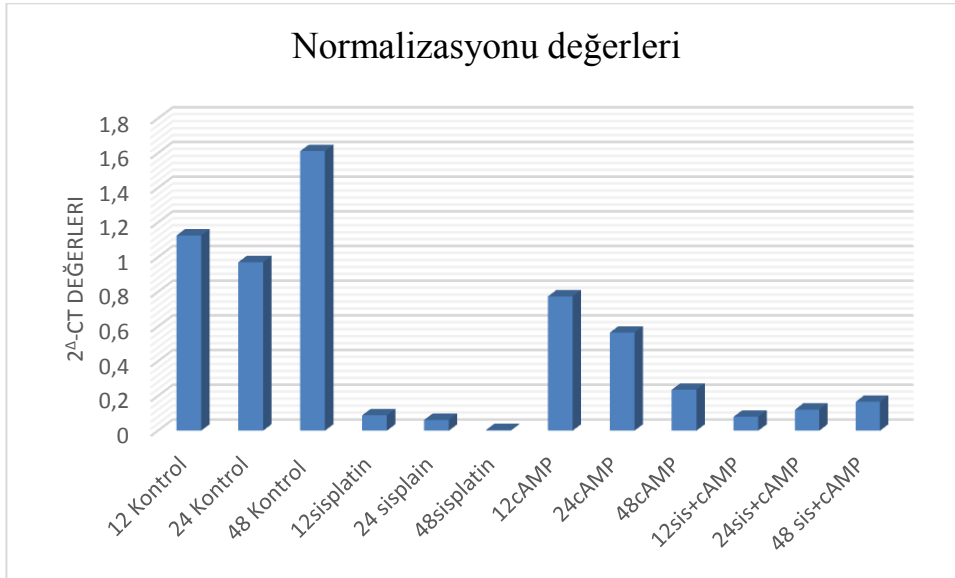
İyi sonuç alınan RNA örneklerinden sentezlenen cDNA'lar ile yapılan RT-PCR sonuçlarına göre erime eğrisi analizi ile reaksiyonun kalitesi değerlendirilmiştir. TBP housekeeping genine ait erime sıcaklığı pikleri ve erime eğrisi Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2 TBP genine ait erime sıcaklığı pikleri ve erime eğrisi

Erime eğrisi analizlerine göre çalışılan her bir primerin, farklı örneklerde erime sıcaklığı aynı olmalıdır ($\pm 1-2^{\circ}\text{C}$ fark göz ardı edilebilir). Böylelikle reaksiyonun kalitesi hem primerler açısından hem de ürünlerin özgüllüğü açısından gözlemlenmiş olacaktır.

Çizelge 3.4 Relatif normalizasyon değerlerine göre gen ifadesi farklılıkları



Limak (2006)'a göre yapılan 2^{Δ} -Ct hesaplamalar sonucunda Şekil 3.4'de verilen grafik elde edilmiştir. Grafiğe göre; kontrol gruplarındaki gen ifadesi esas alınarak karşılaştırma yapıldığında; 12., 24., ve 48. saatlerde sisplatine maruz kalmış örneklerin gen ifadesinde ciddi bir düşüş söz konusudur. cAMP'ye maruz kalmış örneklerde ise, yine bir düşüş vardır ancak, sisplatininki kadar fazla değildir. Sisplatinin ve cAMP'nin beraber uygulandığı örneklerde ise yeniden bir artış görülmektedir.



4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, sisplatin ve cAMP'nin, karaciğer dokusundaki CYP1A1 gen ifade üzerinde etkileri gözlenmiştir. Bununla birlikte, sisplatin ve cAMP etkisi kıyaslayarak, sisplatinin CYP1A1 gen ifade seviyelerini önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Grafikte'den anlaşıldığı gibi; 0 ile 2 arasındaki değerler daha az ifade göstermiştir.

Çizelge 3.4'te gösterildiği gibi, sisplatin ile muamele edilmiş örneklerde kontrol gruplarına oranla daha ciddi bir düşüş elde edilmiştir. Bu durum sisplatinin hücredeki toksik etkisinden dolayı gen ifadesini düşürdüğü yönündeki varsayımlarla aynı doğrultudadır. Bir çalışmada; sisplatinin süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin etkinliği arttırıcı bir etki gösterdiği bulunmuştur (Akbal, 2010). Karaciğer süpürücü enzimleri olarak tanımlanan bu enzimlerin etkinliğinin artması hücrede toksisitenin artması ve hücre ve/veya dokularda toksik radikallerin birikmesini sağlamaktadır. Ancak, sisplatin cAMP ile beraber verildiğinde, sisplatinin radikal hasar etkisinin azaldığı görülmüştür.

cAMP ile muamele edilen örneklerin gen ifade düzeylerinde de kontrol gruplarına oranla bir düşüş söz konusudur. Sırasıyla 12., 24. ve 48. saatlere doğru gidildikçe gen ifadesi daha da azalmaktadır. Karaciğer dokuları sisplatin ya da cAMP'ye ne kadar çok maruz kalırsa o kadar toksik etkilerinin arttığı, dolayısıyla gen ifade düzeylerinin de gittikçe azaldığı düşünülmektedir. Aslında cAMP'nin toksik etkisinden ziyade antioksidan etkisinden dolayı da tek başına uygulandığında hücredeki gen ifadesinde kontrol gruplarına oranla bir değişim beklenmemekteydi, ancak tek başına cAMP'ye maruz kalan örneklerde gen ifadesinin düştüğü gözlemlenmiş olmasına rağmen, bulunan düşüş sisplatininki kadar fazla değildir. Buradan sisplatinin cAMP'ye göre daha toksik bir etkiye sahip olduğu sonucu çıkarılabilir. Akbal çalışmasında, cAMP'nin tek başına uygulandığı örneklerde

süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri üzerinde inhibe edici bir etki gösterdiğini belirlemiştir (Akbal 2010).

Sisplatinin ve cAMP'nin beraber uygulandığı karaciğer örneklerinden elde edilen sonuçlara göre gen ifadesinde yeniden bir artışın söz konusu olduğu görülmektedir. 12. saatten 48. saate doğru gidildikçe, Akbal (2010)'ın çalışmasında adı geçen süpürücü enzim aktiviteleri azalmış, dolayısıyla hücredeki serbest radikaller giderilmeye başlamış ve hücre iyileşme fazına girmiştir. Ancak sisplatinin toksik etkisinin tamamen giderilmesi için daha fazla zamana ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma sonucunda; sisplatinin toksik etkisinin, cAMP tarafından azaltıldığı yönünde olduğuna dair veriler elde edilmiştir. CYP1A1 geni ile yapılan gen ifade çalışmaları da bu hipotezi desteklemektedir. Sisplatin üzerinde yapılan kanser tedavisi ile ilgili çalışmaların zararlarını azaltma adına; bu sonuç önemli bir veri sunmaktadır. Bununla birlikte, insanda *CYP1A1* geni ifadesinin büyük ölçüde akciğer ve plasenta gibi ekstrahepatik dokular arasında olduğu düşünülmektedir (Wrighton ve ark. 1996). Önceki çalışmalarda insan karaciğerinde *CYP1A1* olabilecek muhtemel bir proteinin varlığını bildirilmiştir (Adams ve ark. 1985, Wrighton ve ark. 1986, Schweikl ve ark. 1993). Bununla birlikte, insan karaciğerinde ifade edilen *CYP1A1* proteini fikri hala tartışmalıdır. “Ratlardan elde edilen sonuçlara göre, ilgili kimyasallar insanda da aynı etkiyi gösterebilir mi?” sorusunun cevabı tam olarak bilinmemektedir.

CYP1A1 genini de kapsayan P450 enzimleri yalnızca karaciğerde değil, barsak, böbrek, akciğer, beyin, adrenal bez, cilt ve plasenta gibi ekstrahepatik dokularda da ifade olmaktadır (Gonzales 1989, McManus ve ark.1988, Ding ve Kaminski 2003). Farklı dokular üzerinde yapılan diğer çalışmalar ile, sisplatin ve antioksidan cAMP'in kanser tedavisi çalışmalarındaki etkinliği netleştirilmeye çalışılmıştır. Klinik çalışmalarda ve toksikojenetik çalışmalarda, diğer ilgili genlerle ve alternatif kimyasalların etkileri de karşılaştırmalı bir yaklaşımla kullanılmalıdır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Wistar albino tipi rat karaciğeri kullanılarak yapılan ve cAMP ile sisplatinin toksik ve antitoksik etkilerinin gen ifadesi düzeyinde araştırıldığı bu çalışmada, cAMP ile muamele edilen örneklerin gen ifade düzeylerinde 12., 24. ve 48. Saatlere doğru gidildikçe bir azalma görülmektedir. Sisplatin ile muamele edilmiş numunelerde de kontrol gruplarına oranla ve normalizasyon verilerine göre ciddi bir düşüş görülmektedir. Sisplatinin ve cAMP'nin beraber uygulandığı karaciğerlerden elde edilen sonuçlarda ise gen ifadesinde bir artış söz konusudur.

Gelecek çalışmalarda; deneyin güvenilirliği ve sonuçların kaliteli olarak değerlendirilmesi amacıyla, biyolojik tekrar sayısı arttırılmalı, ve çalışmalar en az 3 biyolojik tekrarlı olarak yenilenmelidir. Ayrıca, hücre toksikolojisiyle alakalı olduğu bilinen bir çok gen taranarak, söz konusu kimyasalların toksik ve antitoksik etkileri karşılaştırmalı olarak incelenebilir. Yalnızca karaciğer dokularında değil böbrek ve pankreas gibi dokularda da çeşitli kimyasalların toksik etkileri araştırılabilir. Böylelikle toksikoloji çalışmalarına, moleküler açıdan bir önemli bir katkı sağlanmış olacaktır.

ÖZET

Wistar albino tipi rat karaciğerinde sisplatin ve cAMP'nin toksik ve antitoksik etkilerinin gen ifadesi düzeyinde karşılaştırılması

Kanser tedavisi boyunca, sisplatin başarılı bir kemoterapi ajanı olduğu kanıtlanmıştır. Gen ifade değişikliklerinin nasıl gerçekleştiği konusunda hem in vivo hem de in vitro olarak birkaç araştırma yapılmıştır. Bu çalışma, cYP1A1 gen ifade değişikliklerinin sisplatin ve cAMP'ye maruz kaldıktan sonra nasıl getirildiğinin incelenmesi üzerine odaklanmaktadır. Bu çalışmada, laboratuvar sıçanı olarak da bilinen Wistar tipi albino sıçandan elde edilen karaciğer dokuları model bir organizma olarak kullanılmıştır. CYP1A1 geninin ifade seviyesi, genlerin bir sitokrom P450 süper ailesinin bir üyesini kodlayan hücrelerde ve dokularda incelenmiştir. Normalleştirme için TATA kutusu bağlayıcı protein (TBP) temizlik geni tercih edildi. Bu çalışma, karşılaştırmalı toksikoloji vakaları için alternatif bir bakış açısı sağlamayı amaçlamaktadır ve aynı zamanda adli toksikoloji ile bağlantılı vakaların aydınlatılması için bir rehber niteliğinde olacaktır.

Anahtar Kelimeler: cAMP, gen ifadesi, sisplatin, sitokrom p450, wistar albino,

SUMMARY

Comparison of toxic and antitoxic effects of cisplatin and cAMP at the gene expression level in Wistar albino rat liver.

Throughout the course of cancer treatment, cisplatin has proven to be a successful chemotherapy agent. Several researches have been conducted both in vivo or in vitro on how gene expression changes occur. This study focuses on examining how CYP1A1 gene expression changes are brought after the exposure to cisplatin and cAMP. In this study, liver tissues from Wistar-type albino rat, also known as the laboratory rat was used as a model organism. Expression level of CYP1A1 gene was examined in cells and tissues which the gene encodes a member of the cytochrome P450 superfamily of enzymes. For normalization TATA box binding protein (TBP) housekeeping gene was preferred. This study aims to provide an alternative perspective for comparative toxicology cases and will also serve as a guide for elucidation of cases connected with forensic toxicology.

Key Words: cAMP, cisplatin, cytochrome p450, gene expression, wistar albino.

KAYNAKLAR

- ADAMS, D. J., SEILMAN, S., AMELIZAD, Z., OESCH, F., & WOLF, C. R. (1985). Identification of human cytochromes P-450 analogous to forms induced by phenobarbital and 3-methylcholanthrene in the rat. *Biochemical Journal*, **232**(3): 869-876.
- ALSHOHANI, A. R., HAFEZ, M. M., H, S., AL-SHEIKH, A. M., ALOTAIBI, M. R., ALREJAIE, S. S., & AL-SHABANAH, O. A. (2017). Protective effect of rutin supplementation against cisplatin-induced Nephrotoxicity in rats. *BMC Nephrology*, **18**(1): 194.
- BARABAS, K., MILNER, R., LURIE, D., & ADIN, C. (2008). Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Veterinary and comparative oncology*, **6**(1): 1-18.
- BATTAL, D., HILAL, A., DAGLIOGLU, K., UNAL, I., & GULMEN, M. K. (2013). Evaluation of paracetamol distribution and stability in case of acute intoxication in rats. *Human & experimental toxicology*, **32**(1):82-89.
- BLIZARD, D., SUEYOSHI, T., NEGISHI, M., DEHAL, S.S, & KUPFER, D. (2001). Mechanism of induction of cytochrome p450 enzymes by the proestrogenic endocrine disruptor pesticide-methoxychlor: interactions of methoxychlor metabolites with the constitutive androstane receptor system. *Drug Metabolism and Disposition* **29**:781–785.
- SEREZANI, C. H., BALLINGER, M. N., ARONOFF, D. M., & PETERS-GOLDEN, M.(2008). Cyclic AMP Master Regulator of Innate Immune Cell Function. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **39**(2): 127-132.

- CHIRINO, Y., PEDRAZA-CHAVERRI, J., (2009). Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **61**(3):223-242.
- CHOMSCZYNSKI, P., & MACKEY, K. (1995). Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, **19** (6): 942-945.
- CRANE, L. FREDRICK. (2001). Biochemical Functions of Coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition*, **20** (6): 591–598.
- DASARI, S., TCHOUNWOU, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal. Pharmacology*. **740**: 364–378.
- da CRUZ, J. R. G. (2013). Evaluating differential gene expression using RNA-sequencing data: a case study in host-pathogen interaction upon *Listeria monocytogenes* infection.
- de WILDT, S. N., KEARNS, G. L., LEEDER, J. S., & van den ANKER, J. N. (1999). Cytochrome P450 3A. *Clinical pharmacokinetics*, **37**(6): 485-505.
- DING, X., & KAMINSKY, L.S. (2003). Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **43**:149–173.
- JAMIESON, E. R., & LIPPARD, S. J (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chemical Reviews* **99** (9):2467-2498
- GAO, R., MATSUURA, T., COOLBAUGH, M., ZÜHLKE, C., NAKAMURA, K., RASMUSSEN, A., ... & LIN, X. (2008). Instability of expanded CAG/CAA repeats in spinocerebellar ataxia type 17. *European journal of human genetics*, **16**(2): 215.

- GUENGERICH, F.P. (2007). Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, **21**(1):70-83.
- GONZALEZ F.J (1989). The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacological Reviews* **40**:243–28
- GUNES, A., & DAHL, M. L. (2008). Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms.625-637
- HOFER A.M, LEFKIMMIATIS K. (2007). Extracellular calcium and cAMP: second messengers as “third messengers”? *Physiology*, **22**: 320–327.
- HOWLE, J. A., & GALE, G. R. (1970). cis-Dichlorodiammineplatinum (II): persistent and selective inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in vivo. *Biochemical pharmacology*, **19**(10): 2757-2762.
- HUANG, Q., DUNN, R. T., JAYADEV, S., DISORBO, O., PACK, F. D., FARR, S. B., & Blanchard, K. T. (2001). Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology. *Toxicological Sciences*, **63**(2):196-207.
- IANNACCONE, P. M., & JACOB, H. J. (2009). Rats!. *Disease models & mechanisms*, **2**(5-6), 206–210. doi:10.1242/dmm.002733
- KAERN, M., ELSTON, T. C., BLAKE, W. J., & COLLINS, J. J. (2005). Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nature Reviews Genetics*, **6**(6):451
- KLEINER, HARVEY S., ANN MILLER AND DAVID W. ALMANN. (1979). Effect of dietary fluoride on rat tissue 3'-5'-cyclic AMP levels. *J Dent Res*, **58**(9): 1920
- KOHN, S., PRATT, H., ROBINSON, E., NIR, I., FRADIS, M., PODOSHIN, L. and ZIDAN, J. (1988). Cisplatin ototoxicity in guinea pigs with special reference to toxic effects in the stria vascularis. *The Laryngoscope*, **98**: 865–871.

- MCKINNON R.A and McMANUS M.E (1996). Localization of cytochromes P450 in human tissues: implications for chemical toxicity. *Pathology*, **28**:148–155
- MCMANUS, M. E., STUPANS, I., IOANNONI, B., BURGESS, W., ROBSON, R. A., & BIRKETT, D. J. (1988). Identification and quantitation in human liver of cytochromes P-450 analogous to rabbit cytochromes P-450 forms 4 and 6. *Xenobiotica*, **18**(2): 207-216.
- MILLER, R. P., TADAGAVADI, R. K., RAMESH, G., & REEVES, W. B. (2010). Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins*, **2**(11): 2490-2518.
- MISHIMA, K., BABA, A., MATSUO, M., ITOH, Y., & OISHI, R. (2006). Protective effect of cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, **40**(9), 1564-1577.
- MOSENDEN R, TASKEN K. (2011) Cyclic AMP- mediated immune regulation - overview of mechanisms of action in T cells. *Cell Signal.*; **23**:1009 - 1016.
- NELSON, D. R., ZELDIN, D. C., HOFFMAN, S. M., MALTAIS, L. J., WAIN, H. M., & NEBERT, D. W. (2004). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics and genomics*, **14**(1): 1-18.
- RAO, X., HUANG, X., ZHOU, Z., & LIN, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, **3**(3): 71.
- SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R. W., & BROWN, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**(5235), 467-470.

- SCHWEIKL, H., TAYLOR, J. A., KITAREEWAN, S., LINKO, P., NAGORNEY, D., & GOLDSTEIN, J. A. (1993). Expression of CYP1A1 and CYP1A2 genes in human liver. *Pharmacogenetics*, **3**(5): 239-249.
- WRIGHTON, S. A., VANDENBRANDEN, M., and RING, B. J. (1996). The human drug metabolizing cytochromes P450. *J. Pharmacokinet. Biopharm.***24**: 461–473
- WRIGHTON, S. A., CAMPANILE, CHRIS, THOMAS, P. E., MAINES, S. L., WATKINS, P. B., PARKER, GEORGE, & LEVIN, WAYNE (1986). Identification of a human liver cytochrome P-450 homologous to the major isosafrole-inducible cytochrome P-450 in the rat. *Molecular pharmacology*, **29**(4): 405-410.
- YÜZBAŞIOĞLU, A. (2008) Dejenerasyon sürecindeki kas dokusunda housekeeping genlerin ekspresyon düzeyinin incelenmesi. (Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara).
- ZANGER, U. M., & SCHWAB, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics*, **138**(1):103-141.
- ZHOU, S. F., Liu, J. P., & CHOWBAY, B. (2009). Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug metabolism reviews*, **41**(2): 89-295.
- (<https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780128094686000279-f27-02-9780128094686.jpg>).Erişim tarihi: 30/02/2019
- <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQC9OS9E1kh26aP-TfUPi8eaPLwMt48VxZ9dXXS5rqyXjNxUCTQaQ>. Erişim tarihi:24/01/19
- <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRitlk0XGuv1mmACuAc1xWslGU-k-sBbq1dl0aQVUiVbXRhlQS8>) Erişim tarihi: 24/01/19
- THERMOFISHER SCİENTİFİC (2016) <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/global/forms/real-time-pcr-handbook-download-request-form.html>. Erişim tarihi: 24/12/18

EKLER

EK-1 Etik Kurul Onayı



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN ETİK KURULU
SAMSUN

Sayı : HEK/ 28
Konu : Araştırma projeniz hk.

01/06/2007

Prof.Dr. ZAFER EREN
Fen - Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

2007/20 numaralı "Cisplatin Verilmiş Ratlarda cAMP ve CoQ'nun Hasar Giderilmesindeki Roller ve Karaciğer Radikal Süpürücü Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması ." konu başlıklı Projeniz; Hayvan Etik Kurulu'nun 31.05.2007 tarihli toplantısında görüşülmüş, Hayvan Hakları ve Deney Etiği açılarından uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.

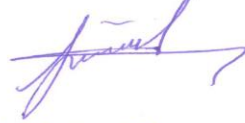
Araştırmanın yürütüldüğü süreç içinde etik kurallar ve hayvan haklarına uygunluk yönünden sorumluluk araştırmacılara ait olmak kaydıyla 6 aylık Rapor verilmesi şartıyla çalışmanıza başlamanız uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Muhlise ALVUR
Hayvan Etik Kurulu Başkanı

İlgili Makama;

01.06.2007 tarih ve HEK-28 sayılı
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu
raporlu tez konumdan daha sonra geliştirilmek
üzere uygun koşullarda saklanmış olan sıçan
karaçiper ve böbrek dokularının sayın
Prof. Dr. E. Sümer AKAS'ın danışmanlığında veya
proje yürütücülüğünde kullanılmasına izin verdiğimi
bilgilerinize sunarım.

29.11.2017



Dr. F. Gönül SOLMAZ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
GSM: 0530 170 9568
E-mail: gonul.solmaz@omu.edu.tr

EK-2. Bilimsel Çalışma İzni

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÖNETİM KURULU KARARI

Toplantı Sayısı : 42	Karar Sayısı: 2135	Toplantı Tarihi: 13.11.2017
----------------------	--------------------	-----------------------------

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 31.10.2017 tarih ve 11341 sayılı yazısı görüşüldü.

Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı Adli Biyoloji tezli yüksek lisans programı öğrencisi KumbiraiDeonMANDEBERE'nin, "*Vistar Albino Tipi rat Karaciğerinde Sisplatin ve cAMP'nin Toksik ve Antitoksik Etkenlerinin Gen İfadesi Düzeyinde Karşılaştırılması*" adlı tez projesinin "etik kurul kararı"nın eklenmesinden sonra değerlendirilmesine oybirliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR
Dilek BADEM
Enstitü Sekreteri

Enstitü Müdürü V.
Prof. Dr. Mehmet AKAN
İmza

Üye
Prof. Dr. Ayhan BAŞTAN
İmza

Enstitü Müdür Yardımcısı
Prof. Dr. Ayfer TEZEL
İmza

Üye
Prof. Dr. Pelin ÖZKAN
Katılmadı

Enstitü Müdür Yardımcısı
Doç. Dr. Yılmaz ARAL
İmza

Üye
Prof. Dr. Gülfem ERSÖZ
İmza

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı : Kumbirai Deon
Soyadı : Mandebere
Cinsiyet : Erkek
Uyruğu : Zimbabve
Medeni durumu : Bekar
Doğum yeri ve tarihi : Zimbabve, 21.05.1991
Telefon : +905530639709
E-mail : mandebere82@gmail.com

II. Eğitim Bilgiler

DERECE	BÖLÜM PROGRAM	OKUL/ÜNİVERSİTESİ	YIL
İlkokul	-	Chinhoyi Primary School	1997 – 2003
Lise	-	Nemakonde High School	2004 – 2009
Lisans	Psikoloji	University of Zimbabwe	2011 – 2014
	Türk dili (Türkçe)	Ankara Üniversitesi TÖMER	2015 – 2016
Yüksek Lisans	Disiplinlerarası Adli Bilimler	Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Ankara Üniversitesi	2016 – 2018
	Yüksek Lisans Tezi Başlığı ve Danışman		
Winstar albino tip rat karaciğerinde sisplatin ve cAMP'nın toksik ve antitoksik etkilerin gen ifadesi düzeyinde karıştırılması''			
Danışman: Prof. Dr. Emine Sümer ARAS			
	Lisans Tezi Başlığı ve Danışman		
Job involvement and organizational commitment among workers: A case study of Edgars Stores, Harare. Zimbabwe			
Danışman: Dr. M Matika (University of Zimbabwe)			

III. Dil Beceriler

DİL	Shona	Ndebele	İNGİLİZCE	TÜRKÇE
YAZMA	Mükemmel	Orta Düzey	Mükemmel	İyi
KONUŞMA	Mükemmel	Orta Düzey	Mükemmel	İyi

IV. Bilgisayar Beceriler

PROGRAM	DÜZEY
Ms Word	İleri Düzey
Ms Excel	İler Düzey
Ms PowerPoint	İleri Düzey
EndNote	Orta Düzey

V. Yayınlar

Kumbirai Deon Mandebere, F. Şeyma Gökdemir, Sümer ARAS (2019).

Comparison of toxic and antitoxic effects of cisplatin and cAMP, at C1A1 gene expression level of Wistar albino type rat liver. *International Journal of Life Sciences*. Vol.2, Issue. 2, pp: (102-105)

VI. Katıldığı eğitim seminerleri

22/10/ 2016: Kök Hücre Günü Toplantısı, Hacettepe Üniversitesi, Ankara-TURKEY.

27/10/ 2016: TÜBİTAK 5. Ulusal Açık Erişim Konferansı, Ankara-TURKEY.