



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞINDA
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES İLİŞKİLİ LİPİT
BİRİKİMİ VE HÜCRE ÖLÜMÜ**

TUĞÇE DEMİREL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer

İSTANBUL-2017



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NON-ALKOLİK YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞINDA
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES İLİŞKİLİ LİPİT
BİRİKİMİ VE HÜCRE ÖLÜMÜ**

TUĞÇE DEMİREL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer

İSTANBUL-2017

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Biyokimya (Tıp)
Tez Sahibi : Tuğçe DEMİREL
Tez Başlığı : Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığında Endoplazmik Retikulum
Stres İlişkili Lipit Birikimi ve Hücre Ölümü
Sınav Yeri : Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 15.06.17 Saat: 10:00

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)
Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER

Kurumu
M.Ü.

İmza



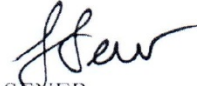
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)
Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER
Prof. Dr. Ahmet Süha YALÇIN
Yrd. Doç. Dr. Pınar MEGA TİBER

M.Ü.
M.Ü.
M.Ü.



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 15.06.2017 tarih ve 58 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



I. BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

29/05/17

Tuğçe Demirel

II. TEŞEKKÜR

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı 'nda yapmış olduğum bu çalışmanın seçilmesinde ve hazırlanmasında engin bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren, her zaman yakın ilgisini gördüğüm ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırından dolayı tez danışmanım, değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER** ' e,

Yüksek Lisans hayatım boyunca laboratuvar çalışmalarım ve derslerimde bilgi ve tecrübeleriyle bizi aydınlatan değerli hocalarım **Prof. Dr. Süha YALÇIN, Doç. Dr. Betül KARADEMİR, Yrd. Doç. Dr. Saime BATIREL, Prof. Dr. Goncagül HAKLAR** ve **Prof. Dr. Önder ŞİRİKÇİ** ' ye

Laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirdiğim süreç içerisinde bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan, yanımda olduklarını her zaman hissettiren ve desteklerini esirgemeyen **Uzm. Dr. Erdi SÖZEN, Uzm. Dr. Ali ŞAHİN, Uzm. Dr. Burak YAZGAN, Yard. Doç. Dr. Perinur BOZAYKUT, Uzm. Dr. Ayşe Mine YILMAZ, Esra ÖZALTIN** ve **Şenol YOLCU** ' ya

Tezimin hazırlanması sırasında ve laboratuvar çalışmalarımda beni cesaretlendiren ve manevi destek sağlayan, yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım, **Onur Rona YALÇINER, Gizem Damla YALÇIN, Tamer GÜMÜŞ** ve **Betül GÜNGÖRDÜ** ' e teşekkürü bir borç bilirim.

Bugüne kadar attığım her adımda beni destekleyen ve yanımda olan; beni bugünlere taşımak için her türlü fedakarlığı esirgemeyen canım babam Aydın ve annem Deniz başta olmak üzere tüm aileme en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'nın SAG-C-YLP-090517-0253 nolu projesi ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu' nun (TÜBİTAK)- 1001 SBAG-115S464 nolu projesi ile desteklenmiştir.

III. İÇİNDEKİLER

I.	BEYAN.....	i
II.	TEŞEKKÜR.....	ii
III.	İÇİNDEKİLER	iii
IV.	KISALTMALAR.....	v
V.	ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
VI.	RESİMLERİN LİSTESİ	viii
VII.	TABLO LİSTESİ.....	ix
1.	ÖZET	1
2.	SUMMARY	2
3.	GİRİŞ ve AMAÇ	3
4.	GENEL BİLGİLER	5
	4.1. Non-Alkolik Karaciğer Yağlanması	5
	4.1.1. Karaciğer yapısı ve özellikleri	5
	4.1.2. Non-alkolik karaciğer yağlanması epidemiyolojisi	7
	4.1.3. Non-alkolik karaciğer yağlanması patogenezi.....	8
	4.2. Endoplazmik Retikulum (ER) Stres.....	9
	4.2.1. ER stres ve katlanmamış protein cevabı	9
	4.2.2. ER stresin non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ile ilişkisi	12
	4.3. Apoptotik Hücre Ölümü.....	13
	4.3.1. Apoptotik hücre ölümünün moleküler mekanizması	13
	4.3.2. Apoptotik hücre ölümü ve ER stres ilişkisi	17
	4.3.3. Apoptozun non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ile ilişkisi	17
	4.4. Vitamin E	20
	4.4.1. Vitamin E'nin yapısı ve fonksiyonu	20
	4.4.2. Vitamin E'nin sinyal iletim mekanizmaları ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığındaki rolü.....	21
5.	GEREÇ ve YÖNTEM	22
	5.1. Kullanılan Gereçler	22
	5.1.1. Kullanılan kimyasallar	22
	5.1.2. Kullanılan cihazlar	23
	5.1.3. Çözeltiler.....	24

5.2. Yöntemler.....	26
5.2.1. Deney planı	26
5.2.2. Tavşanlar ile ilgili materyallerinin alınması ve saklanması.....	26
5.2.3. Kan tetkiklerinin prensipleri	27
5.2.3.1. Serum kolesterol düzeylerinin ölçülmesi.....	27
5.2.3.2. Serum α -tokoferol düzeylerinin ölçülmesi.....	28
5.2.4. Karaciğer dokusundan total protein izolasyonu.....	28
5.2.5. Protein konsantrasyonunun hesaplanması	28
5.2.6. SDS-PAGE jel elektroforezi ve immunblotlama.....	28
5.2.7. Karaciğer dokusundan RNA izolasyonu.....	29
5.2.8. Total RNA' dan komplementer DNA (cDNA) sentez edilmesi	29
5.2.9. cDNA örneklerinin GRP78, GRP94, IRE1, PERK primerleri için kantitatif real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile ekspresyon analizi	29
6. BULGULAR.....	31
6.1. Serum Kolesterol Düzeyleri.....	31
6.2. Serum Vitamin E Düzeyleri	32
6.3. Karaciğerlerin Makroskopik Görüntüleri.....	33
6.4. Karaciğer Dokusunda GRP78 Protein Ekspresyonu.....	33
6.5. Karaciğer Dokusunda GRP94 Protein Ekspresyonu.....	34
6.6. Karaciğer Dokusunda fosfo-IRE1 Protein Ekspresyonu	36
6.7. Karaciğer Dokusunda fosfo-PERK Protein Ekspresyonu.....	37
6.8. Karaciğer Dokusunda CHOP Protein Ekspresyonu.....	38
6.9. Karaciğer Dokusunda Bax Protein Ekspresyonu	38
6.10. Karaciğer Dokusunda Kaspaz 9 Protein Ekspresyonu.....	40
6.11. Karaciğer Dokusunda GRP78 mRNA Ekspresyonu.....	41
6.12. Karaciğer Dokusunda GRP94 mRNA Ekspresyonu.....	42
6.13. Karaciğer Dokusunda IRE1 mRNA Ekspresyonu	43
6.14. Karaciğer Dokusunda PERK mRNA Ekspresyonu	44
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	46
8. KAYNAKLAR	52
9. ETİK KURUL ONAYI.....	61
10. ÖZGEÇMİŞ	62

IV. KISALTMALAR

NAKYH	Non-alkolik Karaciğer Yağlanması Hastalığı
NASH	Non-alkolik steatohepatit
ER	Endoplazmik Retikulum
UPR	Katlanmış Protein Cevabı “Unfolded Protein Response”
HMGCoA	3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A “3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A”
SERCA	Sarko (endo) plazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz
IRE1	Inositol gerektiren enzim-1 “Inositol requiring enzyme-1”
PERK	Protein kinaz RNA-benzeri endoplazmik retikulum kinaz “Protein kinase RNA-like Endoplasmic reticulum kinase”
CHOP	CCAAT-bağlanma homolog protein “CCAAT binding homologous protein”
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein “Very Low Density Lipoprotein”
ERAD	Endoplazmik Retikulum İlişkili Protein Degradasyonu “Endoplasmic reticulum associated protein degradation”
GRP78	Glukoz regüle eden protein 78 “Glucose regulated protein 78”
ATF-6	Aktivasyon transkripsiyon faktör-6
XBP-1	X- box bağlanma proteini
JNK	c-jun N-terminal kinaz
TRAF2	Tümör nekroz faktör reseptör ilişkili faktör 2 “Tumor necrosis factor receptor associated factor 2”
eIF2	Ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 “Eukaryotic initiation factor 2”
PUMA	P53 upregüle apoptoz modülatör “P53 upregulated modulator of apoptosis”
ACAT	Açıl-CoA kolesterol açıl transferaz “Acyl-CoA cholesterol acyltransferase”
DISC	Ölüm tetikleyici sinyal “Death inducing signaling complex”
α -TTP	α -tokoferol transfer protein
VCAM	Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü “Vascular cell adhesion molecule”

V. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1: Karaciğer yapısı.

Şekil 4.2: NAYKH prevelansının yıllara göre dağılımı.

Şekil 4.3: NAYK hastalığının gelişimi.

Şekil 4.4: Endoplazmik retikulum stres moleküler mekanizması.

Şekil 4.5: Apoptotik hücre ölümü moleküler mekanizması.

Şekil 4.6: NAYKH' da apoptotik yolağın mekanizması.

Şekil 4.7: Vitamin E'nin doğal formları.

Şekil 6.1: Karaciğer dokusunda GRP78 protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü.

Şekil 6.2: Karaciğer dokusunda GRP94 protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü.

Şekil 6.3: Karaciğer dokusunda fosfo-IRE1 protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü.

Şekil 6.4: Karaciğer dokusunda fosfo-PERK protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü.

Şekil 6.5: Karaciğer dokusunda CHOP protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü.

Şekil 6.6: Karaciğer dokusunda Bax protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü.

Şekil 6.7: Karaciğer dokusunda kesilmiş/kesilmemiş kaspaz-9 protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü.

Şekil 6.8: Karaciğer dokusunda GRP78 gen ekspresyonun değerlendirilmesi.

Şekil 6.9: Karaciğer dokusunda GRP94 gen ekspresyonun değerlendirilmesi.

Şekil 6.10: Karaciğer dokusunda IRE1 gen ekspresyonun değerlendirilmesi.

Şekil 6.11: Karaciğer dokusunda PERK gen ekspresyonun değerlendirilmesi.

Şekil 7.1 : Yüksek kolesterolü diyet ile gelişen NAYKH' nın moleküler mekanizmasının modeli.



VI. RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 6.1: Her deney grubunu temsil eden bir tavşan karaciğeri makroskopik görüntüleri.



VII. TABLO LİSTESİ

Tablo 6.1: Tavşanların serum kolesterol düzeyleri.

Tablo 6.2: Tavşanların serum vitamin E düzeyleri.

Tablo 6.3: Yüksek Kolesterolü diyet ile oluşturulan NAYKH modelinde immunoblotlama ve qPCR sonuçlarının özeti.



Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığında Endoplazmik Retikulum Stres İlişkili Lipit Birikimi ve Hücre Ölümü

Öğrencinin Adı: Tuğçe Demirel

Danışmanı: Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı

1. ÖZET

Amaç: Yüksek kolesterolli diyet ile oluşturulan NAYKH’ da ER stresin lipit birikimi ve hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, 2-4 aylık 24 adet erkek albino tavşan 4 gruba ayrıldı: 1) Kontrol grubu; vitamin E den fakir yem ile beslendi. 2) Kolesterol grubu; %2 kolesterol içeren vitamin E’den fakir yem ile beslendi. 3) Kolesterol + vitamin E grubu; vitamin E den fakir yem ile beslendi ve vitamin E i.m. olarak 50 mg/kg/gün uygulandı. 4) Vitamin E grubu; vitamin E i.m. olarak 50 mg/kg/gün uygulandı. Sekiz hafta sonunda, tavşanlardan kan örnekleri ve karaciğer dokuları alındı. Karaciğer dokuları makroskopik olarak incelendi ve fosfo-IRE1, fosfo-PERK, Grp94, Grp78, Bax, Kaspaz 9 protein düzeyleri immunblotlama tekniği, IRE1, PERK, Grp94, Grp78 mRNA ekspresyonları qPCR tekniği ile belirlendi.

Bulgular: Kolesterol ile beslenen tavşanların karaciğer dokularında lipit birikimi ve nodüler yapılar gözlenirken, vitamin E verilen tavşanlarda lipit birikiminin azaldığı gözlemlendi. Karaciğer dokusunda fosfo IRE1, GRP94, GRP78 CHOP, Bax protein ekspresyonlarının kolesterol grubunda kontrollere göre arttığı bulundu. Vitamin E grubunda kontrol grubuna göre GRP78, IRE1 ve PERK mRNA düzeylerinde artma görülürken GRP94 mRNA düzeyinin vitamin E verilmesiyle anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi

Sonuçlar: Çalışmamız, kolesterolden zengin diyetin ER stres ve ilişkili apoptotik yolak aracılığıyla NAYKH gelişimini tetikleyebileceğini ve vitamin E’ nin bu mekanizmalar üzerinden koruma etkisi olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: ER stres, apoptoz, yüksek kolesterol, non-alkolik yağlı karaciğer

Role of ER Stress on Lipid Accumulation and Cell Death in Hypercholesterolemia Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease.

Student Name: Tuğçe Demirel

Supervisor: Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer

Department: Medical Biochemistry

2. SUMMARY

Aim: The aim of this study is to clarify the effects of ER stress, that is induced by high cholesterol diet, on lipid accumulation and apoptotic cell death mechanism.

Methods: Twenty-four male albino rabbits were assigned randomly to four groups: 1) Control group; vitamin E deficient diet, 2) Cholesterol group; vitamin E deficient diet containing 2% cholesterol 3) Cholesterol+Vitamin E group; vitamin E deficient diet containing 2% cholesterol with daily intramuscular injections of vitamin E (50 mg/kg) and 4) Vitamin E group; vitamin E deficient diet with daily intramuscular injections of vitamin E (50 mg/kg). After eight weeks, blood samples and liver tissues were collected. The consequences of hypercholesterolemic diet and vitamin E effect in liver tissues were examined by macroscopically and further determined by immunoblotting (phospho-PERK, phospho-IRE1, Grp94, Grp78, Bax, and Caspase 9 protein levels) and by qPCR methods (PERK, IRE1, Grp94, Grp78 mRNA levels).

Results: While cholesterol fed rabbits exhibited increased lipid accumulation and nodular structures compared to control, vitamin E supplementation with high cholesterol diet showed its effect by decrease this accumulation in liver. Additionally, protein expressions of well known ER stress and apoptosis markers (phospho IRE1, Grp94, Bax and CHOP) were found to induce in cholesterol group. Additionally, GRP78, IRE1 and PERK mRNA expressions were observed as increased in vitamin E group compared to control group.

Conclusion: Our results demonstrated that cholesterol-rich diet may induce NAFLD development, through the activation of ER stress and apoptosis, and vitamin E supplementation showed its protective effect.

Keywords: ER stress, apoptosis, high cholesterol, non-alcoholic fatty liver

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH), karaciğerde lipit birikimiyle karakterize edilen, fibrozis ve siroza neden olan son 20 yılda önemi giderek artan toplumda sık rastlanan bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda toplumun %25' nin NAYKH' na yakalandığı, bu hastaların %90' nının obez bireylerden oluştuğu, (Milic ve Stimac, 2012) ve buna bağlı olarak yüksek yağlı diyetle beslenmenin NAYKH' na neden olabileceği gösterilmiştir. NAYKH'nın iki histolojik tipi mevcuttur: i) inflamasyon ve fibrozisin görülmediği, yalnızca lipit birikimini takiben gerçekleşen yağlı karaciğer, ii) steatoz ile birlikte nekrotik ve inflamatuvar aktivitenin görüldüğü Non-alkolik steatohepatittir (NASH) (Nonomuro, 1992).

Obezite, insülin direnci, diyabet, hiperkolesterolemi NAYKH' na neden olan önemli risk faktörlerindendir. Hiperkolesterolemi ise risk faktörlerinin arasından en sık rastlanılanıdır (Pessayre, 2007). NAYKH' da lipoprotein metabolizmasının bozulduğu dolayısıyla da kolesterol metabolizmasının etkilendiği gösterilmiştir. Yüksek kolesterolli diyet ile oluşturulan hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda kolesterol sentezini düzenleyen 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMGCoAR) gen ekspresyonunun ve enziminin aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Timothy ve ark., 2016). Bu nedenle hastalık patogeneğinde lipit birikimini düzenleyen mekanizmaları anlamak son derece önemlidir.

Serbest yağ asitlerinin, diaçilgliseritlerin, fosfolipitlerin ve serbest kolesterolün yüksek konsantrasyonlarda olması karaciğerde toksik etkiye ve endoplazmik retikulum (ER) stres gibi çeşitli hücrel stres yollarının aktive olmasına sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda katlanmamış protein cevabının (UPR) lipogenez düzenlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2010).

ER fonksiyonel bakımından yüksek miktarda kalsiyum iyonuna ihtiyaç duymaktadır. Bu ihtiyaç sarco (endo) plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) tarafından kontrol edilmektedir. Serbest kolesterolün birikmesi ER membranında bulunan serbest kolesterol/fosfolipit oranını değiştirmektedir. Bu değişikliğe karşılık

olarak ER’ deki kalsiyum iyon konsantrasyonunun düşmesi ER stres aktivasyonu ile sonuçlanır (Egnatchik ve ark., 2014).

ER stres yanıtı, hepatositlerde ER’ nin fazla sayıda bulunmasından dolayı NAYKH patogeneğinde önemli bir role sahiptir. Proteazomal sistem ve UPR’ un yetersiz kaldığı aşırı stres durumunda apoptoz veya otofaji gibi hücre ölüm mekanizmaları devreye girmektedir (Tran ve ark., 1997). Hepatositler üzerinde yapılan çalışmalar apoptoz ile NASH şiddeti arasında pozitif bir ilişki olduğunu ve bu süreçte Inositol gerektiren enzim-1(IRE1), Protein kinaz RNA- benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK) aracılı CCAT- bağlanma protein homolog protein (CHOP) ve Bax/Bak aktivasyonun rol aldığını göstermiştir (Favaloro ve ark., 2012, Xiao ve ark., 2013).

Vitamin E nin sinyal ileti yolları ve gen regülasyonu üzerindeki etkisi yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Özer NK ve beraberindekiler tarafından daha önce yapılan çalışmalarda yüksek kolesterolü diyet ile beslenen tavşanlarda aterosklerotik lezyon ve CD36 mRNA ekspresyonunda artış bununla birlikte vitamin E uygulanan hayvanlarda CD36 ekspresyonunun artışının önlendiği gösterilmiştir (Ozer ve ark., 2006). Bir diğer yapılan hayvan deneyinde ise yüksek yağlı diyetle beslenen domuzların karaciğerinde vitamin E uygulanmasıyla birlikte CD36 ekspresyonun ve lipid birikiminin azaldığı gösterilmiştir (Park ve ark., 2009).

Bütün bu bilgiler ışığında amacımız tavşan karaciğer dokusunda yüksek kolesterolü diyet ile indüklenen ER stres yolağının, NAYKH patogeneğinde rol olan apoptoz ile ilişkili mekanizmalar üzerinde etkisini ve bu mekanizmalar üzerinde Vitamin E’ nin rolünü belirlemektir.

4. GENEL BİLGİLER

NAYKH, karaciğer ağırlığının %5'den fazlasının lipitlerin oluşturulmasıyla karakterize edilen, kronik alkol kullanımı ve viral enfeksiyon, herhangi bir karaciğer hastalığının olmadığı durumlarda ortaya çıkan bir hastalıktır. Hepatik steatozis hastalığın erken fazıdır ve hepatosit sitoplazmalarındaki lipit dropletler içerisinde trigliseritlerin birikmesiyle karakterize edilmektedir. Hepatik trigliseritlerin, diyetle alınanlar, de novo lipit sentezi ve adipoz doku olmak üzere üç farklı kaynağı mevcuttur (Phung ve ark., 2009).

Hepatik lipit birikiminin artmasıyla hücrel stres ve inflamasyonun indüklenmesi ile NASH, siroz ve fibrozis oluşumu gözlenmektedir. İnsülin direnci, obezite, hiperkolesterolemi ve diyabet hastalığının risk faktörleri arasında bulunmaktadır (Alberti ve ark., 2009). Günümüzde obezitenin artmasıyla birlikte NAYKH önemli sağlık problemi haline gelmeye başlamıştır.

4.1. Non-Alkolik Karaciğer Yağlanması

4.1.1. Karaciğer yapısı ve özellikleri

Dıştan gilson kapsülü ile sarılmış, dört lobu olan karaciğer vücudun en büyük hem endokrin hem de ekzokrin salgı bezi ve organıdır. Karaciğerin vücudumuzda. safra üretimi, lipit, karbonhidrat metabolizması ve protein metabolizması, detoksifikasyon fonksiyonu, demir metabolizmasında, kan plazma proteinlerinin yapımında, kan pıhtılaşması için gerekli faktörlerin sentezi gibi birçok önemli görevi mevcuttur (Angulo ve ark., 2002).

Büyük oranda abdominal boşluğun üst sağ kısmına yerleşmiş şekilde bulunur. Karaciğere kan, portal ven ve arteria hepatica olmak üzere iki damardan gelmektedir. Bu iki damar da karaciğere portal hepatis' den girer. Portal ven karaciğerin fonksiyonel damarıdır. Sindirim sistemi, dalak, pankreastan toplanan besleyici maddelerle zengin, oksijence fakir kanı karaciğere getirir. Arteria hepatica, karaciğerin besleyici damarıdır ve oksijence zengin kanı getirir (Angulo ve ark., 2005).

Karaciğeri dıştan saran *gilsson* kapsülü tek katlı mezotelial hücreler ve altında kollajen, elastik lifler, bağ doku hücrlerini içeren sıkı bağ dokusu yapısındadır. Şekil 4.1 görüldüğü gibi *gilsson* kapsülü lobcuklar arasındaki bağ dokusunu da kapsar. Her lobcuğun merkezinde bir vena bulunur. Vena, karaciğer sinuzoidlerine uzanır. Sinuzoidler arasını ise hepatositler doldurur. Çok yüzlü olan hepatositler, 20-30 mikron çapında ve karaciğerde bulunan tüm hücrelerin yaklaşık %80'ni oluşturur. Her hepatositin 6 veya daha fazla yüzü vardır. Bu yüzler temas ettiği veya baktığı yöne göre; Disse aralığına bakan yüz, safra kanalcıkları oluşumuna katılan yüz, diğer hepatosite veya portal alana bakan yüz diye isimlendirilebilir. Hepatosit'in sinuzoidal aralığa bakan yüzünde çok sayıda düzensiz şekil ve büyüklükte mikrovilluslar bulunur. Böylece hücrelerin kanla temas yüzü yaklaşık altı kat artırılarak absorbsiyon ve sekresyon için geniş bir yüzey oluşturulur.

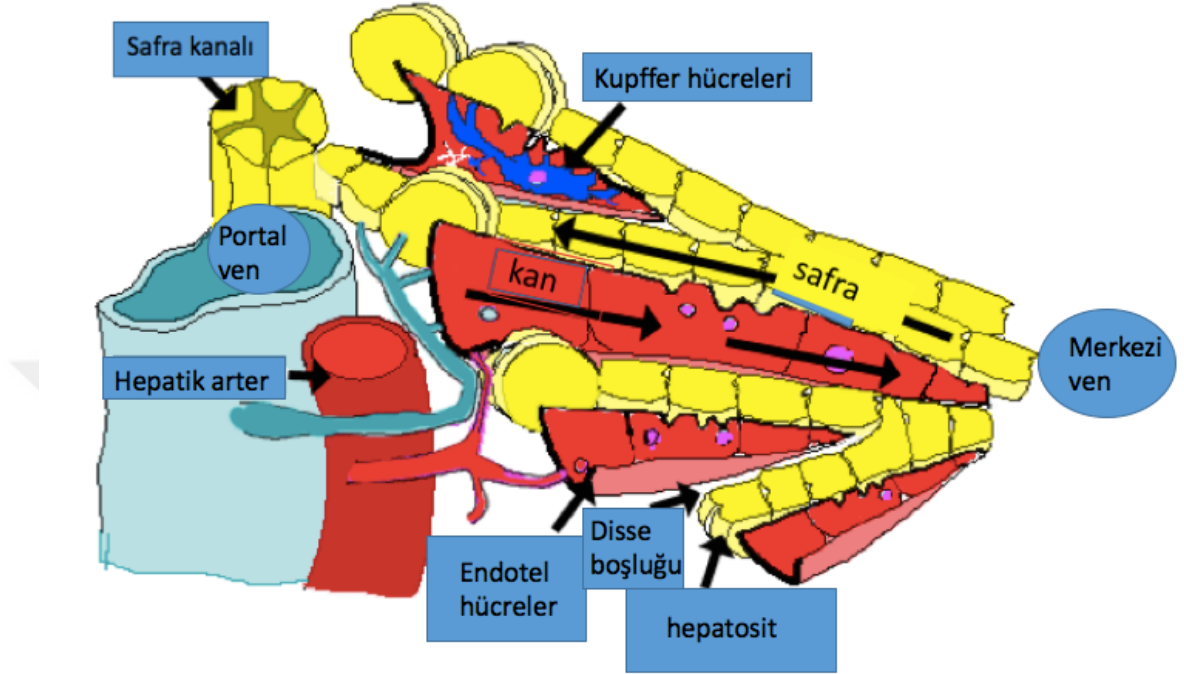
Hepatositler büyük, yuvarlak ve merkezi nukleuslara sahiptir. Bazen çift çekirdekli olabilir. Normalde düşük mitotik aktivitelidir. Yaşla birlikte çift çekirdek sayısı artar, bazı hücreler çok çekirdekli olabilir, bazen de poliplodi gözlenir (Assy ve ark., 2000).

Hepatosit sitoplazması hem düz hem de granüllü ER'dan zengindir. Bunların hücre içindeki miktarları hücrenin lobul içindeki konumuna ve fizyolojik durumuna bağlı olarak değişebilir. Bir lobcukta; merkezi bölgedeki hücrelerde granülsüz ve granüllü tip eşittir, orta bölgede granüllü tip fazla granülsüz tip azdır, periferel bölgede granüllü tip çok fazla düz tip ise çok azdır (Bieghs ve ark., 2010).

Vena porta yoluyla karaciğere gelen yağ asitleri (kompleks lipidler olan şilomikronlar lenf yoluyla taşınır) sinuzoidlerden Disse aralığına, oradan da pinositozla hepatosit içine alındıktan sonra granülsüz ER içinde esterleştirilerek trigliseridlere dönüştürölür ve lipoprotein metabolizması ile kan veya lenf yoluyla yağ dokularına taşınarak orada depo edilirler.

Hücre membranının ana elemanı olan ve diğer birçok steroidin prekürsörü olan kolesterol biyosenteziyle ilgili enzimler de granülsüz ER da bulunur. Kolesterol ayrıca, karaciğerde granüllü ve granülsüz ER – Golgi aygıtı işbirliğiyle sentezlenen çok küçük yoğunluklu lipoproteinlerin (VLDL) de bir elemanıdır. Karaciğer sinuzoidlerinin duvarında endotel hücreleri ve Kupffer hücreleri olmak üzere iki tür

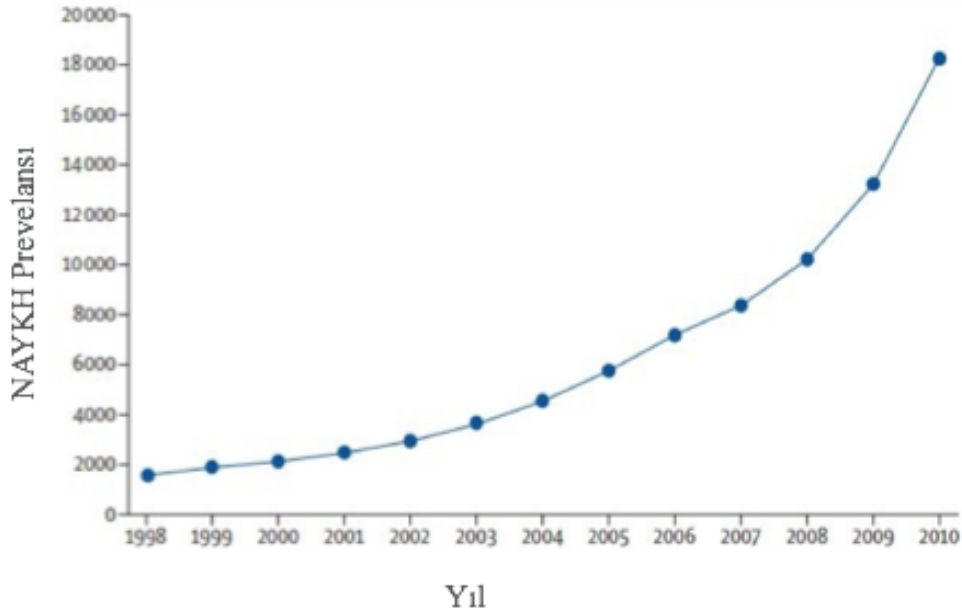
hücre bulunur. Kupffer hücreleri kuvvetli fagositoz yaparlar. Karaciğer hücrelerinin %15'ni oluşturan bu hücreler, lizozom ve diğer organeller bakımından daha zengindir. Endotel hücreler ise tek katlı yassı sitoplazma ve organelleri az olan hücrelerdir.



Şekil 4.1: Karaciğer yapısı (http://histology.leeds.ac.uk/digestive/liver_hepatocyte.php, Erişim tarihi: 11 Mayıs 2017)

4.1.2. Non-alkolik karaciğer yağlanması epidemiyolojisi

NAYKH dünya çapında obezite ve tip 2 diyabetin artmasıyla birlikte şekil 4.2' deki grafikte gösterildiği gibi hastalığın görülme sıklığı giderek yayılmaktadır. 2010 yılında yapılan bir çalışmada batı ülkelerinin genel popülasyonunun %20-30' unda, asya ülkelerinin genel popülasyonunun ise %15' inde hastalığın görüldüğü saptanmıştır (Bellentani ve ark., 2004). Obez hastalarda prevalansı %30-100, tip 2 diyabet hastalarında %10-75 dir. Hiperlipidemi hastalarında bu oran %20-92 dir. Amerika' da yapılan bir çalışmada ise erkeklerde görülme olasılığının kadınlara göre daha fazla olduğu bulunmuştur (Clark ve ark., 2003). Çocuklarda ise %3-10 iken obez çocuklarda bu oran %30-40' lara çıkmaktadır. Biyoptik ve otopsik çalışmalara göre yağlı karaciğerin %3-15 'inde NAYKH gelişimi görülürken, %1-7' sinde NASH gelişimi gözlenmektedir (Nonomuro ve ark., 1992)

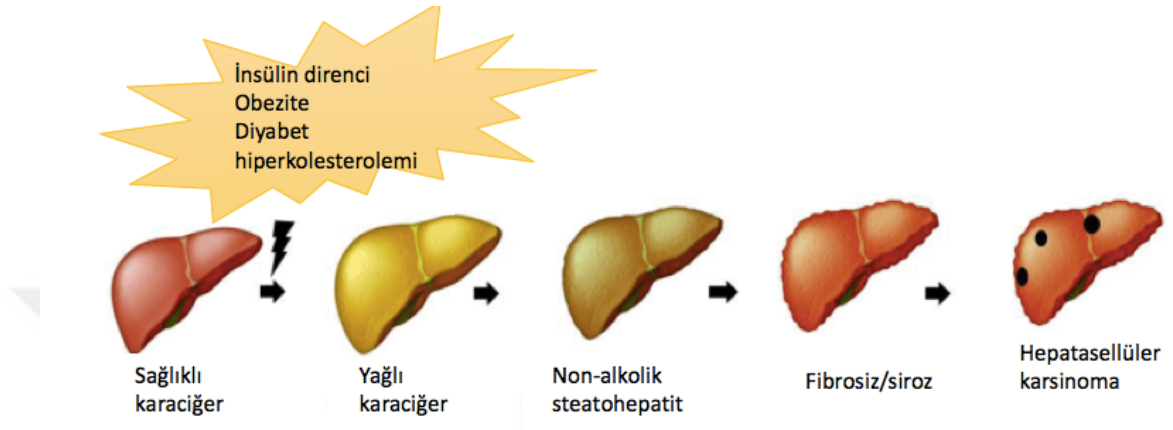


Şekil 4.2: NAYKH prevelansının yıllara göre dağılımı (Vernon ve ark., 2011).

4.1.3. Non-alkolik karaciğer yağlanması patogenezi

Yüksek yağlı diyetle beslenmenin; VLDL aracılı trigliserit taşınması ve serbest yağ asidi β - oksidasyonunun azalması ile birlikte de novo lipogenezin artması aracılığıyla yağlı karaciğer oluşumunu tetiklediği bilinmektedir (Tiniakos ve ark., 2010). NAYKH' nın patogenezi 1998 yılında Day ve James tarafından oluşturulan iki vuruş (two hit) hipotezi üzerine kurulmuştur . Şekil 4.3' te gösterildiği gibi ilk vuruş hepatik trigliserit birikimiyle steatozis oluşmasını içerirken artan karaciğer hasarıyla, inflamasyonun, mitokondriyel disfonksiyon ve oksidatif stres aktivasyonu ile ikinci vuruş oluşmakta ve bunun sonucunda steatohepatit veya fibrozis görülmektedir. Karaciğerde serbest yağ asitlerinin artması karaciğer hasarına neden olduğu bilinmekte ve bu iki vuruş hipotezinin modifikasyonuna yol açmaktadır. Obezite ve insülin direnciyle birlikte karaciğere serbest yağ asitlerinin akışı artmaktadır. NAYKH' da hepatositlerde biriken yağ asitlerinin %60' ı adipoz dokudan, %25' i de novo lipogenez' den, %15'i ise diyet ile gelmektedir (Adinolfi ve ark., 2011). Karaciğerde bu serbest yağ asitleri β -oksidasyona uğrar veya gliserol ile esterleşme sonucu trigliseritleri oluşturarak hepatik yağ birikimine neden olur (Gartner ve ark., 2006). Bu birikim hepatik lipotoksisite, ER stres, oksidatif stres ve inflamasyon aktivasyonuna

neden olmaktadır (Cohen ve ark., 2011) ve hepatik fonksiyonun bozulmasıyla karaciğer hasarı meydana gelmektedir. Hasar sonucu stellat hücrelerinin, sekrete kollajenlerin ve diğer matriks proteinlerinin artmasıyla fibrozis oluşmaktadır (Donnelly ve ark., 2005). Kupffer hücrelerinden salgılanan sitokinler ise apoptoz gibi hücre ölüm mekanizmalarının aktive olmasını sağlamaktadır (Malhi ve ark., 2006).



Şekil4.3: NAYK hastalığının gelişimi.

4.2. Endoplazmik Retikulum (ER) Stres

4.2.1. ER stres ve katlanmamış protein cevabı

ER, proteinlerin katlanması ve post translasyonel modifikasyonları, kolesterol sentezi, membran lipidlerinin biyosentezi ve kalsiyum depolanmasını kontrol eden önemli bir organeldir. ER lümeninde yeni sentezlenen proteinler N-glikolizasyon, disülfid bağ formasyonu, oligomerizasyon gibi post transyoneel modifikasyonlara uğramaktadır. Glukoz regüle eden protein 78 (GRP78) ve Glukoz regüle eden protein 94 (GRP94) protein katlanmasında ve hasarlı proteinlerin yıkımında rol alan en iyi karakterize edilmiş ER şaperonlarıdır.

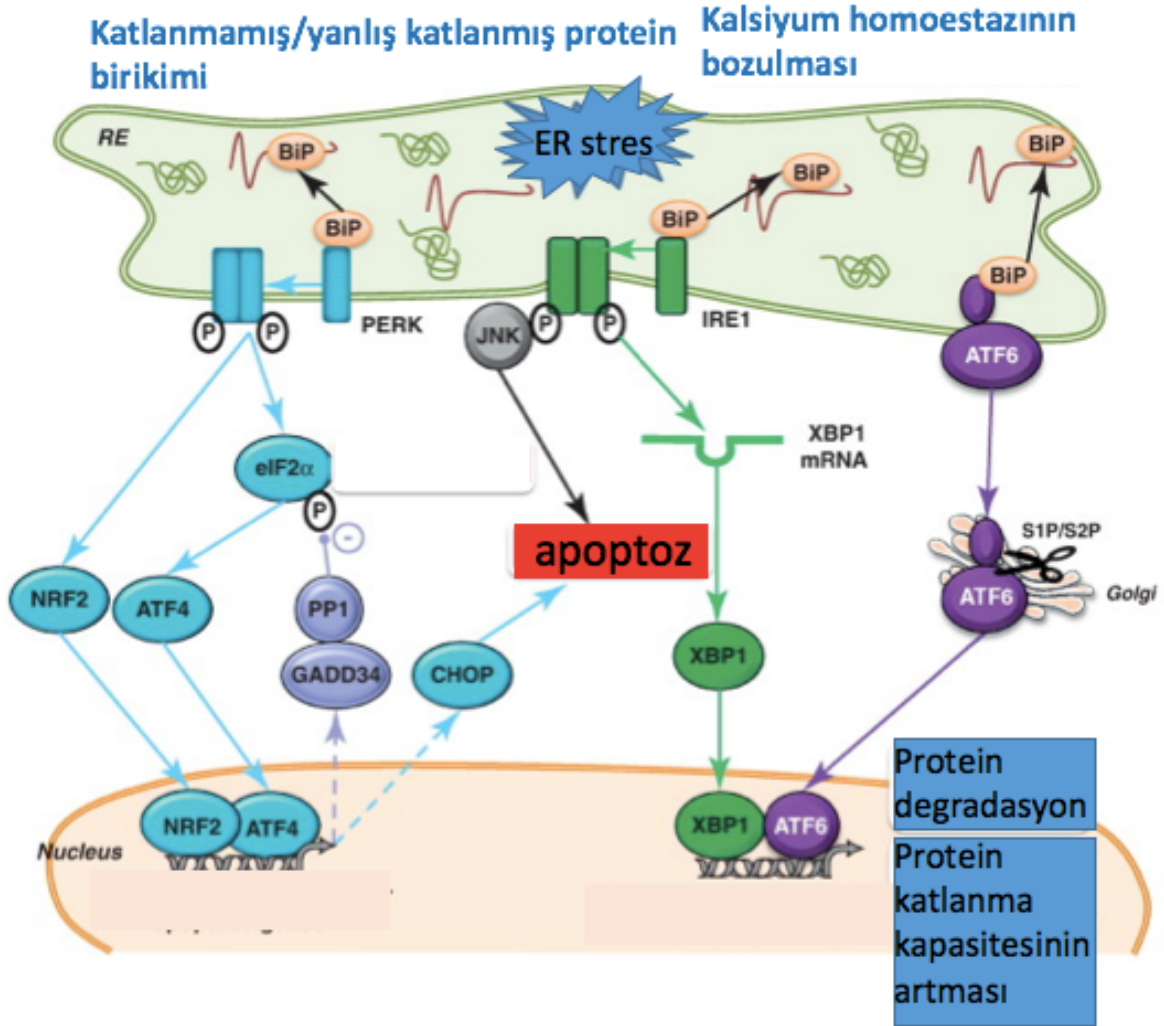
Aşırı protein sentezi, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, ER kalsiyum konsantrasyonunun düşmesi, redoks potansiyelinin değişmesi ve oksidatif stres indüklenmesi gibi patolojik veya fizyolojik bir durum oluştuğunda ER stres meydana gelmektedir. Artan ER strese takiben şekil 4.4' te gösterildiği üzere UPR aktivasyonu ve şaperon yapımını indükleyerek, ER içerisinde protein katlanma kapasitesini arttırmaktadır. UPR mekanizması üç ana protein tarafından kontrol edilmektedir.

Bunlar; “İnositol gerektiren enzim-1” (IRE-1), “Protein kinaz RNA-benzeri endoplazmik retikulum kinaz” (PERK) ve “Aktivasyon transkripsiyon faktör-6” (ATF6) dır. Normal koşullar altında bu üç ER transmembran reseptör proteini GRP78 ile bağlı olarak inaktif durumda bulunurlar. Stres koşullarında yanlış katlanmış/ katlanmamış proteinlerin birikmesiyle IRE1, PERK ve ATF6’ dan GRP78 proteini, ayrılarak aktif hale geçmektedirler. Bu şekilde stres düzenleyici yollar devreye girer. Aktivasyon sonucu her bir stres sensörü farklı mekanizmalar üzerinden transkripsiyon faktörlerini ve sinyal iletim mekanizmalarını aktifleştirir (Schroder ve Kaufman, 2005 ; Ma ve ark., 2002).

IRE-1 α and β izoformları olan ER’de bulunan bir stres sensörüdür. IRE-1 α bütün hücrelerde eksprese edilirken, β izoformu sadece bağırsak epitel hücresinde eksprese edilmektedir (Handford ve ark., 2010). IRE-1 otofosforilasyonun ardından endoribonükleaz ve serin triyonin kinaz domaini aktive olmaktadır. Bu aktivasyonun regülasyonundan GRP78 sorumludur. Endoribonükleaz domaini sitoplazmadaki X-box bağlanma proteini (XBP-1) adı verilen bir transkripsiyon faktörünün mRNA’sını kesime uğratarak yaklaşık 26 nükleotitlik bir intron parçası oluşturmaktadır. Bu kesim sonucu oluşan XBP-1 ise çekirdeğe geçerek ER stres cevap elementine bağlanarak ERAD ve şaperon ilişkili genlerin transkripsiyonunu sağlar. Endoribonükleaz domaini ise diğer ER hedef mRNA’ların ve yeni protein yapımından sorumlu 28S ribozomal alt ünitenin kesilmesini sağlar. Bunlara ek olarak bu domain c-Jun N-terminal kinaz (JNK) yolağını stimüle eden tümör nekroz faktör reseptör ilişkili faktör 2 (TRAF2) ile bağlantı kurarak sitokrom c salınmasıyla mitokondri ilişkili apoptozu aktive eder (Urano ve ark., 2000).

PERK, ER lümeninde bulunan ve sitozolik protein kinaz domainine sahip tipl1transmembran sensör proteinidir. ER de katlanmamış proteinlerin birikmesi PERK’in GRP78’ den ayrılmasını neden olur ve aktivasyonu dimerilizasyon ve takiben kinaz domainin otofosforilasyonları ile sonuçlanır. Aktive olan PERK, kinaz bölgesi ile ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 (eIF2)’ inin fosforlanmasını sağlayarak protein sentezinde bir azalma meydana gelmesini sağlar ve ER’nin iş yükünde bir hafifleme oluşturur. Başka bir taraftan, eIF2 fosforlanması sonucu bir transkripsiyon faktörü olan ATF4’ün aktivasyonu gerçekleşmektedir. ATF4

aktivasyonu, pro-apoptotik bir transkripsiyon faktörü olan “C/EBP homolog proteini” (CHOP)’u indükleyerek stres altındaki hücreyi apoptoza yönlendirmektedir. ATF-6 farklı bir aktivasyon mekanizmasına sahiptir. ATF-6 aktivasyonu sonucu ER’ den golgi aygıtına taşınarak, burada kesime uğramaktadır. Daha sonra sitoplazmaya salınarak UPR hedef genlerinin anlatımını arttırmaktadır (Ellgaard ve ark., 2003).



Şekil 4.4: ER stres moleküler mekanizması (Rutkowski ve ark., 2008).

4.2.2. ER stresin non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ile ilişkisi

Son zamanlarda endoplazmik retikulum stres cevabının hem steatozis gelişiminde hem de NASH progresyonunda önemli bir rol oynadığı söylenmektedir. Hepatositler ER organeli bakımından zengin hücrelerdir (Malhi ve Kaufman, 2011). NAYKH gibi kronik hastalıklarda, UPR aracılı tamir mekanizmalarının başarılı olamaması sonucunda, apoptoz gibi hücre ölüm mekanizmaları devreye girmektedir. Hepatik steatozisde, IRE1- α ve ATF-6' nın genetik eksikliğinin olduğu ER stresin indüklendiği bulunmuştur. Bu steatozis modelinde lipoprotein sekresyonun ve okside yağ asidi kapasitesinin bozulduğu bulunmuştur. Böylece UPR'nin lipid homeostazının sağlanmasında görevi olduğu belirlenmiştir (Rutkowski ve ark., 2008).

İnsülin aktivasyonu, oksidatif stres, sitokin aracılı inflammatuar cevap, bakteriyel endotoksin ve aşırı yağ asidi gibi birçok faktör NAYKH progresyonuna neden olmaktadır. UPR cevabının bu faktörler ile ilişkisi NASH ve ileri karaciğer hastalıklarının gelişmesine neden olabilir. Obezite ve insülin direnci hastalığının patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda obezite ile indüklenmiş ER stres, IRE1 aracılı JNK aktivasyonuna neden olarak karaciğer hasarı ve hepatosit apoptozu ile sonuçlandığı bulunmuştur (Hirosumi ve ark., 2002, Hotamisligil ve ark., 2003, Urano ve ark., 2000).

Hayvan ve insan çalışmalarında yüksek kolesterolün etkisiyle NAYKH ve NASH' in olduğu ve ER stresin indüklendiği gösterilmiştir (Ron ve Walter, 2007). İnsanlarda yapılan bir çalışmada, steatohepatit hastalarının karaciğer örnekleri karşılaştırıldığında ER stres belirteci olan eIF2 α ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Lindholm ve ark., 2006). Başka bir çalışmada ise UPR belirteçleri olan GRP78, ATF6, PERK proteinleri vücut ağırlık indeksi ile bağdaştırılmıştır (Meusser ve ark., 2005).

Stres koşullarında yanlış katlanmış proteinlerin birikimi ER stresin aktivasyonunu takiben UPR yanıtını tetiklemektedir. UPR yanıtı yukarıda da bahsedildiği üzere PERK, IRE1, ATF6 proteinleri tarafından oluşturulmaktadır. Bu proteinler ER stresini regüle eden genlerin transkripsiyonunu sağlayarak ER homeostazının düzelmesini sağlamaktadır (Ozcan ve ark., 2004). UPR yanıtının yetersiz kaldığı durumlarda ise hücre ölüm mekanizmalarından olan apoptoz veya otofaji devreye girmektedir (Sozen ve Ozer, 2017).

NAYKH gibi birçok hepatik hastalıklarda UPR, hastalığın patogenezinde önemli bir basamaktır (Ozcan ve ark., 2004). Yapılan çalışmalarda PERK tarafından fosforillenen eIF-2 α ekspresyonunun karaciğerde arttığı gösterilmiştir (Ma ve ark., 2002). Bir başka çalışmada PERK-eIF2 α -ATF4 yolağının lipogenez ve hepatik steatozisi regüle ettiği bulunmuştur. PERK gen delesyonunun yağ asidi sentaz (FAS), ATP-sitrat liyaz ve sterol-CoA desatüراز-1(SCD-1) lipojenik enzimleri inhibe ettiği gösterilmiştir (Bobrovnikova ve ark., 2008).

NAYKH karaciğerde lipit birikimi ile karakterize edilmektedir. Yüksek konsantrasyonda serbest yağ asidi, diaçilgliserol, fosfolipit ve serbest kolesterol bulunması ER stresi aktive etmektedir. ER fonksiyonu bakımından yüksek konsantrasyonda Ca⁺² iyonuna ihtiyaç duymaktadır. ER içi Ca⁺² iyonu SERCA tarafından kontrol edilmektedir. SERCA, ER membranında bulunan kolesterol içeriğine karşı hassasiyet göstermektedir. NAKYH patogenezi ile ilişkili serbest kolesterolün artması SERCA' nın kontrol mekanizmasını etkileyerek ER içindeki Ca⁺² iyon konsantrasyonunu azaltır ve ER homeostazının bozulmasıyla stres koşullarını oluşturur (Egnatchik ve ark., 2014). Serbest kolesterolün artması SERCA inhibisyonu dışında direkt olarak ta ER stresi indükleyebilmektedir. Yapılan çalışmalara göre ER stresin lipogenezi aktivasyonu ve VLDL inhibisyonu üzerinden hepatik lipit metabolizmasına etki ederek NAYKH' nın gelişmesi ve ilerlemesinde rol aldığı gösterilmiştir (Bozaykut ve ark., 2016).

4.3. Apoptotik Hücre Ölümü

4.3.1. Apoptotik hücre ölümünün moleküler mekanizması

Yunanca'da apo ayrı, ptoziz düşen anlamına gelir ve sonbaharda yaprak dökülmesi anlamında kullanılır. Bu terim Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında canlı dokularda hücre ölümünden sorumlu olan özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (Kerr ve ark., 1972). Apoptoz hücrenin kendi kendisini programlı bir şekilde yok ettiği, enerji gerektiren, regülasyonunda bir çok genin rol aldığı homeostazi dengeleyen, inflamasyonun meydana gelmediği bir hücre ölümü çeşididir. Apoptoz hem patolojik hemde fizyolojik şartlarda görülmektedir.

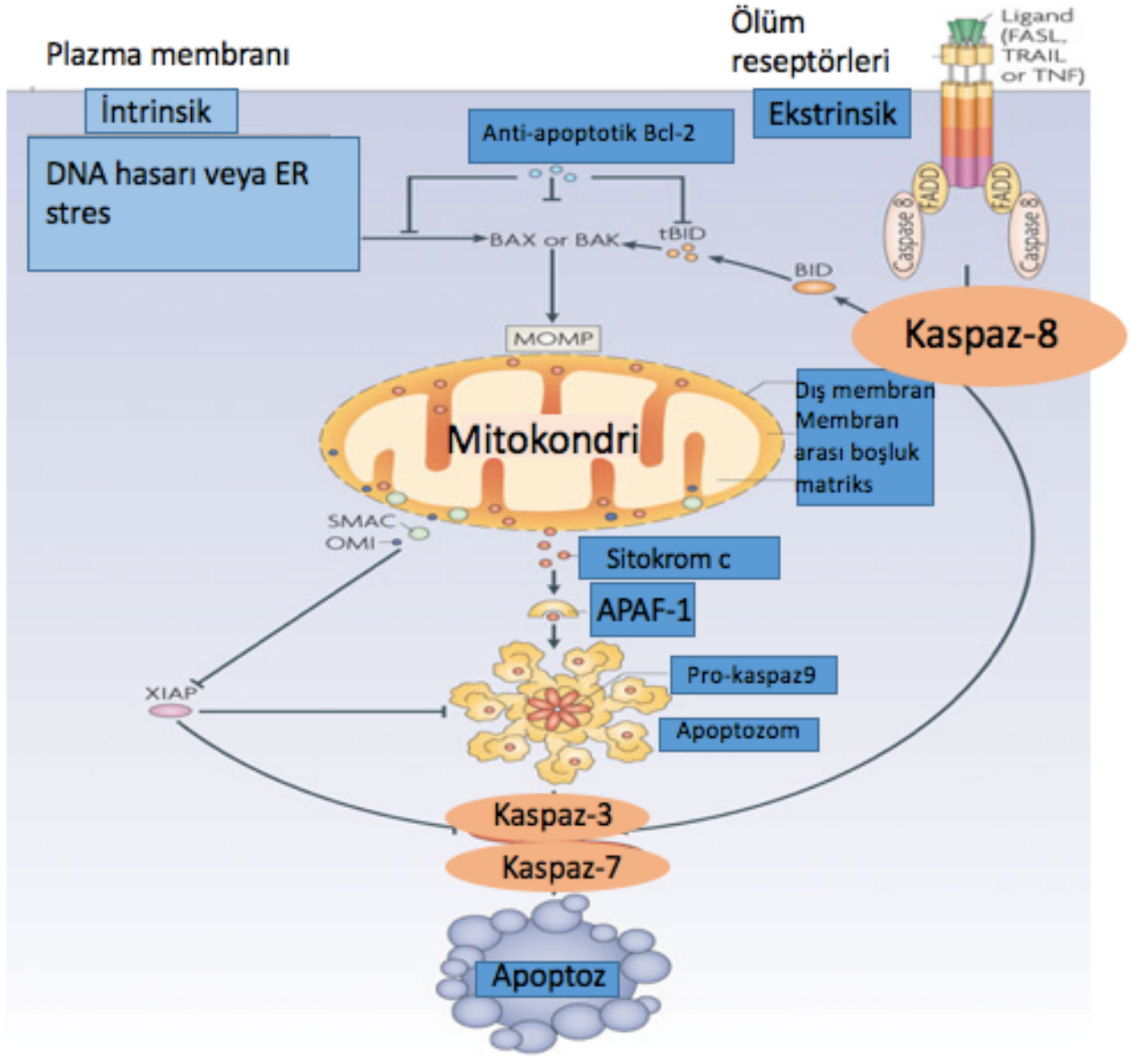
Apoptoza giden hücrede bir takım morfolojik değişiklikler oluşur. Bu morfolojik değişimler, plazma membranının tomurcuklanması, hücre küçülmesi, kromatin kondenzasyonu, DNA parçalanmasını içerir. Sonuç olarak apoptotik hücre parçalara ayrılır ve fagositik sistem tarafından yok edilir. Böylece apoptotik süreç sırasında infamasyon oluşmaz (Tait ve ark., 2008).

Hücrenin apoptoza gitmesi pro- ve anti- apoptotik proteinlerin ekspresyonu, hücre siklusunun aşaması gibi faktörlere bağlıdır.

Hücre yüzey reseptörlerine ölüm indükleyici ligandların bağlanmasıyla ekstrinsik sinyallerden veya sitotoksik T-lenfositlerle apoptoz aktive olmaktadır. T hücreleri hasarlı ya da virüsle enfekte hücreleri tanır ve enfeksiyonun yayılmasını önlemek amacıyla apoptozu başlatır. Bazı durumlarda ise hücresel strese takiben intrinsik sinyal ile apoptoz aktive olmaktadır. Hücresel stres radyasyon, kimyasallar, büyüme faktörlerinin yoksunluğu, oksidatif stresin veya ER stresin bir sonucu olarak meydana gelebilir. İntrinsik sinyal mitokondri aracılığıyla gerçekleştirilir (Vembar ve ark., 2009).

Apoptoz regülasyonu, kaspazların kaskad oluşturarak aktifleşmesini sağlayan yukarıda bahsedilen ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki farklı yolak üzerinden kontrol edilmektedir. Mitokondri üzerinden apoptozom oluşumuyla intrinsik yolak aktive olurken, hücre membranı ölüm reseptörleri ailesinin aktifleşmesiyle ekstrinsik yolak aktive olmaktadır (Favaloro ve ark., 2012).

İnsanlarda bilinen 12 kaspazdan kaspaz-2,-3,-6,-7,-8,-9,-10 olmak üzere yedi kaspazın apoptotik hücre ölümünde rolü olduğu bulunmuştur (Adams ve ark., 2002). Kaspazlar inaktif olarak sentezlenmekte ve apoptoz sırasında aktifleşmektedir. Kaspaz kaskadı oluşumunda başlatıcı (kaspaz-8, -9) ve devam ettirici (-3, -6,-7) olmak üzere 2 farklı kaspaz grubu mevcuttur. Kaspaz 8 ekstrinsik yolağın başlatılmasında, kaspaz 9 ise intrinsik yolağın başlatılmasından sorumludur.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Şekil 4.5: Apoptotik hücre ölümü moleküler mekanizması (Molecular Cell Biology).

Şekil 4.5' te gösterildiği gibi hücrelerde apoptosizin indüklenebilceği birçok yol mevcuttur.

İntrinsik yolak, mitokondri dış membranının geçirgenliğinin bozulmasıyla başlayan apoptotik aktivasyon sürecidir (Allan ve ark., 1995). Bu süreçte mitokondri iç membranda bulunan sitokrom c' nin sitoplazmaya salınmasıyla başlamaktadır.

Sitokrom c sitoplazmada apoptotik proteaz aktive faktör-1 (Apaf-1) proteinine bağlanır (Reubold ve ark., 2012). Bağlanmanın ardından ATP harcanmasıyla oluşan bu komplekste konformasyonel bir değişim olur (Kokoszka ve ark., 2004). Prokaspaz-9' unda bu yapıya katılmasıyla bu komplekse apoptozom denir. Apoptozom oluşumu ile aktif kaspaz 9 meydana gelerek ve kaspaz 3' ü aktiveleştirir (Shi ve ark., 2002).

Ekstrinsik yolda ise, hücrenin dışından gelen bir sinyal ile plazma membranındaki Tümör Nekroz Faktör (TNF) ve diğer ölüm reseptörlerinin aktive olmasıyla başlamaktadır (Wajant ve ark., 2003). TNF ailesinde 19 farklı ligand mevcuttur. TNF reseptör proteinlerinde ölüm domaini (DD) denilen 80 aminoasitlik bir sekans vardır (Hsu ve ark., 1995). Ligandın reseptörde bu domaine bağlanmasıyla ölüm tetikleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur (Hsu ve ark., 1996) ve başlatıcı kaspazlardan 8 ve 10 aktiveşerek kaspaz-3 ve-7' i aktiveleştirir.

Bcl-2 proteinleri apoptoz da görev alan protein ailesidir. Bu proteinlerin bazıları anti-apoptotik (Bcl-2 ve Bcl-xL), bazıları ise pro-apoptotik (Bad ve Bax) tir. Hücrelerin apoptotik uyarıya duyarlılığı pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengeye bağlıdır. Pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri hücrel hasar yada stres algılayıcı olarak görev yaparlar ve sıklıkla sitozol içerisinde yer almaktadırlar (Zeng ve ark., 2009).

Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri apoptozu baskımlarken, pro-apoptotik proteinler apoptozu aktive etmektedirler. Bu iki farklı etki, proteinlerin yapılarında bulunan Bcl-2 homolog bölgeleri (BH) tarafından düzenlenmektedir. Bu proteinlerin yapılarında 4 bölge mevcuttur: BH1, BH2, BH3 ve BH4. Bcl-2 ailesi proteinleri BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri ile diğer Bcl-2 ailesi proteinlerinin BH3 bölgelerine bağlanarak iletişim kurmaktadır. Pro-apoptotik protein ailesi taşıdıkları BH yapılarına göre ikiye ayrılır; BH1, BH2, BH3 bölgelerini taşıyanlar (Bak, Bax) ve sadece BH3 bölgesini taşıyanlar (Bid, Bad, Bim). Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri ise sadece BH4 bölgesi taşırlar (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X_L, Bcl-w) . Bcl-2 ailesindeki pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin arasındaki denge hücrenin sağkalımı ve ölümü arasındaki dengelyi oluşturmaktadır. Anti-apoptotik proteinlerin seviyeleri fazla olduğunda apoptoz baskılanırken, pro-apoptotik proteinlerin seviyelerinin fazla olması hücreyi apoptoz a götürmektedir (Pfutzner ve ark., 2005).

4.3.2. Apoptotik hücre ölümü ve ER stres ilişkisi

UPR cevabının yetersiz kaldığı durumlarda çeşitli mekanizmalar hücre ölümüne neden olabilir. CHOP, en iyi karakterize edilmiş UPR aracılı regüle olan pro-apoptotik proteindir (Young ve ark., 2001) . CHOP ekspresyonu ATF-4 ve ATF-6 ile regüle olmaktadır ve CHOP delesyonu olan hücre ve hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda ER stres kaynaklı hücre ölümünde azalma görülmüştür (Ma ve ark., 2002).

Önemli bir kalsiyum deposu olan ER lümeni ER katlanma kapasitesi ve hücre canlılığı için önem taşır. Yukarıda bahsedildiği gibi ER kalsiyum homeostazının bozulması, SERCA alım pompasını inhibe eder ve ER' nin katlanma kapasitesini düşürür. ER stres ile birlikte mitokondriyel matriste sürekli kalsiyum birikimi mitokondriyel membran geçirgenliğini tetikler ve apoptotik yolağı aktive eder. Birçok çalışmada Bcl-2 protein ailesi ile birlikte ER lokalize proteinlerin ER kalsiyum akışını regüle ettiği gösterilmiştir (Deniaud ve ark.,2008; Li ve ark.,2009; Wu ve ark., 1999).

IRE1- α 'nın TRAF2 ile interaksyonu pro-inflamatuvar ve pro-apoptotik protein JNK aktivasyonuna neden olur. Fare ve insan hücre hatlarında yapılan çalışmalarda kaspaz ekspresyonlarının susturulması ER stres aracılı apoptoz indüklenmesi engellediği bulunmuştur (Nakagawa ve ark., 2000).

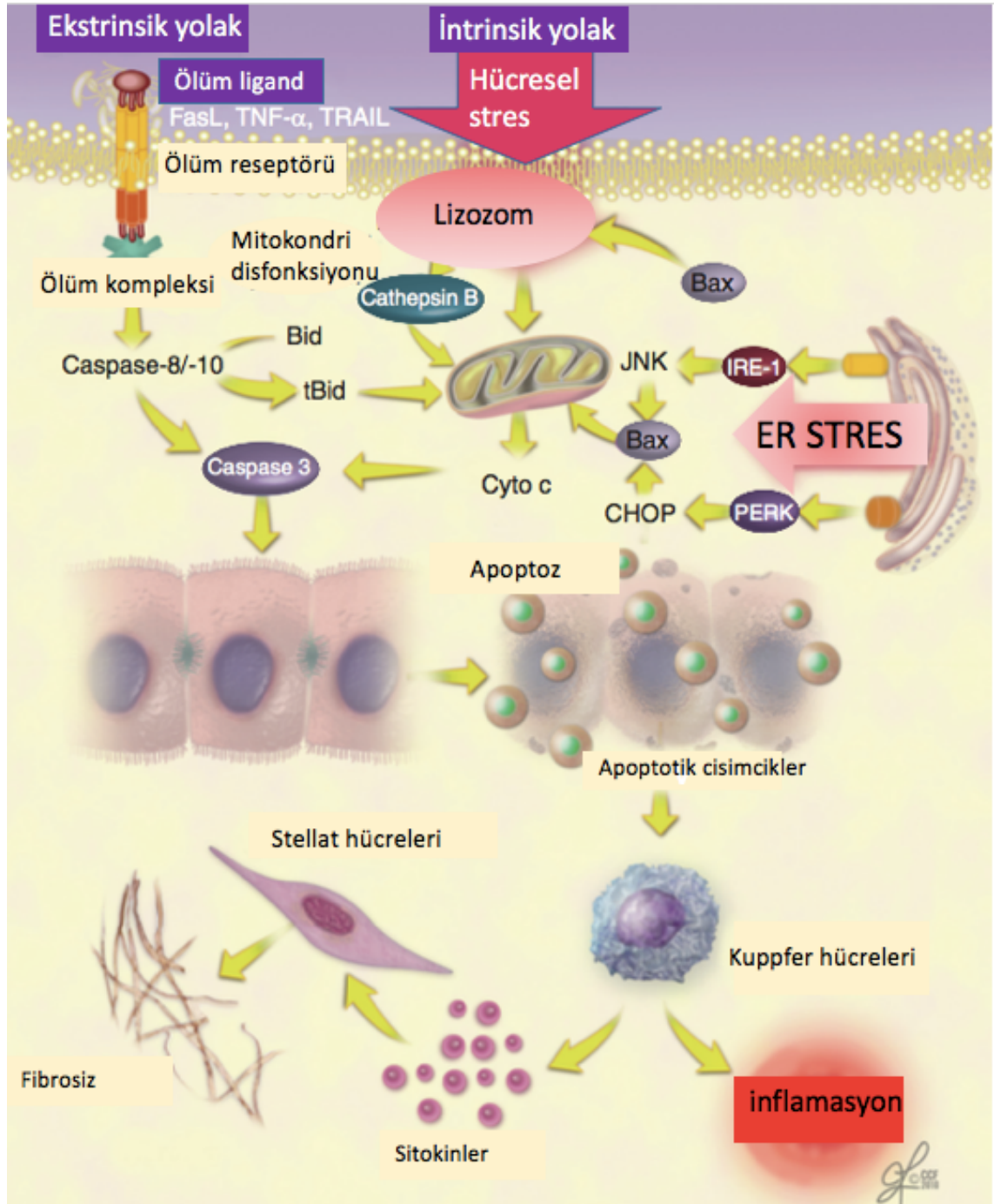
4.3.3. Apoptozun non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ile ilişkisi

ER homeostazının düzeltilmesinde UPR' nin yetersiz kalması şekil 4.6' da gösterildiği gibi apoptotik hücre ölümü ile sonuçlanabilmektedir. ER stres cevabında PERK, CHOP proteinini, IRE ise JNK yolağını aktive etmektedir (Sozen ve ark., 2014). CHOP, JNK ile birlikte pro-apoptotik protein olan Bax' ı aktive eder ve mitokondri disfonksiyonuna yol açar. Yapılan çalışmalarda NAYKH' nin ilerleyerek NASH fazına geçmesinde hepatosit apoptozunun rolü olduğu gösterilmiştir (Wieckowska ve ark., 2006). CHOP delesyonunun alkolik karaciğer hastalıklarında hepatosit apoptozunu ve karaciğer fibrozunu azalttığı bulunmuştur (Barreyro ve ark., 2007; Cazanave ve ark., 2009). Bir başka çalışmada erkek sıçanların yüksek oranda doymuş yağ asidi içeren diyetle beslenmeleri sonucu ER stres ile birlikte kaspaz-3

aktivasyonu ve karaciğer hasarının arttığı gösterilmiştir (Aggarwal ve ark., 1985). Hepatosit apoptozunda fibrogenezin azaldığı bununla birlikte fibrozisin indüklendiği bilinmektedir (Canbay ve ark., 2003). Sıçan hepatosit hücre hattına doymuş yağ asidi uygulamasıyla CHOP, GRP78 mRNA düzeylerinin arttığı, bununla birlikte mitokondri bağımlı apoptotik hücre ölümünün aktive olduğu bulunmuştur. Ek olarak, Cazaneva ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada palmitat uygulamasının ER stres aracılı CHOP ve aktivatör protein-1 (AP-1) kompleksinin tetiklenmesine ve p53 upregüle apoptoz modülatör proteininin (PUMA) ekspresyonu aracılığıyla Bax aktivasyonuna neden olur (Won ve ark., 2007).

ER' de bulunan kalsiyum iyonu konsantrasyonu da apoptoz efektörleriyle ilişkilidir. Kalsiyum konsantrasyonunun azalması mitokondri membran bütünlüğünün bozulmasıyla intrinsik yolak aktive olmaktadır. Obez farelerde hepatik SERCA aktivitesinin düştüğü, ER membran lipid tabakasının içeriğinde SERCA aktivitesini etkilediği gösterilmiştir (Luciani ve ark., 2009).

NAYKH da yağ asitlerinin, serbest kolesterolün birikmesiyle ortaya çıkan lipotoksitite ile birlikte apoptotik hücre ölümünün aktif olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir. Bir başka yapılan çalışmada ise Fas ölüm reseptörlerinin ekspresyonunun NASH hastalarında kontrol grubuna göre artış olduğu gösterilmiştir. (Bissell ve ark., 1992). Fas ligandı hepatosit apoptozunun kaspaz 8 bağımlı olarak Bid proteinin kesilmesiyle mitokondri disfonksiyonunu indükler. Sonuç olarak yapılan çalışmalarda hepatosit apoptozunun hepatik inflamasyon ve fibrozis ile korele olduğu görülmektedir.



Şekil 4.6: NAYKH' da apoptotik yolağın moleküler mekanizması (Traber ve ark., 2007).

4.4. Vitamin E

4.4.1. Vitamin E'nin yapısı ve fonksiyonu

Vitamin E, bitkilerde sentezlenen yağda çözünen α -, β -, γ -, δ -tokoferol, ve α -, β -, γ -, δ -tokotrienoller olmak üzere doğada 8 farklı formda bulunmaktadır. Bitkisel yağlarda, buğday tohumu, soya fasulyesi ve badem gibi besinlerde α -tokoferol olarak yüksek miktarda bulunur. Vitamin E' nin farklı formları farklı biyopotansiyele sahiptirler. α -tokoferol en yüksek biyolojik aktivitesi bulunan ve vücut tarafından en fazla absorbe edilen formdur (Parola ve ark., 1992).

Vitamin E yapısında yer değiştirebilen aromatik halka ve uzun izoprenoit yan zincirler içermektedir. Yapısında fenolik hidroksil grubu içeren bu aromatik halka aktif kısımdır. Kroman halkasının üzerindeki metil grubunun sayısına ve pozisyonuna göre α -, β -, γ -, δ - olarak sınıflandırılır ve trimetil α , dimetil β -veya γ -, monometil δ - olarak isimlendirilir (Traber, 2007). Tokotrienoller zincirin 3', 7' ve 11' pozisyonlarında çift bağ bulundurmalarından dolayı doymamış, tokoferoller, doymuş bir yağ zinciri içerirler.

Hidrofobik özelliğinden dolayı vücut sıvıları ve plazmada özel bir taşınma mekanizması gerektirir. Vitamin E gastrointestinal kanalda absorbe edilir. Absorbe edildikten sonra apolipoproteinler ile birlikte şilomikronların içerisinde taşınırlar. Şilomikronların parçalanmasıyla vitamin E'nin bir kısmı dokulara dağılır, şilomikron kalıntılarıyla birlikte diğer kısmı karaciğer tarafından alınır. Karaciğerde α -tokoferol transfer protein (α -TTP) tarafından tanınan α -tokoferol VLDL' ye katılarak diğer dokulara taşınır (Pennica ve ark., 1984).

Vitamin E, Evans ve Bishop tarafından 1922 de sıçanlarda fetal fertilitiyi koruyan esansiyel besin maddesi olarak keşif edilmiştir (Evans ve Bishop, 1992). Keşfedilmesinin ardından 1980 yılların başında antioksidan olarak tanımlanmış olmasına rağmen (), 1990 yılları arasında pek çok çalışmada vitamin E'nin birçok sinyal ileti mekanizmasında ve gen regülasyonunda fonksiyonu olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda beyin, sinir, kas ve kemik gibi dokuların ve organların gelişiminde önemli fonksiyonu olduğu belirlenmiştir (Azzi ve Stocker 2000 ; Wolf, 2005). Tokoferol birçok hücre ve doku tipinde farklı sinyal moleküllerini etki ettiği gösterilmiştir. Pek çok çalışmada, vitamin E takviyesinin nörodejeneratif hastalıkları,

ateroskleroz ve çeşitli kanser tiplerinin gelişiminde koruyucu etki gösterdiği gösterilmiştir (Özer ve ark., 2006). Vitamin E'nin protein kinaz-B, protein kinaz-C, fosfolipaz-A₂, siklooksijenaz-2, fosfotidil inositol 3-kinaz, protein tirozin kinaz ve protein fosfataz-2A gibi moleküllerin aktivitesini düzenlediği belirtilmiştir (Ozer ve ark., 1993; Ozer ve Azzi, 2000). Bu kinazların aktivitesindeki değişikliklerin hücre proliferasyonu, lipid metabolizmasını, inflamasyon ve hücre içi sinyal ileti yolağında rol oynayan çeşitli genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda insan monositlerinde protein kinaz C-alfa, makrofajlarında ise CD36 (Venugopol ve ark., 2004), sıçan kalp miyoblastik hücrelerinde fosfolipaz A₂'i (Tran ve ark., 1997) etkilediği bulunmuştur.

4.4.2. Vitamin E' nin sinyal iletim mekanizmaları ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığındaki rolü

In vitro ve *in vivo* hayvan çalışmalarında vitamin E' nin NAYKH ve steatohepatit ile ilişkili metabolik anormallikler ve oluşan inflamasyon üzerinde koruyucu rolü olduğu gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2003). NASH hastalarıyla yapılan çalışmada plazma α -tokoferol lutein, likopen, β -karoten ve α -karoten seviyelerinin kontrol grubuna göre azaldığı bulunmuştur (Erhardt ve ark., 2011).

NAYKH patogenezinde artan oksidatif stres ve inhibe olan antioksidan aktivite uygulanan tedavide hedef olmaktadır. Çeşitli çalışmalarda, NAYKH terapisinde vitamin E, vitamin C, betain kullanılmaktadır (Musso ve ark., 2010). Lavine ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NAYK hastası olan 11 çocukta vitamin E terapisi ile birlikte 4. ve 11. aylar arasında serumda bulunan aminotransferaz aktivitesinin düştüğü bulunmuştur (Lavine ve ark., 2000). 12 hastanın 1 yıl boyunca günde 300 mg vitamin E uygulanmasıyla fibrozis, inflamasyon, steatozis de histolojik analizlerde iyileşme görülmüştür (Alexis ve ark., 2009).

Vitamin E karaciğer dahil olmak üzere birçok doku ve organda pro-oksidan ve inflamatuvar ilişkili genleri kontrol etmektedir. Mevcut klinik öncesi çalışmalarda lipojenik ve inflamatuvar basamaklarda vitamin E'nin NAYKH patogenezinde olumlu etki yarattığı gösterilmiştir ve araştırmalar devam etmektedir. Bu nedenle hastalık patogenezinde vitamin E metabolizmasının araştırılması klinik açıdan ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli olacaktır (Galli ve ark., 2017).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Hayvanlara uygulanan yöntemlerin etik kurallara uygunluğu “Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu” tarafından 13.03.2017 tarihli 21.2017.mar numarası ile onaylanmıştır.

5.1. Kullanılan Gereçler

Kontrol ve deney grupları 2-4 aylık erkek albino tavşanlardan oluşturuldu. Tavşan yemi (vitamin E’den fakir olarak hazırlandı) M.Barbaros Denizeri Yem Sanayi’nden ve RRR- α -tokoferol (Evigen, i.m.) Aksu Farma Tıbbi Ürünler İlaç Sanayii’nden temin edildi. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar uygun kalite ve saflıktaydı.

5.1.1. Kullanılan kimyasallar

- PMSF (Sigma)
- DTT (Biomatik)
- % 37 HCl (Merck)
- EDTA (Sigma)
- Tris baz (Sigma)
- Bradford için protein assay (Biorad)
- SDS (Sigma)
- Akrilamid-bisakrilamid solüsyonu (Biorad)
- Amonyum persülfat (Sigma)
- TEMED (Sigma)
- Glisin (Sigma)
- 2- β Mercaptoethanol (Merck)
- Brom fenol mavisi (Merck)
- RIPA buffer (Cell Signaling)
- Metanol (Merck)
- Ponceau S (Sigma)
- Sodyum klorür (Merck)
- Kolesterol (Dolder)

- Dietileter (Kimetsan)
- Etanol (% 99) (Riedel-De Haen)
- Formaldehit (Merck)
- Tween 20 (Biomatik)
- Skim Milk Powder (Fluka)
- Developer (Medical Index)
- Fixer (Medical Index)
- Protein molekül ağırlığı belirteci (Precision Plus Protein Standards, Biorad)
- PERK rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling)
- Phospho-IRE1 rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling)
- Grp94 rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling)
- Grp78 rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling)
- Bax rabbit monoclonal antibody (Abcam)
- CHOP rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling)
- Kaspaz 9 rabbit monoclonal antibody (Abcam)
- Trans-Blot Transfer Medium (Biorad)
- Kemiluminesans kit 20X LumiGLO ve 20X Peroxide (Cell Signaling)

5.1.2. Kullanılan cihazlar

- Elektroforez için güç kaynağı (Biorad) ve Elektroforez sistemi (EC 330 Midicell)
- U.V görüntüleme cihazı (Vilbert Lourmat)
- Otoklav (Hirayama Hiclave)
- Mikrosantrifüj (Thermo)
- Hassas Terazı (Sartorius)
- pH metre (Corning)
- Vorteks (Cleaver Scientific)
- Pipet takımı (Thermo)
- Santrifüj (Sartorius)
- Spektrofotometre (Biorad)
- Su banyosu (İlke Lab. Cihazları)
- Derin dondurucu - 20⁰ C (Bosch)
- Su saflaştırma cihazı (Milli Q.Uf Millipore)

- Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad)
- Mini-PROTEAN 3 Cell (Biorad)
- Orbital Shaker (Major Science)
- Ultra Turrax T25, Homojenizatör (IKA)
- ChemiDoc (BioRad)
- PCR

5.1.3. Çözeltiler

0.1 M Disodyumetilendiamintetraasetat (EDTA): 1.861 g etilendiamintetraasetat beher içine alındı ve 40 mL ultra saf su eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. pH'sı sodyum hidroksit ile 8.0' e ayarlandı ve ultra saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edildi.

0.1 M Fenilmetansulfonilflorid (PMSF): 34.8 mg PMSF tartılarak ependorf içine alındı ve 2 mL metanol eklendikten sonra vorteks yardımıyla çözünmesi sağlandı. Hazırlanan çözelti 15 µl'lik hacimlere bölünerek -20°C'da saklandı.

1 M Ditiotreitol (DTT): 154.2 mg DTT tartılarak ependorf içine alındı ve 1 mL ultra saf su eklendikten sonra vorteks yardımıyla çözünmesi sağlandı. Hazırlanan çözelti 40 µl'lik hacimlere bölünerek -20°C'da saklandı.

10 mM Fosfat tampon solüsyonu (PBS-Phospate buffer saline): 10 mM disodyum hidrojen fosfat üzerine 10 mM sodyum dihidrojen fosfat pH'sı 7.4'e ayarlandı. Çözeltinin her 100 mL'si için 0.9 g NaCl eklendi. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edildi.

1 M Tris-HCl tamponu: 242.2 mg tris tartılarak beher içine alındı ve 80 mL ultra saf su eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. pH'ı 5N HCl ile 7.4' e ayarlandı ve bir balon jojeye alınan çözelti ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

1,5 M Tris-HCl tamponu: 18.2 mg tris tartılarak beher içine alındı ve 60 mL ultra saf su eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı.

pH'sı 5N HCl ile 8.8'e ayarlandı ve bir balon jojeye alınan çözelti ddH₂O ile 80 mL'ye tamamlandı.

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (%10): 50 g SDS tartılarak beher içine alındı ve üzerine 80 mL ultra saf su eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlanarak oda ısısında saklandı.

Amonyumpersülfat (APS) (%10): 0.1 g amonyumpersülfat tartılarak ependorf içine alındı ve 0.9 mL ultra saf su eklendikten sonra vorteks yardımıyla çözünmesi sağlandı. Deney günü taze hazırlandı.

Ponceau S boyası: 0.1 g Ponceau S tartılarak beher içine alındı ve 500 µg asetik asitle birlikte 30ml ultra saf su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. Çözündükten sonra bir balon jojeye alınan çözelti ddH₂O ile 50 mL'ye tamamlandı.

5X Elektroforez (Running) Buffer: 30 g Tris, 143 g Glisin, 5 g SDS tartılarak balon joje içine alındı üzerine 1000 mL dH₂O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. Kullanmadan önce 1X olacak şekilde seyreltilti.

25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 v/v Metanol PH: 8,3 Transfer Buffer: 3.03 g Tris, 14.4 g glisin tartılarak balon joje içine alındı ve 800 mL ultra saf su ile 200 ml metanol eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. +4 °C'ye konularak kullanıma hazır hale getirildi.

10X Tris-Buffered Saline (TBS): 24.2 g Tris, 80 gr. NaCl tartılarak balon joje içine alındı ve 300 mL ultra saf su eklenerek konsantre HCl ile pH'sı 7.6'ya ayarlandı. Ultra saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

1X Tris-Buffered Saline Tween 20 (TBST): Önceden hazırlanan 10X TBS 1 litre 1X yapılarak üzerine 500 µL Tween 20 eklendi.

Protein izolasyonu için homojenizasyon tamponu: 2mL 10X RIPA buffer, 2mL PMSF, 16 mL ultra saf su içinde 1 tablet proteaz inhibitör çözüldü.

5.2. Yöntemler

5.2.1. Deney planı

Çalışmada yaşları 2-4 ay arasında değişen (anne sütünden kesildikten hemen sonra) ve ağırlıkları 100-200 gr arasında olan 24 adet erkek albino tavşan kullanıldı.

Tavşanlar her grupta 6 adet olacak şekilde aşağıdaki protokole uygun şekilde gruplandırıldı. Bütün Tavşanlar vitamin E' den fakir yem ile beslendi.

1. Grup (Kontrol): Yem ile beslendi.
2. Grup (Kolesterol): % 2 kolesterol içeren yem ile beslendi.
3. Grup (Kolesterol+Vitamin E): % 2 kolesterol içeren yem ile beslendi ve vitamin E i.m. olarak 50 mg/kg/gün uygulandı.
4. Grup (Vitamin E): Yem ile beslendi ve vitamin E i.m. olarak 50 mg/kg/gün uygulandı.

Enjeksiyonlar her iki bacağına gümüşü intramusküler olarak uygulandı. Bütün tavşanlar günde 100 g yem ile 8 hafta süre ile beslendi ve her bir tavşan ayrı bir kafeste barındırıldı. Kolesterol içeren yem, kolesterolün dietileter içinde çözündürülerek yeme karıştırılması ve daha sonra eterin tamamen uçurulması şeklinde hazırlandı.

5.2.2. Tavşanlar ile ilgili materyallerinin alınması ve saklanması

Tüm tavşanlardan deney öncesi kulak veninden kan örnekleri alındı, santrifüj edilene kadar buz üzerinde bekletildi ve +4⁰C de 4000 rpm'de santrifüj edildi.

Sekiz hafta sonunda tavşanlara periton içine 50 mg/kg ketamin HCl ve 5 mg/kg ksilazin HCl uygulanarak derin anestezi sağlandı. Toraks disseksiyonunu takiben aortaları serbestleştirildi. Sağ ventrikülden injektörle 10 mL kan alındıktan sonra aortalar arkus hizasından kesildi yaklaşık 3 mm uzunluğunda bir kesit mikroskopik inc celemeler için % 10 tamponlanmış formalin içinde tespit edildi. Daha sonra torasik aorta diyafram hizasına kadar çıkarıldı. Adventisya tabakası temizlendi, damar uzunlamasına açıldı, endotel tabaka kazındı. Protein izolasyonu yapılacak aorta dokuları sıvı nitrojenle hemen dondurularak -80 °C'ye kaldırıldı.

Serum lipit profili ve vitamin E analizleri için kan örnekleri kuru tüplere ayrıldı ve santrifüjlenerek serumları ayrıldı, vitamin E için kullanılacak serumlar azot gazından geçirildi.

5.2.3. Kan tetkiklerinin prensipleri

Kan kolesterol değerlerinin saptanması Hitachi Modüler sistem P800 (Roche), kan vitamin E düzeylerinin ölçülmesi ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Waters) kullanılarak yapıldı.

5.2.3.1. Serum total kolesterol düzeylerinin ölçülmesi

Bu yöntem, kolesterol esteraz kolesterol esterlerini serbest kolesterol ve yağ asitlerine hidrolizi prensibine dayanır. Kolesterol oksidaz kolesterolün oksidasyonunu katalizleyerek kolest-4-ene-3-one ve H_2O_2 oluşturur. Peroksidaz varlığında, oluşan H_2O_2 fenol ve 4-aminofenazon ile oksidatif bir etkileşim sağlayarak kırmızı renkli kinonemin bileşiklerini oluşturur. Bu kırmızı renkli kinonemin bileşikleri spektrofotometrik olarak absorbansları ölçülerek total kolesterolün miktarları mg/dL olarak belirlenmektedir. Reaktif olarak sodyum kolat, fenol, 4-aminofenazon, kolesterol esteraz, kolesterol oksidaz, peroksidaz kullanıldı.

5.2.3.2. Serum α -tokoferol düzeylerinin ölçülmesi

200 μ L tavşan serumu tüpe ayrıldı, 200 μ L askorbatlı etanol (1 gr/L) ile muamele edilerek deproteinize edildi. 24 μ L asetonitril eklenerek 1 dakika vortekslendi. Üzerine 500 μ L HPLC grade heksan eklenerek 2 dakika vortekslendi ardından 1 dakika 3000 rpm' de santrifüjlendikten sonra en üstteki heksan fazı toplandı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Bu şekilde serumdaki α -tokoferol yaklaşık 1500 μ L heksan içinde elde edildi. Bu çözeltinin 1250 μ L'si tüpe alındı ve 36 °C su banyosunda sıvı azotla heksan tamamen uçuruldu. Tüplerin ağzı sıkıca parafilmlenerek çalışmaya hazır hale getirildi.

HPLC uygulaması için tüpteki kalıntının üzerine 20 μ L askorbatlı etanol (1 gr/L) eklendi ve vortekslendi. Ardından 400 μ L mobil faz (metanol : su ; 95:5) eklendi, 1 dakika vortekslendi ve 1 dakika sonikasyonla degaze edildi. Karışım 45 nm'lik filtrelerden süzüldü.

Bu süzüntüden alınan 50 μ L örnek, akış hızı 1.5 mL/dk olacak şekilde HPLC C-18 Bondapak kolonuna injekte edildi ve absorbans değerleri Waters UV dedektör ile

294 nm’de okundu. α -Tokoferol tepeleri standart tepelerle karşılaştırılarak konsantrasyon hesaplandı ve $\mu\text{g/mL}$ olarak ifade edildi (Nierenberg ve Nann, 1992).

5.2.4. Karaciğer dokusundan total protein izolasyonu

Tavşan karaciğer dokusundan yaklaşık 100 mg karaciğer parçası steril bir cam tüp içerisine konuldu. Üzerine 0,5 mL RIPA homojenizasyon tamponu eklenerek 2 dakika buz içerisinde bekletildi. Ultraturrax homojenizatörü kullanılarak 24.000 rpm’ de 20 saniye homojenize edildi. Dokular iyice homojenize olmamış ise işlem tekrarlandı. Doku homojenatı + 4 °C’ de 10000 rpm’ de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatant protein tayini için ayrıldı. Total protein içeren homojenat -20 °C’ de saklandı.

5.2.5. Protein konsantrasyonunun hesaplanması

Elde edilen örneklerdeki total protein konsantrasyonu, Bradford protein tayini (BioRad Protein Assay) yöntemi ile ölçüldü. Öncelikle Bovine Serum Albümin (BSA) kullanılarak 0 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.2 mg/mL konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. Her bir ependorfa 4 μL standart veya bilinmeyen örnek ve 200 μL çalışma ayırıcı (protein assay – Biorad) eklendi. Daha sonrasında karanlık ortamda 5 dk olmak üzere inkübasyona bırakıldı. Oluşan mavi renkli ürün 595 nm’ de absorpsiyon spektrofotometrede (smartSpec plus, Biorad) ölçüldü. Oluşturulan standart eğriye göre örneklerdeki protein miktarları hesaplandı.

5.2.6. SDS-PAGE jel elektroforezi ve immunblotlama

İlk olarak %5’ lik yükleme jeli (1 M Tris-HCl, %30 (w/v) Akrilamid, %10 (w/v) SDS, %0,05 (w/v) APS ve %0,05 (w/v) TEMED, pH:6.8) ve % 12’ lik ayırma jeli (1.5 M Tris-HCl, %30 (w/v) Akrilamid, %10 (w/v) SDS, %0.05 (w/v) APS, %0.05 (w/v) TEMED eklenerek pH 8.8) hazırlandı. Aorta dokuları için 30 μg protein içeren homojenatlar 1 mM Tris-HCl, %40 gliserol, %8 SDS, %20 2- β -merkaptoetanol, %0.03 bromfenol mavisi içeren jel yükleme tamponu ile 1’e 4 oranında sulandırıldı ve 95°C’de 4 dakika ısıtılarak denatüre edildi. Denatüre edilen örnekler polimerize olmuş jele yüklendi. 2 L, elektroforez yürütme tamponu içinde 100 volt sabit akımda 1-1.5 saat sürede proteinler ayrıştırıldı (Biorad, Mini-PROTEAN 3 Cell). Protein molekül ağırlığı belirleyicisi olarak “Precision Plus Protein Standards” (Biorad) kullanıldı.

5.2.7. Karaciğer dokusundan RNA izolasyonu

Yaklaşık 100 mg karaciğer doku parçası bistüri ile kesilerek steril bir cam tüp içersine konuldu. Üzerine 1mL Trizol Reagent (Life Technologies) eklenerek 2 dakika buz içerisinde bekletildi. Ultraturrax homojenizatörü kullanılarak 24.000 rpm' de 20 saniye x3 kez homojenize edildi. Dokular iyice homojenize olmamış ise işlem tekrarlandı. Elde edilen doku homojenatından RNA izolasyonu Biorad marka hazır kit kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre yapıldı. Homojenat eppendorf tüplere alındı. Alınan miktarla eşit miktarda %70 etanol eklendi ve pipetleme ile iyice karıştırıldı. Doku süspansiyonu 2 mL' lik tüpe takılı olan spin kolona aktarıldı ve 8000 rpm 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolana 700 µL Low Strigency Wash Solution tamponu eklendi. 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp kolona 80 µL DnaseI eklenerek oda sıcaklığında 25 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 700µL High Strigency Wash Solution eklendi ve 8000 rpm 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kolona 700 µL Low Strigency Wash Solution tamponu eklendi. 2 kere 13000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon temiz 1,5 mL' lik eppendorf tüpe alındı ve üzerine elüsyon için 50 µL Rnaz içermeyen su eklendi ve 13000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. RNA konsantrasyonu 260 nm' de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

5.2.8. Total RNA' dan komplementer DNA (cDNA) sentez edilmesi

Total RNA' dan cDNA sentezi iScript cDNA Synthesis kit (Biorad) kullanılarak yapıldı. Her bir örnekten 100 ng RNA içerecek hacimde alındı. 4 µL Reaction Mix, 1µL Reverse Transcriptase eklendi ve toplam hacim 20 µL olacak şekilde PCR ultra saf su eklendi. Örnekler 25°C' de 5 dakika, 42°C' de 30 dakika, 85°C' de 5 dakika olacak şekilde Thermal Cycler cihazına konuldu.

5.2.9. cDNA örneklerinin GRP78, GRP94, IRE1, PERK primerleri için

kantitatif real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile ekspresyon analizi

Tayin edilecek genler için, *Oryctolagus cuniculus* GRP78, GRP94, IRE1, PERK Entrez Pubmed Nucleotid programında FASTA formatları (mRNA tüm dizisi) saptandı. Sonrasında bu FASTA formatı primer dizaynı için Primer 3 Output

programında yerleştirilerek uygun primerler elde edildi. Sentezlenen cDNA örneklerinin çoğaltılması SYBR green (Biorad) kiti kullanılarak kantitatif PCR ile gerçekleştirildi. Her bir örnek için 12,5 µL Syber green, 0,5µL forward primer, 0,5 µL reverse primer, 1 µL cDNA ve 10,5 µL Rnase free ultra saf su eklenerek total hacmi 25 µL olan karışım hazırlandı. GRP78 primeri için bağlanma sıcaklığı 62°C, GRP94 ve IRE1 için 63°C, PERK için 60°C olacak şekilde PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.



6. BULGULAR

6.1. Serum Kolesterol Düzeyleri

Kontrol, kolesterol, kolesterol + vitamin E ve vitamin E, gruplarındaki tavşanların 0. haftada serum kolesterol düzeyleri sırasıyla; $74,7 \pm 20,4$ mg/dL, $61,2 \pm 31,1$ mg/dL, $62,5 \pm 20,9$ mg/dL, $111,8 \pm 48,3$ mg/dL olarak saptandı. Sekizinci haftanın bitiminde tavşanların serum kolesterol düzeyleri, kontrol grubunda $68,3 \pm 41,0$ mg/dL, kolesterol grubunda $2426,8 \pm 1163,0$ mg/dL, kolesterol + vitamin E grubunda $2097,3 \pm 776,0$ mg/dL, vitamin E grubunda $52,5 \pm 28,5$ mg/dL olarak bulundu (Tablo 6.1).

Kolesterol alan bütün grupların 8. hafta sonunda kolesterol düzeylerinin yaklaşık olarak 40 kat arttığı ve meydana gelen artışın kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (* $p < 0.001$).

Tablo 6.1. Tavşanların serum kolesterol düzeyleri. 8. hafta gruplar, kontrol grubu ile kıyaslandığında * $p < 0.001$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=6).

GRUPLAR	Serum kolesterol düzeyleri ($\mu\text{g/mL}$)	
	0. hafta	8. hafta
Kontrol	$74,7 \pm 20,4$	$68,3 \pm 41,0$
Kolesterol	$61,2 \pm 31,1$	$2426,8 \pm 1163,0^*$
Kolesterol+Vitamin E	$62,5 \pm 20,9$	$2097,3 \pm 776,0^*$
Vitamin E	$111,8 \pm 48,3$	$52,5 \pm 28,5$

6.2. Serum Vitamin E Düzeyleri

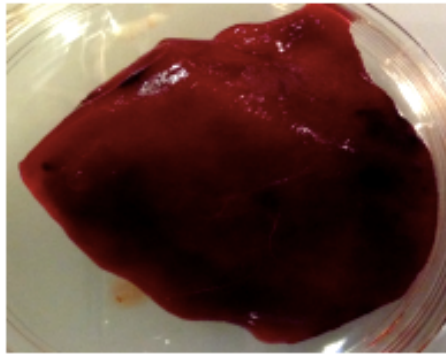
0. hafta kontrol grubundaki tavşanların serum vitamin E düzeyi ortalaması $5,0 \pm 2,3 \mu\text{g/mL}$, kolesterol grubunda $4,3 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$, kolesterol + vitamin E grubunda $4,9 \pm 2,5 \mu\text{g/mL}$, vitamin E grubunda $4,8 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi. Sekiz hafta sonunda kontrol grubunda serum vitamin E düzeyi ortalaması $2,9 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$, kolesterol grubunda $24,5 \pm 3,4 \mu\text{g/mL}$, kolesterol + vitamin E alan grupta $29,2 \pm 20,1 \mu\text{g/mL}$, vitamin E grubunda $17,4 \pm 10,3$ olarak ölçüldü (Tablo 6.2). Tavşanlara 8 hafta süre ile 50 mg/kg/gün vitamin E verilmesi ile vitamin E düzeyi başlangıç değerine göre yaklaşık 8 kat arttığı gözlemlendi. Sekizinci hafta kontrol grubu ile vitamin E, kolesterol grubu ve kolesterol + vitamin E grubu kıyaslandığında kolesterol + vitamin E grubundaki serum vitamin E düzeylerinin artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$).

Tablo 6.2: Tavşanların serum vitamin E düzeyleri. 8. hafta gruplar, kontrol grubu ile kıyaslandığında $p < 0.001$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=6).

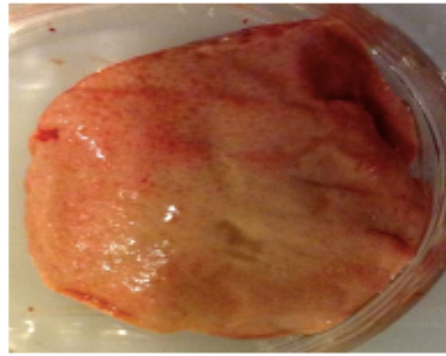
GRUPLAR	Serum vitamin E düzeyleri ($\mu\text{g/mL}$)	
	0. hafta	8. hafta
Kontrol	$5,0 \pm 2,3$	$2,9 \pm 1,4$
Kolesterol	$4,3 \pm 1,2$	$24,5 \pm 3,4^*$
Kolesterol+Vitamin E	$4,9 \pm 2,5$	$29,2 \pm 20,1^*$
Vitamin E	$4,8 \pm 1,1$	$17,4 \pm 10,3^*$

6.3. Karaciğerlerin Makroskopik Görüntüleri

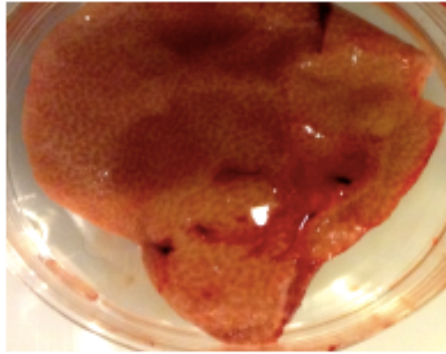
Sekiz hafta sonunda oluşturulan tavşan modellerinin karaciğerlerinin makroskopik görüntüleri incelendi. Kontrol ve vitamin E grubuna ait tavşanların karaciğerlerinin makroskopik görüntüleri normal görünümlü ve kırmızı renkte gözlemlendi (Resim 6.1A ve 6.1D). Kolesterol bakımından zengin beslenen grupta yağlanmış ve noduler yapılar içerdiği (Resim 6.1B), kolesterol ile birlikte vitamin E verilen gruptaki tavşanların karaciğeri ise kolesterol grubundakilere göre biraz daha az yağlanma gözlemlendi (Resim 6.1C).



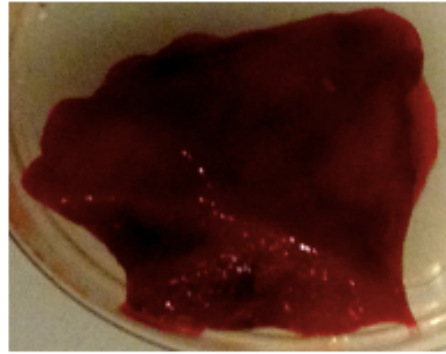
A



B



C

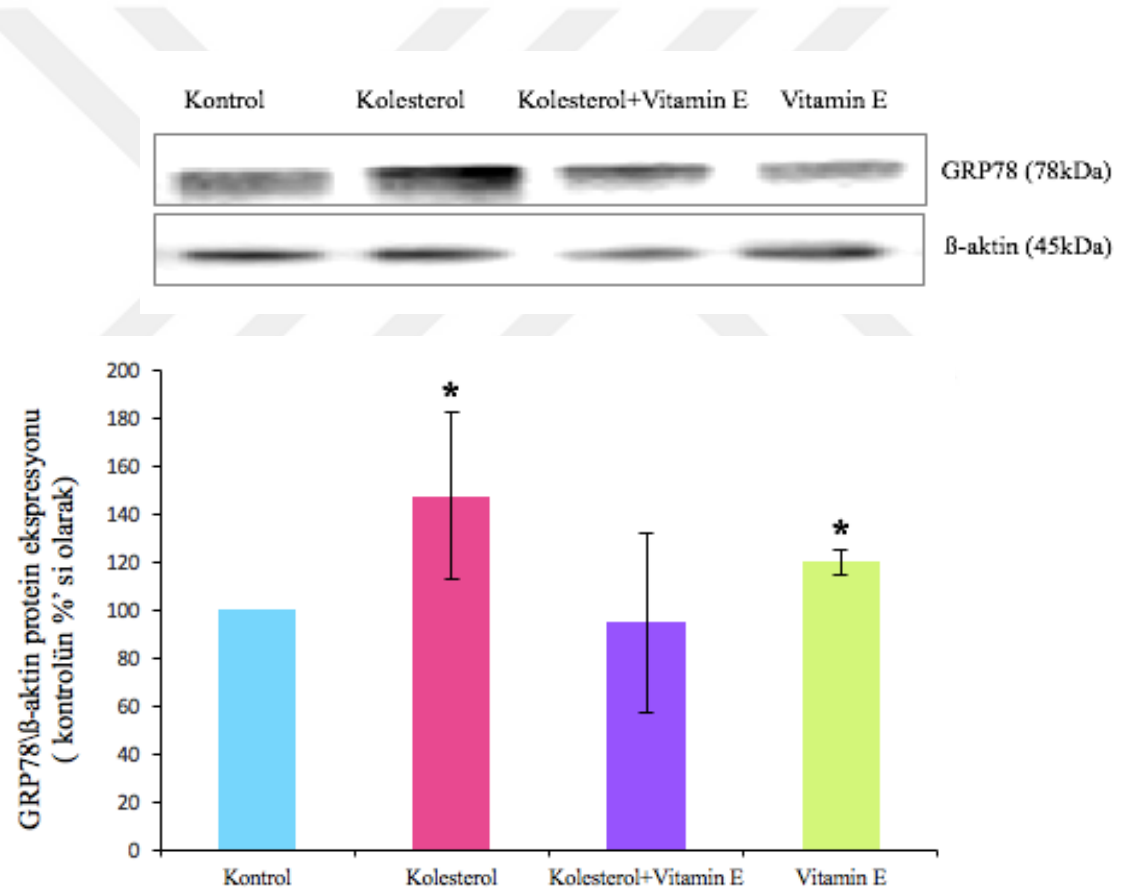


D

Resim 6.1. Her deney grubunu temsil eden bir tavşan karaciğeri makroskopik görüntüleri. Kontrol grubu (A), kolesterol grubu (B), kolesterol+vitamin E grubu (C), vitamin E grubu (D).

6.4. Karaciğer Dokusunda GRP78 Protein Ekspresyonu

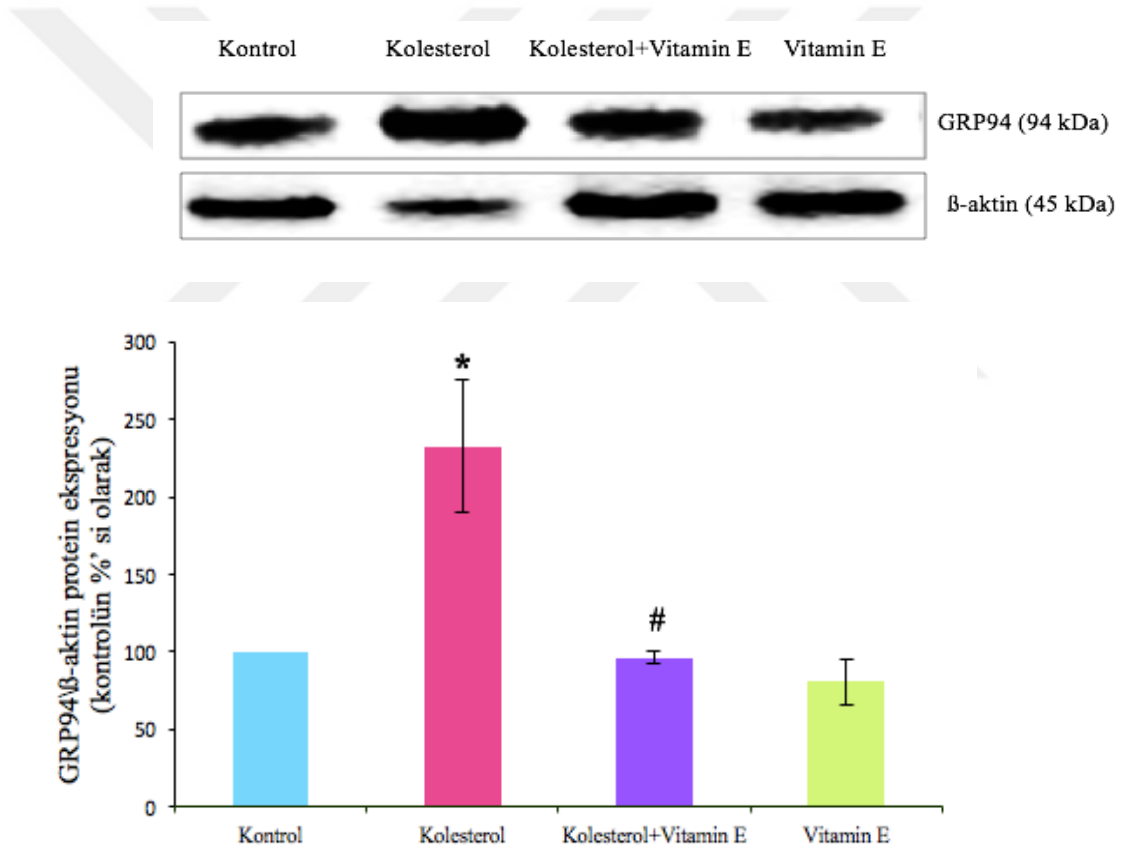
Kolesterol ve vitamin E' nin ER stres üzerine etkisini incelemek amacı ile immunoblotlama tekniği kullanılarak şekil 6.1 de gösterilen GRP78 protein ekspresyonu tespit edildi ve β -aktin' e göre normalize edildi. Kontrol grubundaki GRP78 protein ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildiğinde şekil 6.1' deki grafikte gösterildiği gibi kolesterol grubu $147 \pm 34,97$, Kolesterol+Vitamin E grubu $95 \pm 37,3$, Vitamin E grubu ise $119 \pm 5,35$ olarak tespit edildi. Gruplar arasında GRP78 protein ekspresyonu karşılaştırıldığında kolesterol grubunun kontrol grubuna göre yaklaşık 1,5 kat arttığı, vitamin E grubunun ise kontrol grubuna göre yaklaşık 1,2 kat arttığı bulunmuştur.



Şekil 6.1. Karaciğer dokusunda GRP78 protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü. Kolesterol grubu ve vitamin E grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında * $p < 0,001$ (n=3).

6.5. Karaciğer Dokusunda GRP94 Protein Ekspresyonu

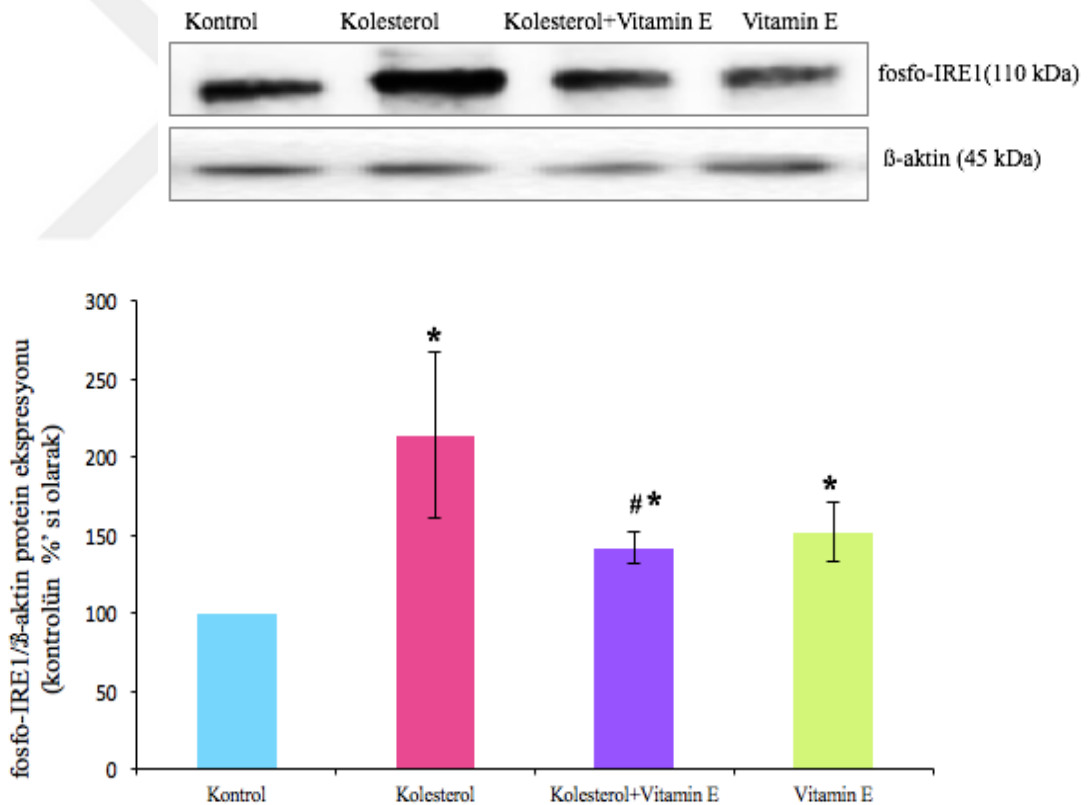
Kolesterol ve vitamin E' nin ER stres üzerine etkisini incelemek amacı ile immunoblotlama tekniği kullanılarak şekil 6.2 de gösterilen GRP94 protein ekspresyonu tespit edildi ve β -aktin' e göre normalize edildi. Kontrol grubu GRP94 protein ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildiğinde şekil 6.2 deki grafikte gösterildiği gibi kolesterol grubu $232 \pm 43,1$, Kolesterol+Vitamin E grubu $96 \pm 3,78$, Vitamin E grubu ise $80 \pm 14,36$ olarak tespit edildi. Sonuç olarak kolesterol grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında GRP94 protein ekspresyonu 2 kat arttığı bulundu. Kolesterol ile birlikte vitamin E verilen grupta ise kolesterol grubuna göre GRP94 protein ekspresyonun daha düşük seviyelerde olduğu bulundu.



Şekil 6.2. Karaciğer dokusunda GRP94 protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü. Kolesterol grubu, kontrol grubu ve kolesterol+vitamin E grubu ile kıyaslandığında *# $p < 0,001$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3).

6.6. Karaciğer Dokusunda fosfo-IRE1 Protein Ekspresyonu

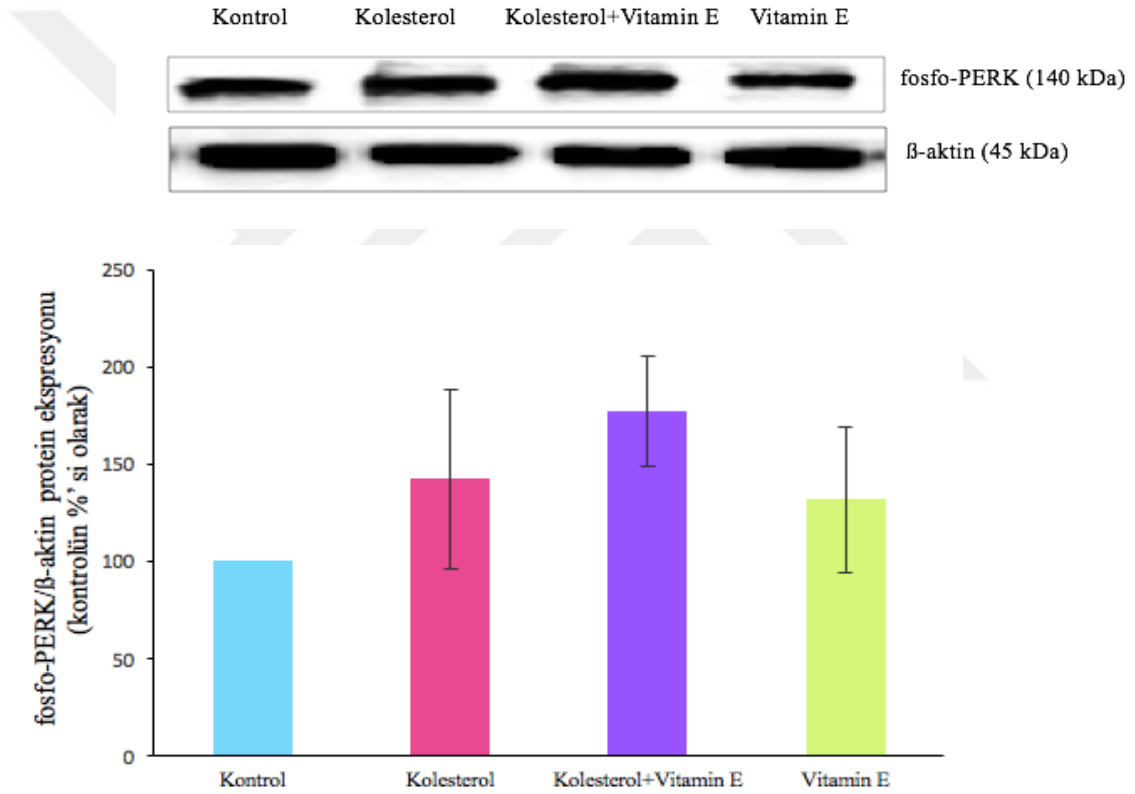
Kolesterol ve vitamin E' nin ER stres üzerine etkisini incelemek amacı ile immunoblotlama tekniği kullanılarak şekil 6.3 te gösterilen fosfo-IRE1 protein ekspresyonu tespit edilerek β -aktin' e göre normalize edildi. Kontrol grubundaki IRE-1 protein ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildiğinde şekil 6.3 teki grafikte gösterildiği gibi Kolesterol grubu $214 \pm 53,18$, Kolesterol+Vitamin E grubu $142 \pm 9,6$, Vitamin E grubu ise $151,8 \pm 19,02$ olarak tespit edildi. Sonuç olarak 8 hafta sonunda kolesterol grubunda kontrol grubuna göre IRE1 protein ekspresyonun 2 kat arttığı, kolesterol+vitamin E ve vitamin E gruplarında ise kontrol grubuna göre bu ekspresyonun yaklaşık 1,5 kat arttığı bulundu. Kolesterol+vitamin E grubu ise kolesterol grubuna göre kıyaslandığında fosfo-IRE1 protein ekspresyonunun daha düşük seviyelerde olduğu bulundu.



Şekil 6.3. Karaciğer dokusunda fosfo-IRE1 α protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü. Gruplar, kontrol grubu ile kıyaslandığında * $p < 0,001$, kolesterol+vitamin E grubu kolesterol grubu ile kıyaslandığında # $p < 0,001$ ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3).

6.7. Karaciğer Dokusunda fosfo-PERK Protein Ekspresyonu

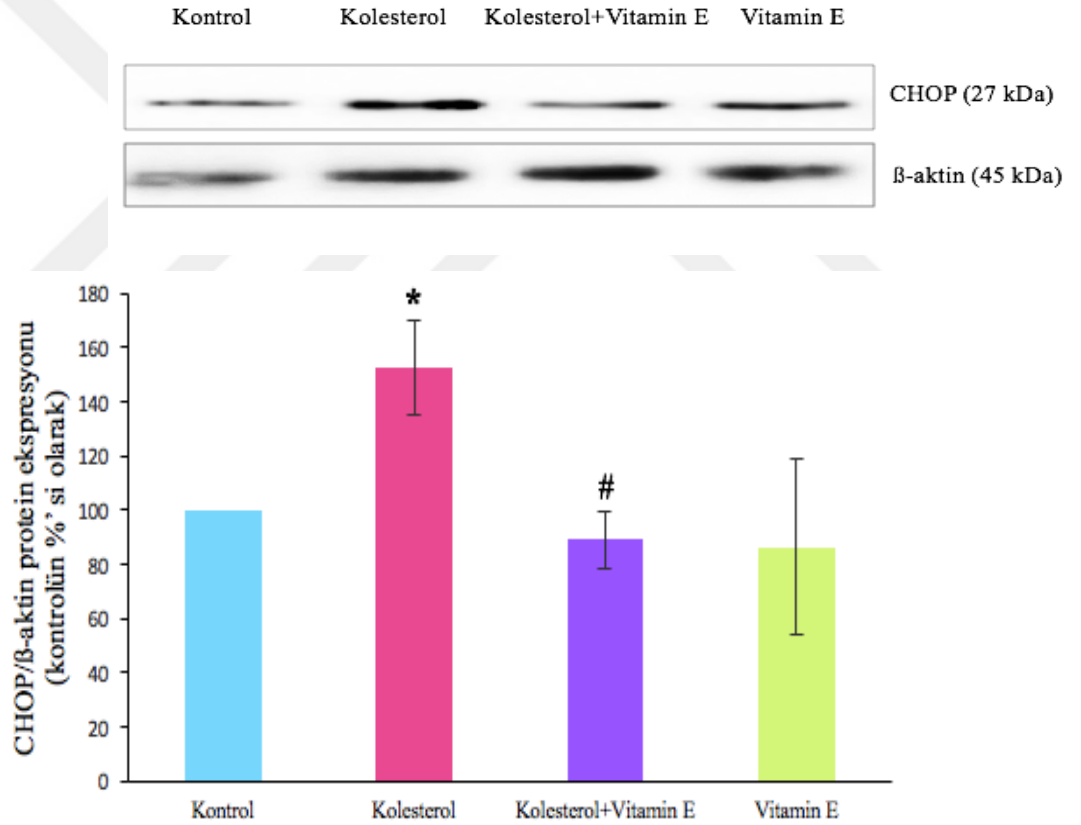
Kolesterol ve vitamin E' nin ER stres üzerine etkisini incelemek amacı ile immunoblotlama tekniği kullanılarak şekil 6.4 te gösterilen fosfo-PERK protein ekspresyonu tespit edilerek β -aktin' e göre normalize edildi. Kontrol grubundaki fosfo-PERK protein ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildiğinde şekil 6.4 teki grafikte gösterildiği gibi Kolesterol grubu $142,13 \pm 46,02$, Kolesterol+Vitamin E grubu $177,30 \pm 28,49$, Vitamin E grubu ise $131,59 \pm 37,68$ olarak tespit edildi. Sonuç olarak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 6.4. Karaciğer dokusunda fosfo-PERK protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($n=3$) ($p>0,05$).

6.8. Karaciğer Dokusunda CHOP Protein Ekspresyonu

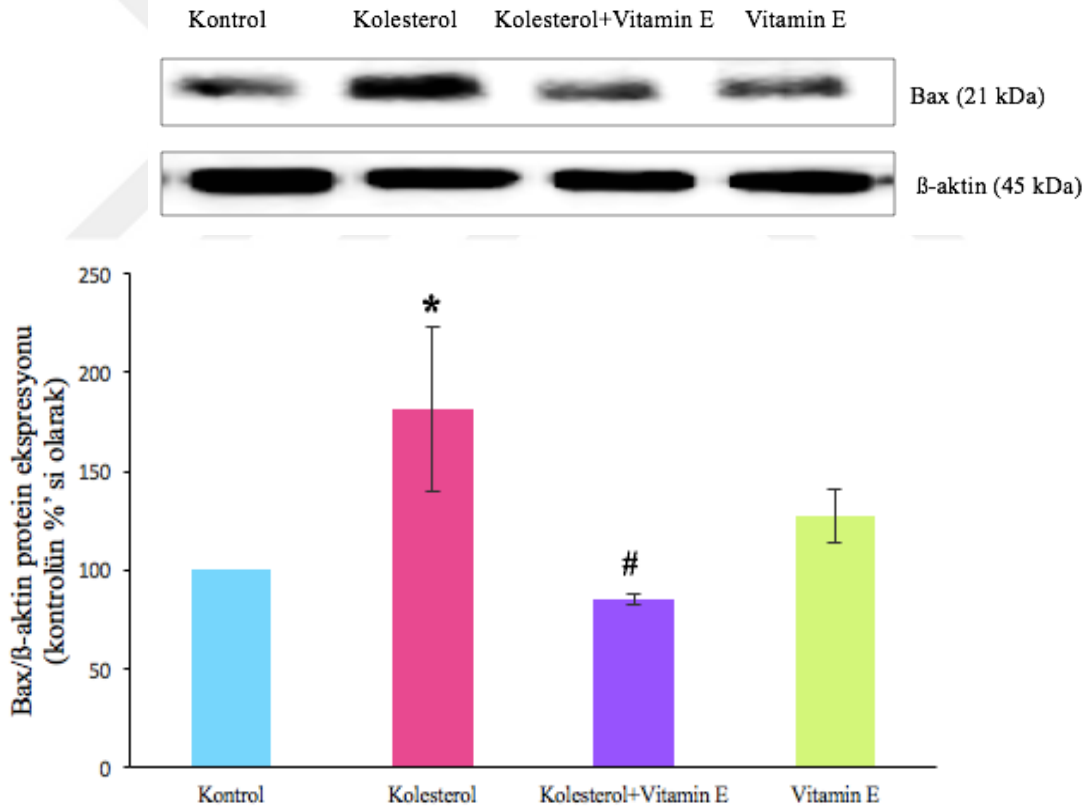
Kolesterol ve vitamin E' nin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini incelemek amacı ile immunoblotlama tekniği kullanılarak şekil 6.5 de gösterilen CHOP protein ekspresyonu tespit edilerek β -aktin' e göre normalize edildi. Kontrol grubundaki CHOP protein ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildiğinde şekil 6.5 teki grafikte gösterildiği gibi Kolesterol grubu $152,86 \pm 17,33$, Kolesterol+Vitamin E grubu $89,13 \pm 10,64$, Vitamin E grubu ise $86,53 \pm 32,26$ olarak tespit edildi. Sonuç olarak 8 hafta sonunda kolesterol grubunda CHOP protein ekspresyonunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yaklaşık 1.5 kat arttığı bulundu. Kolesterol+Vitamin E grubunda ise anlamlı olarak kolesterol grubuna göre CHOP protein ekspresyonunun daha düşük seviyelerde olduğu bulundu.



Şekil 6.5. Karaciğer dokusunda CHOP protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü. Kolesterol grubu, kontrol ve kolesterol+vitamin E grubu ile kıyaslandığında $*\#p<0,05$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3).

6.9. Karaciğer Dokusunda Bax Protein Ekspresyonu

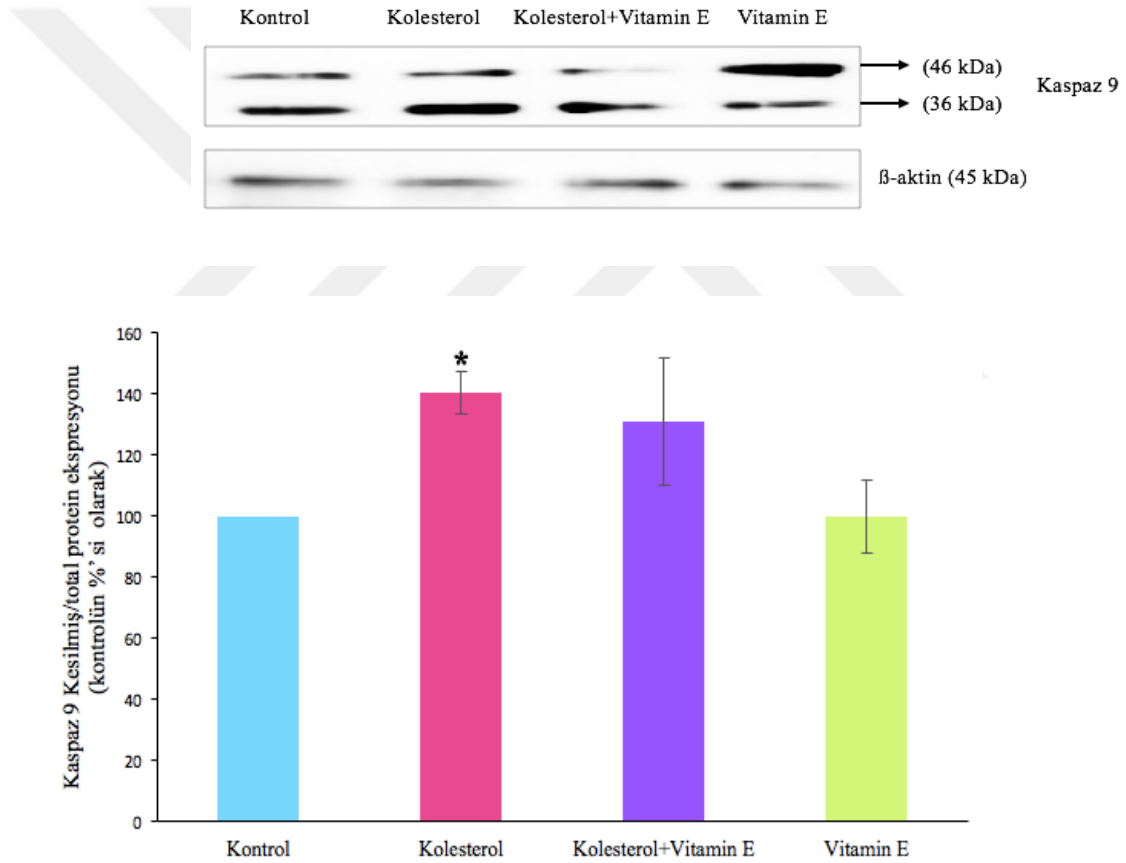
Kolesterol ve vitamin E' nin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini incelemek amacı ile immunoblotlama tekniği kullanılarak şekil 6.6 da gösterilen Bax protein ekspresyonu tespit edilerek β -aktin' e göre normalize edildi. Kontrol grubundaki Bax protein ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar diğer gruplar değerlendirildiğinde şekil 6.6 daki grafikte gösterildiği gibi Kolesterol grubu $181,49 \pm 41,84$, Kolesterol+Vitamin E grubu $84,74 \pm 2,8$, Vitamin E grubu ise $127,32 \pm 13,9$ olarak tespit edildi. Sonuç olarak kolesterol grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu. Kolesterol+Vitamin E grubunda ise kolesterol grubuna göre protein ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı yaklaşık olarak yarı yarıya azaldığı tespit edildi.



Şekil 6.6. Karaciğer dokusunda Bax protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü. Kolesterol grubu, kontrol grubu ve kolesterol+vitamin E grubu kıyaslandığında *# $p < 0,05$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3).

6.10. Karaciğer Dokusunda Kaspaz 9 Protein Ekspresyonu

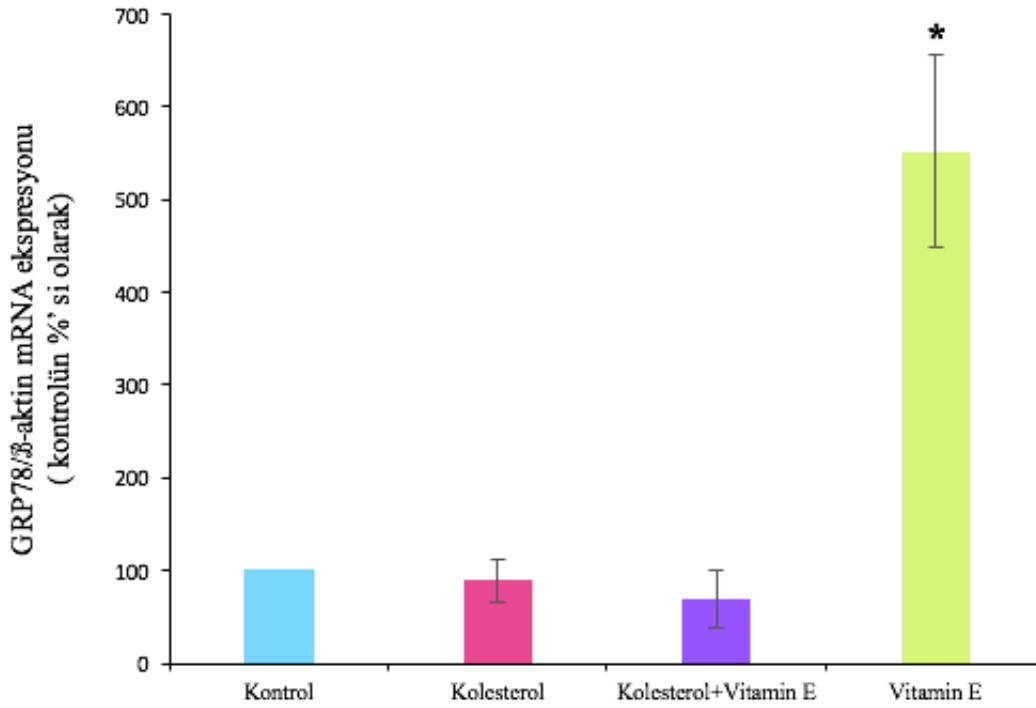
Kolesterol ve vitamin E' nin apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini incelemek amacı ile immunoblotlama tekniği kullanılarak şekil 6.7 de gösterilen kaspaz 9 kesilmiş / kesilmemiş protein ekspresyonu tespit edilerek β -aktin' e göre normalize edildi. Kontrol grubundaki protein ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar şekil 6.7 deki grafikte gösterildiği gibi Kolesterol grubu $140,46 \pm 6,94$, Kolesterol+Vitamin E grubu $130,86 \pm 20,67$, Vitamin E grubu ise $99,57 \pm 11,9$ olarak tespit edildi. Sonuç olarak 8 hafta sonunda kolesterol grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kolesterol grubunda yaklaşık 1,4 kat artış bulundu.



Şekil 6.7. Karaciğer dokusunda kesilmiş/kesilmemiş kaspaz 9 protein ekspresyonu ve her deney grubunu temsil eden bandların görüntüsü. Kolesterol grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında * $p < 0,001$ (n=3) .

6.11. Karaciğer Dokusunda GRP78 mRNA Ekspresyonu

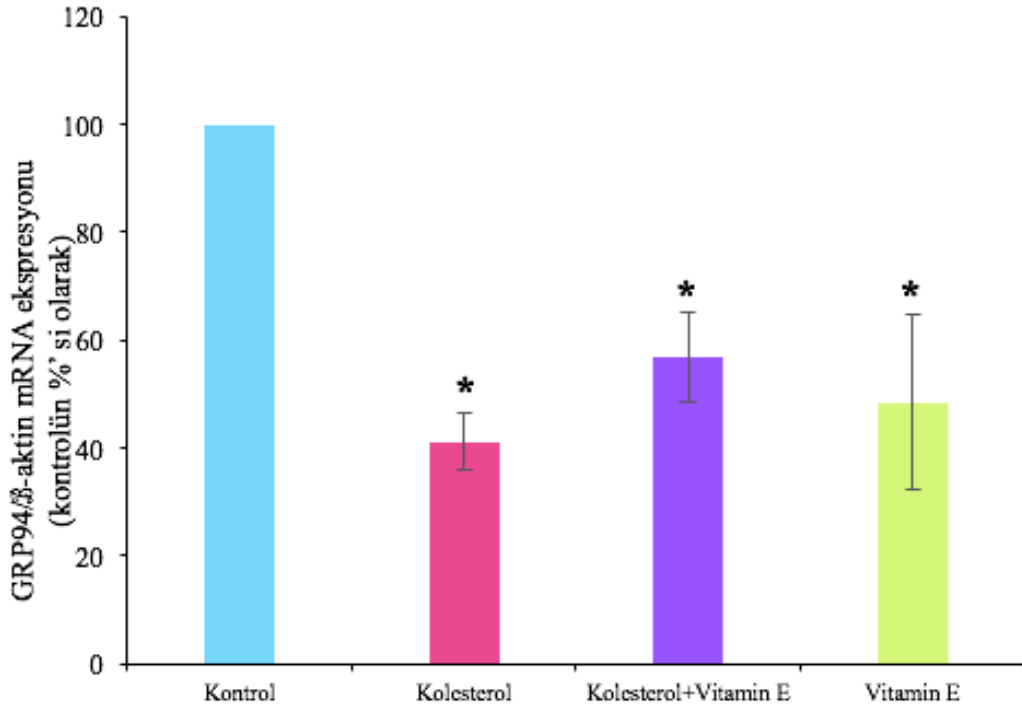
Kolesterol ve vitamin E' nin ER stres üzerine gen ekspresyonu düzeyinde etkisini inceleyebilmek için qPCR yöntemiyle GRP78 mRNA ekspresyonuna bakıldı. Referans gen olarak β -aktin geni kullanıldı. Kontrol grubundaki gen ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar analiz edildiğinde şekil 6.8 deki grafikte gösterdiği gibi vitamin E verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yaklaşık 50 kat bir artış bulundu.



Şekil 6.8. Karaciğer dokusunda GRP78 gen ekspresyonunun değerlendirilmesi. Vitamin E grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında $^{\dagger}p<0,001$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3).

6.12. Karaciğer Dokusunda GRP94 mRNA Ekspresyonu

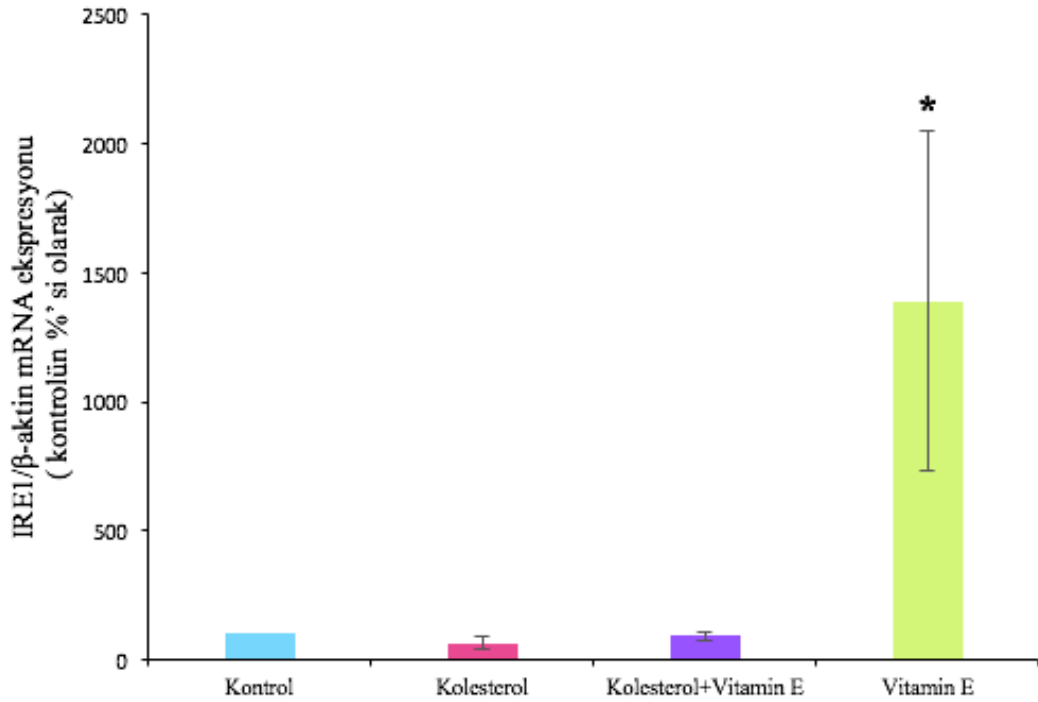
Kolesterol ve vitamin E' nin ER stres üzerine gen ekspresyonu düzeyinde etkisini inceleyebilmek için qPCR yöntemiyle GRP94 mRNA ekspresyonuna bakıldı. Referans gen olarak β -aktin geni kullanıldı. Kontrol grubundaki gen ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar analiz edildiğinde şekil 6.9 daki grafikte gösterildiği gibi grupların GRP94 mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yaklaşık 1/4 oranında azaldığı bulundu.



Şekil 6.9. Karaciğer dokusunda GRP94 gen ekspresyonunun değerlendirilmesi. Gruplar, kontrol grubu ile kıyaslandığında * $p < 0,05$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3).

6.13. Karaciğer Dokusunda IRE1 mRNA Ekspresyonu

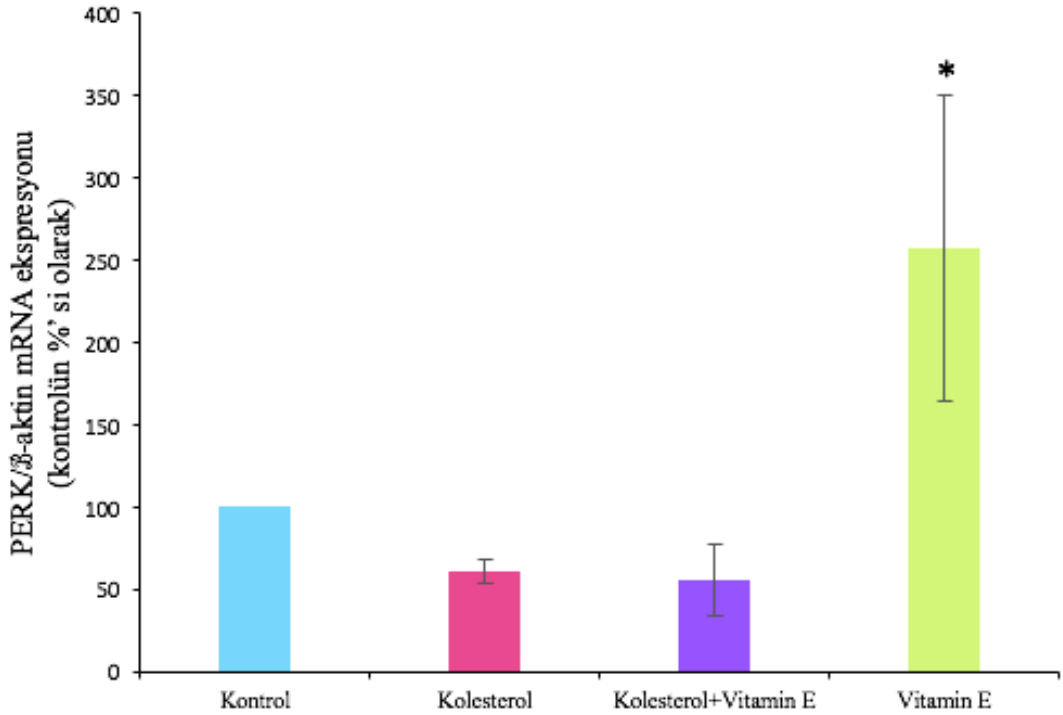
Kolesterol ve vitamin E' nin ER stres üzerine gen ekspresyonu düzeyinde etkisini inceleyebilmek için qPCR yöntemiyle IRE1 mRNA ekspresyonuna bakıldı. Referans gen olarak β -aktin geni kullanıldı. Kontrol grubundaki gen ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar analiz edildiğinde şekil 6.10 daki grafikte gösterildiği gibi vitamin E grubundaki IRE1 mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yaklaşık 15 kat arttığı bulundu.



Şekil 6.10. Karaciğer dokusunda IRE1 gen ekspresyonun değerlendirilmesi. Vitamin E grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında * $p < 0,01$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3).

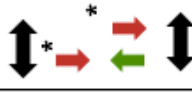
6.14. Karaciğer Dokusunda PERK mRNA Ekspresyonu

Kolesterol ve vitamin E' nin ER stres üzerine gen ekspresyonu düzeyinde etkisini inceleyebilmek için kantitatif PCR yöntemiyle PERK mRNA ekspresyonuna bakıldı. Referans gen olarak β -aktin geni kullanıldı. Kontrol grubundaki gen ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar analiz edildiğinde şekil 6.11 deki grafikte gösterildiği gibi vitamin E grubundaki PERK mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yaklaşık 2,5 kat arttığı tespit edildi.



Şekil 6.11. Karaciğer dokusunda PERK gen ekspresyonunun değerlendirilmesi. Vitamin E grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında, * $p < 0,01$, ortalama $\pm$ standart sapma, (n=3).

Tablo 6.3: Yüksek Kolesterolü diyet ile oluşturulan NAYKH modelinde immunoblotlama ve qPCR sonuçlarının özeti (*Kolesterol grubu kolesterol+ vitamin E grubu ile kıyaslandığında).

Belirteçler	Gruplar		
	Kolesterol	Kolesterol + Vitamin E	Vitamin E
ER STRES <i>(protein düzeyleri)</i> GRP78(BIP) GRP94 pIRE1 pPERK			
Apoptoz <i>(protein düzeyleri)</i> Bax CHOP Kaspaz 9			
ER STRES <i>(mRNA düzeyleri)</i> GRP78(BIP) GRP94 IRE1 PERK			

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı karaciğerde görülen metabolik sendromların arasında en yaygın olanıdır. NAYKH iki hit hipotezi ile açıklanmaktadır. İlk hit hepatositlerde trigliserit birikmesiyle oluşan hepatik steatozistir. İkinci hit ise inflamasyon, oksidatif stres, apoptotik hücre ölümünün görüldüğü evre olarak açıklanmaktadır.

Kolesterol bakımından zengin bir diyet hücresel düzeyde birçok değişikliğe sebep olabilir. Serbest yağ asidi, diaçilgliserol, fosfolipit ve serbest kolesterolden oluşan toksik lipidlerin birikmesi ER stres ve oksidatif stres gibi hücresel stres yollarını aktive edebilmektedir. Gecikmiş ve/veya yetersiz ER stres cevabı fizyolojik koşulları lipid birikimi, insülin direnci, inflamasyon, apoptoz gibi NAKYH' nın patogeneğinde önemli rol oynayan patolojik sonuçlara neden olmaktadır. Bu nedenle NAYKH' da ER stres mekanizmasının aydınlatılması önem taşımaktadır.

ER, fonksiyonu bakımından SERCA tarafından kontrol edilen yüksek konsantrasyonda kalsiyum iyonuna sahiptir. SERCA ve diğer ER enzimleri ER membranın kolesterol içeriğinden etkilenmektedir. Aşırı kolesterol birikimi bu enzimlerin konformasyonel değişikliğe yol açarak inhibisyonlarına neden olmaktadır (Musso ve ark., 2013). ER stres ve oksidatif stresin artması veya engellenememesi hastalığın hepatik stetatozis, inflamasyon ve fibrozise ilerlemesinde etkilidir.

Bu çalışmamızda %2 kolesterol içeren diyet ile oluşturulan NAYKH modelinde ER stresin lipid birikimi ve apoptotik hücre ölümü üzerindeki etkileri incelendi. ER stres belirteçleri olan fosfo IRE, fosfo PERK, GRP94, GRP78 ve apoptotik yolda görev alan CHOP, Bax, kaspaz 9 ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Vitamin E' nin bu ekspresyonlar üzerindeki etkisi araştırıldı. Çalışmamızda, 8 hafta süre ile tavşanlara normal diyet (kontrol grubu), %2 kolesterol içeren diyet (kolesterol grubu), kolesterol içeren diyete ek olarak vitamin E (kolesterol+vitamin E grubu) ve sadece diyetle birlikte vitamin E (vitamin E grubu) verildi. Deney sonunda kolesterol verilen tavşanların serum kolesterol düzeylerinin yaklaşık 40 kat kadar artmış olması ve karaciğerde lipid birikimin görülmesi NAYKH

modelinin oluşturulabildiğini göstermektedir . Tavşanlara 8 hafta süre boyunca vitamin E verilmesi ile vitamin E düzeylerinin kontrol grubuna göre kolesterol ve vitamin E gruplarında anlamlı bir şekilde yaklaşık 10 kat arttığı gözlenmiştir. Yağda çözünen bir vitamin olan vitamin E'nin LDL içerisinde taşınmasından dolayı Vitamin E'den fakir beslenen kolesterol grubunda artan LDL değerlerine paralel bir şekilde vitamin E değerlerinin normalden yüksek çıktığı görülmüştür.

Daha önce sıçanlar ile yapılan çalışmada 8 hafta boyunca kolesterol içeren diyetle beslenmenin lipit birikimine neden olduğu gösterilmiştir (Fan ve ark., 2003). Çalışmamızdaki karaciğer makroskopik görüntülerin bulguları kolesterol içeren diyet ile beslenmenin lipit birikimine neden olduğunu desteklemektedir. 8 hafta süre ile %2 kolesterol içeren diyetle beslenen grubun karaciğerlerinde yağlanma ve nodüler yapıların olduğu tespit edildi, buna karşılık kolesterol ile birlikte vitamin E verilen grupta ise yağlanma seviyesinde azalma olduğu görüntülendi. Kontrol ve sadece vitamin E verilen gruplar arasında lipit birikiminin olmadığı benzer görüntüler elde edildi. Bu sonuçlar yüksek miktarda kolesterol içeren diyet ile beslenmenin NAYKH patogenezindeki ilk basamak olan lipit birikimine neden olduğunu göstermiştir.

ER, fonksiyonu bakımından membran ve salgı proteinlerinin yapımı, post translasyonel modifikasyonu, lipit biyosentezi ve intrasellüler kalsiyum iyonu homestazından sorumludur. UPR/ER stres cevabı patolojik koşulların oluşması ve korunmasında önemli rol almaktadır. Kronik ER stresin lipotoksisteye, insülin direncine, inflamasyona, apoptotik hücre ölümüne neden aldığı bilinmektedir. ER, aynı zamanda protein katlanmasının da kontrol merkezi olarak geçmektedir. Diğer salgı hücreleri gibi hepatositlerde ER bakımından zengin hücrelerdir. Yapılan çalışmalar da ER stresin hepatik lipit birikimi ve lipogeneze sebep olduğunu gösterilmiştir (Ozcan, 2004; Lee ve ark., 2008). Genetik faktörler veya diyetle birlikte indüklenen NASH hastalarında ER stresin rol aldığını gösteren birçok çalışma mevcuttur (Ozcan ve ark., 2004). UPR sinyal moleküllerinin hücre kültürü ve hayvan modelleri çalışmalarında lipit metabolizmasında fonksiyonu olduğu bulunmuştur (Angulo ve ark., 2002).

NAYKH' nın gelişiminin ilk basamağı makrovesiküller halinde triaçilgliserollerin hepatosit sitoplazmasında birikmesiyle oluşan hepatik steatozistir. Hepatik steatozis

PERK-eIF2 α -ATF4 yolağı tarafından regüle edilmektedir. PERK delesyonu lipojenik enzimler olan yağ asidi sentaz, ATP sitrat liyazı, sterol CoA desaturazı inhibe ettiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2008). eIF2 α fosforilasyonu adipojenik nükleer reseptör peroksizom proliferatör aktivasyon gamma (PPAR γ) ekspresyonunu azaltmaktadır (Wang ve ark., 2010). ATF-4 geni susturulmuş farelerin ise hiperglisemi, obezite ve hepatik steatozisten korunduğu tespit edilmiştir (Brunt ve ark., 2001). Hepatosit spesifik IRE1 delesyonuna sahip farelerde ER stres indükleyici ajanlar uygulanmasıyla hepatik steatozis oluşumunun tetiklendiği gözlemlenmiştir (Zhang ve ark., 2011). Ayrıca, ER stres indükleyici ajan olan tunikamisin ve thapsigargin farelere uygulandığında, hepatik lipit birikimi tespit edilmiştir (Li ve ark., 2009). Bir çok çalışmada palimitat ve diğer doymuş yağ asitlerinin karaciğerde UPR aktive ettiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2006). Bu bilgiler ışığında ER stres ile lipit birikimi arasında pozitif bir geri bildirim mekanizması mevcuttur. ER stres lipit birikimini indüklediği gibi, lipit birikimi de ER stresi indüklemektedir (Ahn ve ark., 2007). Tüm bu bilgiler, çalışmamızın sonucu ile ilişkili olmakla beraber, yüksek kolesterolü diyet ile beslenmenin hücrelerde stres koşullarına neden olduğu ve bunun bir sonucu olarak da ER stres düzeylerinin artmasıyla NAYKH patogeneze yol açtığı gösterilmektedir. Çalışmamızda oluşturulan NAYKH modeli sonucu, karaciğer dokusu üzerindeki, ER stres ve ilişkili apoptotik aktivite immüno blotlama tekniği ile incelenmiştir. Fosfo-IRE1 protein ekspresyonu kontrol grubuna göre diğer gruplar kıyaslandığında yaklaşık 1,5 kat artmaktadır ($p<0,001$), kolesterol+vitamin E grubu kolesterol grubu ile karşılaştırıldığında ise yaklaşık olarak 3/2 oranında azalmaktadır. ER şaperonu olan Grp94 protein ekspresyonu kolesterol grubunda kontrol grubuna oranla yaklaşık olarak 2,5 kat istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır ($p<0,001$). Grp94 protein ekspresyonunda görülen bu artışın, kolesterol+vitamin E grubunda kolesterol grubuna göre kıyaslandığında, kontrol seviyelerine kadar azaldığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi. ($p<0,001$). Diğer ER şaperonu olan GRP78 protein ekspresyonu ise kontrol grubu kolesterol ve vitamin E grupları ile kıyaslandığında yaklaşık 1,5 kat arttığı bulundu ($p<0,001$). Bir diğer ER stres sensörü olan pPERK protein ekspresyonu kontrol grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı. Yüksek kolesterolü diyet ile oluşturulan NAYKH' da lipit birikiminin ER strese neden olduğu ve bunun sonucunda ER stres

sensörlerini aktive ederek UPR aktivasyonunu tetiklediği diğer yandan da katlanma kapasitesinin artırılması için GRP94 ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Aynı zamanda, kolesterolle beraber verilen vitamin E' nin ER stres yanıt proteinlerini kontrol grubu seviyesine düşürdüğü gösterilmiştir.

ER strese hücrenin verdiği ilk cevap GRP78, GRP94 şaperon ekspresyonlarını artırarak katlanma kapasitesini arttırmaktır. Eğer bu cevap yeterli gelmez ise ve hücrenin strese maruz kaldığı süre ve stresin şiddeti fazla olduğu zamanlarda hücre proteazom, otofaji gibi yıkım yollarını devreye sokmaktadır. Bu yollarında yeterli gelmemesi durumunda hücrede apoptotik ölüm yolağı aktive olmaktadır. Bizim çalışmamızda da GRP78, IRE1, PERK mRNA ekspresyonları bakıldığında kolesterol verilen grupta kontrol grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ve bu sonuçlara bağlı olarak hücrenin transkripsiyonel düzeyde kontrol aşamasının geçildiği söylenebilir. Vitamin E grubunda ise kontrol grubuna göre kıyaslandığında PERK te 2,5 kat, IRE1 de 15 kat, GRP78 de ise 50 kat arttığı bulunduğu ($p<0,01$) ve vitamin E'nin bu genler üzerinde direkt olarak etkisi olduğu görülmektedir.

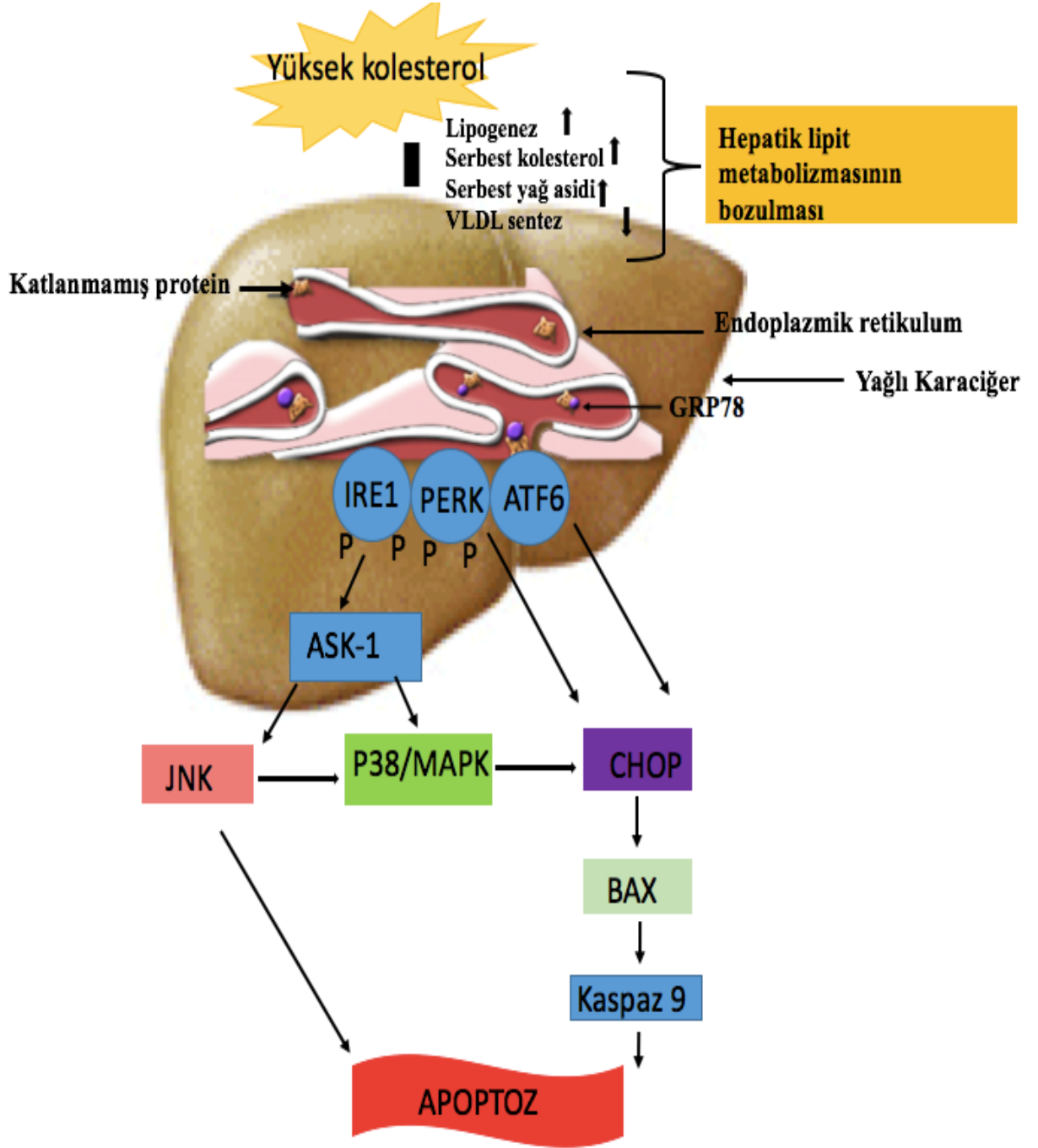
Yetersiz ve/veya uzun süreli strese maruz kalmış UPR cevabında apoptotik hücre ölümü devreye girmektedir. ER stres ile aktive olan apoptotik hücre ölümü birçok patolojik durumla ilişkilendirilmiştir. Apoptotik hücre ölümü ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki farklı yolk ile aktive olmaktadır. Apoptotik hücre ölümünde mitokondri önemli rol oynamaktadır. Artan stres koşullarında oluşan uyarı mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c'nin salınmasıyla apoptozom oluşumunu tetikleyerek kaspaz 9 üzerinden kaspaz 3'ü aktifleştirir ve apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmesine sebep olur.

ER stresin indüklediği apoptotik hücre ölümünün gösterildiği birçok çalışma mevcuttur. CHOP geninin susturulması sonucunda alkol ile indüklenmiş karaciğer hastalıklarında hepatosit apoptozunun inhibe olduğu gösterilmiştir (Ji ve ark., 2005). IRE1 fosforilasyonunun artması ise TRAF2 proteini üzerinden kaskat şeklinde JNK yolağını aktive eder ve apoptozu indükler. IRE1 aynı zamanda ER membranı ve mitokondri membranıyla ilişkili olan proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinden Bak ve Bax aktivasyonuna neden olarak hücreyi apoptoza götürmektedir. Yapılan çalışmalarda

Bak ve Bax geni eksik olan farelerin ER stres ile ilişkili apoptoza karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir (Milic ve ark., 2012).

Çalışmamızın sonuçları bu bilgiler ile uyum sağlayarak NAYKH patogenezinde ER stresin apoptozu indüklediğini göstermektedir. Çalışmamızda, apoptoz belirteci olan CHOP ve Bax protein ekspresyonlarının kolesterol grubunda kontrole grubuna göre yaklaşık 1,5 kat istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır ($p<0.05$). CHOP ve Bax protein ekspresyonlarında görülen bu artış ise kolesterol+vitamin E grubunda kolesterol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde yaklaşık 1,5 kat azalmaktadır ($p<0.05$). Bu sonuçlar, yüksek kolesterol içeren diyetin ER stresin yol açtığı apoptotik aktivitenin arttığını ve vitamin E' nin ise bu süreçte koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada, yüksek kolesterol diyeti ile indüklenerek oluşturulan NAYKH gelişiminde şekil 7.1 de gösterildiği gibi ER stres ve apoptotik hücre belirteçleri olan fosfo-IRE1, Grp94, CHOP ve Bax proteinlerinin etkili olduğu ve birbirleri ile ilişkileri gösterilmiştir. Bu süreçte vitamin E' nin ER stres ile apoptotik hücre ölümü belirteçlerini ve gen ekspresyonları etkileyerek rol oynadığı düşünülmektedir.



Şekil 7.1: Yüksek kolesterolü diyet ile gelişen NAYKH' nın moleküler mekanizmasının modeli.

8. KAYNAKLAR

Adams J. M. and Cory S.. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Bio.* 2002;14:715-720.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato, KA. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* . 2009; 120: 1640–1645.

Alexis JD, Wang N, Che W, Lerner-Marmarosh N, Sahni A, Korshunov VA, Zou Y, Ding B, Yan C, Berk BC, Abe J. Bcr kinase activation by angiotensin II inhibits peroxisome-proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 2009; 104(1): 69-78.

Adinolfi LE, Restivo L. Does vitamin E cure non-alcoholic steatohepatitis? *Expert Rev. Gastroenterol Hepatol.* 2011; 5:147-150.

Aggarwal BB, Kohr WJ. Human tumor necrosis factor. *Methods Enzymol.* 1985; 116: 448-456.

Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B: from clone to clinic. *Curr.Mol.Med.* 2007; 5: 619-637.

Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J.* 1995; 309: 299-306.

Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 5: 186-90.

Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev.Gastroenterol.Mex.* 2005; 70: 52-56.

Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G. Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig.Dis.Sci.* 2000; 45: 1929-1934.

Azzi A, Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog Lipid Res.* 2000; 39: 231-55.

Bieghs V, Wouters K, Van Gorp PJ, Gijbels MJ, De Winther MP, Binder CJ, Lutjohann D, Febbraio M, Moore KJ, Van Bilsen M, Hofker MH, Shiri-Sverdlov R. Role of scavenger receptor A and CD36 in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. *Gastroenterology.* 2010; 138: 2477-2486.

Barreiro FJ, Kobayashi S, Bronk SF, Werneburg NW, Malhi H, Gores GJ. Transcriptional regulation of Bim by FoxO3A mediates hepatocyte lipoapoptosis. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 27141–27154.

Bellentani S, Bedogni G, Miglioli L, Tiribelli C., The epidemiology of fatty liver. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol.* 2004; 16: 1087–1093.

Bobrovnikova-Marjon E, Hatzivassiliou G, Grigoriadou C, Romero M, Cavener DR, Thompson CB, Diehl JA. PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105: 16314-16319.

Bozaykut P, Sahin A, Karademir B, Ozer NK. Endoplasmic reticulum stress related molecular mechanisms in nonalcoholic steatohepatitis. *Mechanisms of Ageing and Development.* 2016; 157: 17-29.

Bissell Dm RJ. Connective Tissue Metabolism And Hepatic Fibrosis. In: Zakim D, B. T. *Hepatology* 1 st ed. 1992 p:18-25.

Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis.* 2001; 2: 3-16.

Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest.* 2003; 83: 655-663.

Cazanave SC, Mott JL , Elmi NA, Bronk SF, Werneburg NW, Akazawa Y. JNK1-dependent PUMA expression contributes to hepatocyte lipopapoptosis J. Biol. Chem. 2009; 284: 26591–26602.

Cohen JC, Horton JD , Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. Science. 2011; 332: 1519–1523.

Clark JM, Diehl AM. Defining nonalcoholic fatty liver disease: implications for epidemiologic studies. Gastroenterology. 2003; 124: 248–250.

Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, and Brenner C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. Oncogene. 2008; 27: 285–299.

Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. J. Clin. Investig. 2005; 115: 134-351.

Erhardt A, Stahl W, Sies H, Lirussi F, Donner A, Haussinger D. Plasma levels of vitamin E and carotenoids are decreased in patients with Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) European journal of medical research. 2011; 16(2): 76–8.

Ellgaard L, Helenius A. Quality Control in the Endoplasmic Reticulum. Molecular and Cellular Biology. 2003; 4: 181-191.

Egnatchik RA, Leamy AK, Jacobson DA, Shiota M Young JD. ER calcium release promotes mitochondrial dysfunction and hepatic cell lipotoxicity in response to palmitate overload. Mol. Metab. 2014; 3: 544–553.

Evans HM, Bishop KS. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction Science. 1992; 56: 650–651.

Fan JG, Xu ZJ, Wang GL, Ding XD, Tian LY, Zheng XY. Change of serum endotoxin level in the progress of nonalcoholic steatohepatitis in rats. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 2003; 11: 73-76.

Favaloro B., Allocati N., Graziano V., Di Ilio C., and De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. Aging, 2012; 4: 330-49.

Galli F, Azzi A, Birringer M, Cook-Mills JM, Eggersdorfer M, Frank J, Cruciani G, Lorkowski S, Özer NK. Vitamin E: Emerging aspects and new directions. 2017; 102: 16-36.

Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2006.

Handford RT, Briggs MD. The unfolded protein response and its relevance to connective tissue diseases Cell Tissue Res. 2010; 39: 197-211.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, and Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature. 2002; 420: 333–336.

Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. Int J Obes Relat Metab Disord . 2003; 3: 53–55.

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. Cell. 1995; 81: 495–504.

Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. Cell. 1996; 84: 299–308.

Jiang Q, Ames BN. Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. FASEB J. 2003; 17(8): 816-22.

Kerr, J. F, Wyllie, A. H, Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, Br J Cancer. 1972; 26 (4): 239-57.

Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. Nature. 2004; 427: 461–5.

Li G, Mongillo M, Chin KT, Harding H, Ron D, Marks AR, and Tabas I. Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. J Cell Biol. 2009; 186: 783–792.

Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. ER stress and neurodegenerative diseases
Cell Death Differ. 2006; 13: 385–392

Lavine JE. Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: a
pilot study. J Pediatr .2000; 136(6): 734-8.

Luciani DS, Gwiazda KS, Yang TL, Kalynyak TB, Bychkivska Y, Frey MH.
Roles of IP3R and RyR Ca²⁺ channels in endoplasmic reticulum stress and beta-cell
death Diabetes. 2009; 58: 422–432.

Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, and Hendershot LM. Two distinct stress signaling
pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein
response. J Mol Biol. 2002; 318: 1351–1365.

Munteanu A, Taddei M, Tamburini I, Bergamini E, Azzi A, Zingg JM.
Antagonistic Effects of Oxidized Low Density Lipoprotein and α -Tocopherol on
CD36 Scavenger Receptor Expression in Monocytes. J Biol Chem. 2006; 281(10):
6489-97

Ma K, Vatter KM., &Wek RC. Dimerization and release of molecular
chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in
response to endoplasmic reticulum stress. J. Biol. Chem. 2002; 277(21): 18728–18735.

Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of
two deaths? Hepatology. 2006; 43: 31-44.

Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. J.
Hepatology. 2011; 54: 795-809.

Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. ERAD: the long road to destruction.
Nat. Cell Biol. 2005; 7: 766–772.

Milic S, Stimac D. Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology,
pathogenesis, clinical presentation and treatment. Dig. Dis. 2012 ; 30: 158-162.

Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. A meta-analysis of randomized
trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 2010; 52(1): 79-
104.

Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog. Lipid Res.* 2013; 52: 175-191.

Nakagawa T. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum- specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2000; 403: 98–103.

Nakagawa T and Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families: activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 2000; 150: 887–894.

Nonomura A, Mizukami Y, Unoura M, Kobayashi K, Takeda Y, Takeda R, Clinicopathologic study of alcohol-like liver disease in non-alcoholics; non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Gastroenterol Jpn.* 1992; 27: 521–528.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004; 306: 457–461.

Ozer NK, Negis Y, Aytan N, Villacorta L, Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E inhibits CD36 scavenger receptor expression in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis.* 2006; 184:15–20.

Ozer NK, Azzi A. Effect of vitamin E on the development of atherosclerosis. *Toxicology.* 2000; 148: 179–85.

Ozer NK, Palozza P, Boscoboinik D, et al. Tocopherol inhibits low density lipoprotein induced proliferation and protein kinase C activity in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1993; 322: 307–310.

Parola M, Muraca R, Dianzani I, Barrera G, Leonarduzzi G, Bendinelli P, Piccoletti R, Poli, G. Vitamin E dietary supplementation inhibits transforming growth factor beta 1 gene expression in the rat liver. *FEBS Lett.* 1992; 308(3): 267-270.

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature.* 1984; 312(5996): 724-729.

Pfutzner A, Marx N, Lubben G, Langenfeld M, Walcher D, Konrad T, Forst T. Improvement of cardiovascular risk markers by pioglitazone is independent from glycemic control: results from the pioneer study. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2005; 45(12): 1925-1931.

Phung N, Pera N, Farrell G, Leclercq I, Hou JY, George J. Pro-oxidant-mediated hepatic fibrosis and effects of antioxidant intervention in murine dietary steatohepatitis. *Int.J.Mol.Med.* 2009; 24(2): 171-180.

Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest.* 2009; 119(1): 136–145.

Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J.Gastroenterol. Hepatol.* 2007; 1: 20–27.

Reubold T. F. and Eschenburg S., A molecular view on signal transduction by the apoptosome. *Cellular Signalling*, 2012; 24: 1420-1425.

Ron D. Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8: 519–529.

Rutkowski DT, Wu J, Back SH, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, Clark R, Miao H, Hassler JR, Fornek J, Katze MG, Hussain MM, Song B, Swathirajan J, Wang J, Yau GD, and Kaufman RJ. UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev Cell.* 2008; 15: 829–840.

Shi Y. Apoptosome: The Cellular Engine for the Activation of Caspase-9. *Structure.* 2002; 10: 285-288.

Schroder M, & Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* 2005; 569(1–2): 29–63.

Sozen E, Ozer NK. Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review. 2017; 12: 456-461.

Sozen E, Karademir B, Yazgan B, Bozaykut P, Ozer NK. Potential role of proteasome on c-jun related signaling in hypercholesterolemia induced atherosclerosis. *Redox Biology* 2014; 2: 732–738.

Tait J. F. Imaging of Apoptosis. *Journal of Nuclear Medicine*. 2008; 49: 1573-1576.

Traber MG. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr*. 2007; 27: 347–362.

Tran K, Lee E, Wong J. Vitamin E (alpha-tocopherol) enhances arachidonic acid release in rat heart myoblastic cells through the activation of cytosolic phospholipase A2. *Adv Exp Med Biol*. 1997; 407: 123-129.

Timothy H, Fiona O, Quentin M, Anstee P, Christopher P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annu. Rev. Physiol*. 2016 ; 78: 181-205.

Tiniakos DG, Vos MB, and Brunt EM, Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis, *Annual Review of Pathology. Mechanisms of Disease*. 2010; 5:145-171.

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1 *Science*. 2000; 287: 664-666.

Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. RRR-alpha-tocopherol decreases the expression of the major scavenger receptor, CD36, in human macrophages via inhibition of tyrosine kinase (Tyk2). *Atherosclerosis*. 2004; 175(2): 213-20.

Vembar SS, Brodsky JL . One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2008; 9 : 944–957.

Xiao G, Zhang T, Yu S, Lee S, Calabuing-Navarro V, Yamauchi J, Ringquist S, Dong HH. ATF4 protein deficiency protects against high fructose-induced hypertriglyceridemia in mice. *J Bio. Chem*. 2013; 288 : 25350–25361.

Wang C, Huang Z, Du Y, Cheng Y, Chen S, Guo F. ATF4 regulates lipid metabolism and thermogenesis. *Cell Res*. 2010; 20 : 25350–25361.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003; 10: 45–65.

Wieckowska A, Zein N, Yerian LM, Lopez AR, McCullough AJ, Feldstein AE In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease *Hepatology.* 2006; 44: 27–33.

Won D, SN Zhu, M Chen, AM Teichert, JE Fish, CC Matouk, M Bonert, M Ojha, PA Marsden, and MI Cybulsky. Relative reduction of endothelial nitric-oxide synthase expression and transcription in atherosclerosis- prone regions of the mouse aorta and in an in vitro model of disturbed flow. *Am. J. Pathol.* 2007; 171: 1691–1704.

Wolf g. The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill J. *Nutr.* 2005; 135: 363–366.

Wu D, Koga T, Martin KR. Effect of vitamin E on human aortic endothelial cell production of chemokines and adhesion to monocytes. *Atherosclerosis.* 1999; 147: 297–307.

Young B, Heath JW. Wheater's Functional Histology a Text and Colour Atlas, 4th edn. Edinburgh, Churchill Livingstone. 2001:133.

Zeng L, A Zampetaki, A. Margariti, AE Pepe S Alam, D Martin Q. Xiao W Wang, ZG Jin, G Cockerill, et al. Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in response to disturbed flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106: 8326–8331.

Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature.* 2008; 454: 455–462.

Zhang Y, Wahl LM. Synergistic enhancement of cytokine-induced human monocyte matrix metalloproteinase-1 by C-reactive protein and oxidized LDL through differential regulation of monocyte chemotactic protein-1 and prostaglandin E2. *J Leukoc Biol.* 2006; 79(1): 105-13.

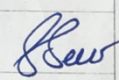
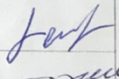
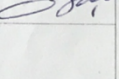
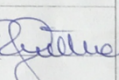
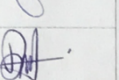
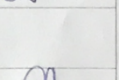
Zhang K, Wang S, Malhotra J, Hassler JR, Back SH, Wang G, Chang L, Xu W, Mia H, Leonardi R, Chen YE, Jackowski S, Kaufman RJ. The unfolded protein response transducer IRE1 α prevents ER stress induced hepatic steatosis. *EMBO.* 2011; 30: 1357–1375.

9. ETİK KURUL ONAYI



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	21.2017.mar	ÇALIŞMA: BİLİMSEL		
	PROJE ADI	Non-alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığında Endoplazmik Retikulum Stress ilişkili Lipid Birikimi ve Hücre Ölümü			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI	Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER			
	DESTEKLEYİCİ				
KARAR BİLGİLERİ					
TARİH: 13.03.2017 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurumumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.					
ÜYELER					
Ünvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/ Ek Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya Katılım	İmza
Prof.Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Levent KABASAKAL	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Serap ŞIRVanci	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet. Dr. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Cihanşah MURATOĞLU	Serbest Danışmanlık	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tuğçe	Soyadı	Demirel
Doğum Yeri	Konak	Doğum Tarihi	23.04.1992
Uyruğu	T.C.	Tel	
E-mail	tugce.demirel@hotmail.com	Cep. Tel.	0537 320 73 90

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Yüksek Lisans (Tezsiz)		
Lisans	İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Bio. Ve Genetik	2015

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YDS Puanı	YÖKDİL Puanı	TOEFL Puanı	IELTS Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		65		

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır *Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

YDS: Yabancı Dil Sınavı; YÖKDİL: Yüksek Öğretim Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL: Test of English as a Foreign Language

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	72,65	74,15	67,60

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Windows, Office Prog.	İyi

Çalıştığı Projeler

1. TÜBİTAK 2209/A “MCF-7 ve T47D Hücrelerinde Curcumin’in Apoptotik Ölüm Üzerine Etkisinde NFκB, PPARγ, c-myc ve Poliamin Metabolizmasının Rolünün İmmunoblotlama ile Gösterilmesi” İstanbul Kültür Üniversitesi- Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2014-2015 İstanbul.
2. Bursiyer, TÜBİTAK 1001 “Karcumin’in terapötik etkinliğinin otokrin büyüme hormonu sinyal yolağı aracılığı ile farklı meme kanseri hücrelerinde poliamin metabolizması irdelenerek incelenmesi” İstanbul Kültür Üniversitesi- Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2014-2015 İstanbul.
3. Bursiyer, TÜBİTAK 1001 “Hiperkolesterolemi ile oluşturulan non-alkolik karaciğer yağlanması karaciğerdeki moleküler mekanizmanın incelenmesi” Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. 2015-2018, İstanbul.

Katıldığı Kurslar/ Kongreler

1. Yeditepe Üniversitesi, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası 16-25 Ocak 2014 İstanbul.
2. 3rd EACR-Sponsored Anticancer Agent Development Congress, Dokuz Eylül Üniversitesi, Mayıs 2015, İstanbul.
3. 2nd Meeting on Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges& Future Prospects, İstanbul Kültür Üniversitesi, Aralık 2014, İstanbul.
4. Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges& Future Prospects İstanbul Kültür Üniversitesi, Aralık 2013, İstanbul.
5. Oxidative stress, DNA damage / repair and diseases, İstanbul Kültür Üniversitesi, Nisan 2013, İstanbul.
6. Redox Regulation of Metabolic Processes, SFRR-Europe/FEBS Advanced School, Spetses, Greece, September 19-26, 2016.
7. Metabolic Stress and Redox Regulation World Congress and Annual SFRR-E Conference, Berlin, June 21-23, 2017.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:

1. **Demirel Tugce**, Çoker Gurkan Ajda, Arisan Elif Damla, Obakan Yerlikaya Pınar, Palavan Unsal Narçın. “NF- κ B and PPAR- γ mediated diferuloylmethane induced apoptotic cell death in MCF-7 breast cancer cells in time dependent manner .” 3rd EACR-Sponsored Anticancer Agent Development Congress, 2015. Dokuz Eylul University, İzmir. (TÜBİTAK 1001 Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir).

2. **Demirel Tugce**, Sozen Erdi, Sahin, Ali, Karademir Betul, Ozer Kartal Nesrin
“Role of ER Stress on Lipid Accumulation and Cell Death in Hypercholesterolemia Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease” FEBS Advanced Lecture course on “Redox Regulation of Metabolic Processes” September 19-25, 2016 in Spetses, Greece.
3. Sahin Ali, Sozen Erdi, **Demirel Tugce**, Karademir Betül, Ozer Kartal Nesrin, Endoplasmic Reticulum Stress-Related Signaling and Lipid Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Oxidative Stress & Disease, Gordon Research Conference, Redox Biology in Disease and Translational Medicine, Lucca (Barga), Italy, March 19-24, 2017.
4. **Demirel Tugce**, Sozen Erdi, Sahin Ali, Karademir Betul, Ozer Kartal Nesrin. Endoplasmic reticulum stress related lipid accumulation and apoptotic cell death in nonalcoholic fatty liver disease. Metabolic Stress and Redox Regulation, OCC World Congress 2017 and Annual SFRR-E Meeting 2017, Berlin, Germany, June 21-23, 2017.