



EGE ÜNİVERSİTESİ



E. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ/REPERFÜZYON
MODELİNDE TELOMERİK TEKRAR
DEVAMLILIĞI VE APOPTOZ İLE BAĞLANTISI

Serhat DEMİRKOL

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zeki TOPÇU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07
Sunuş Tarihi : 10.12.2012

Bornova-İZMİR
2012

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ/REPERFÜZYON
MODELİNDE TELOMERİK TEKRAR DEVAMLILIĞI
VE APOPTOZ İLE BAĞLANTISI

Serhat DEMİRKOL

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zeki TOPÇU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi : 11.12.2012

Bornova-İZMİR

2012

Serhat DEMİRKOL tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ/REPERFÜZYON MODELİNDE TELOMERİK TEKRAR DEVAMLILIĞI VE APOPTOZ İLE BAĞLANTISI” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 11.12.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	:		
Raportör Üye	:		
Üye	:		

ÖZET

DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ/REPERFÜZYON MODELİNDE
TELOMERİK DEVAMLILIĞI VE APOPTOZ İLE BAĞLANTISI

DEMİRKOL, Serhat

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zeki TOPÇU

Aralık 2012, 46 sayfa

Böbrek yetmezliği ülkemizde ve tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur. Bu nedenle iskemik akut böbrek yetmezliği için etkin tedavi yöntemleri geliştirilmelidir. İskemi, hücrede enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikmesine yol açarak hücre disfonksiyonu ve sonrasında hücre ölümüne kadar gidebilen bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır. Özellikle reperfüzyon sonrası ortama gelen nötrofiller ve açığa çıkan medyatörlerin zararlı etkileri de eklenince organ veya doku ölümü kaçınılmaz olmaktadır. Bu tez çalışmasında Wistar albino türü erkek sıçanda oluşturulan böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında poliferatif, nekrotik ve apoptotik hücre oranları belirlendi ve telomerik devamlılığı araştırıldı. Tez kapsamında ilk olarak sıçan sol böbrek dokularında 60 dakika boyunca iskemi oluşturuldu ve sağ böbrekler kontrol grubu olarak kullanıldı. Bu çalışmaya paralel olarak iskemi öncesi antioksidan ajan enjekte edilen sıçanlarda aynı işlemler tekrar edilerek kullanılan NAC antioksidan ajanın apoptoz üzerine etkisi belirlendi. Telomerik restriksiyonel fragmentasyon (TRF) yöntemi ile telomerik tekrar devamlılığı apoptoz ilişkisi incelendi.

Anahtar sözcükler: Böbrek, iskemi/reperfüzyon, telomerik tekrar analizi, apoptoz

ABSTRACT

TELOMERIC REPEAT MAINTENANCE in EXPERIMENTAL
ISCHEMIA/REPERFUSION MODEL and its RELATION to
APOPTOSIS)

DEMİRKOL, Serhat

MSc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Zeki TOPCU

December 2012, 46 pages

Kidney failure is an important health issue in both our country and the world. Therefore effective treatment strategies need to be emerged to cure acute kidney failure. Ischemia initiates a series of biochemical reactions that may end up with cellular dysfunction and ultimate cell death by causing to diminish cellular energy level and accumulation of toxic substances. Tissue and organ death is therefore an inevitable result due to added harms exerted by neutrophils, which arose following reperfusion and liberated mediators. This thesis covered the estimation of the percentage apoptotic cell death and telomeric maintenance in kidney ischemia/reprfusion model to be established in Wistar albino rats. First of all, ischemia was made in rat left kidney and the ırght was was used as a control. And then the presence of the apoptotic cell was investıgated in reperfused kidney. On the other side, antioxidant agent was injected to rats before ischemia and the effect of N-acetylcystein was tested on the apoptosis as a antioxidant agent. Finally, the realtıonship between apoptosis and telomeric repeat persıstance was examined using telomeric restrictionıal fragmentation (TRF) method.

Keywords: Kidney, ischemia/reperfusion, telomeric repeat analysis, apoptosis

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca üretme ve sorun çözme becerisini kazandıran saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Zeki TOPÇU'ya, kıymetli görüşlerinden yaralandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. Gönen ÖZŞARLAK SÖZER'e ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Mustafa EMRE'ye teşekkürü borç bilirim. Ayrıca bana verdikleri destek, göstermiş oldukları sabır ve fedakârlıklar için başta eşim Dilek DEMİRKOL'a ve tüm ARKADAŞLARIMA minnettarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
TABLolar DİZİNİ.....	XV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XVI
1.GİRİŞ	1
1.1 İskemi/Reperfüzyon.....	1
1.1.1 İskemi/reperfüzyon hasarı	2
1.2 Serbest Oksijen Radikalleri Ve Oksidatif Stres.....	3
1.3 TİYOLİK BİLEŞİKLER.....	10
1.3.1 N-Asetilsistein	11
1.4 Apoptoz	11
1.4.1 Apoptoz mekanizmaları	13
1.4.2 Apoptozisin saptanmasında kullanılan yöntemler	15
1.5 Telomer Devamlılığı.....	19
1.5.1 Southern blot (SB)	21

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2. MATERYAL METOD	23
2.1 Materyal	23
2.2 Cihaz ve Sistemler	24
2.3 Metod	24
2.3.1 Örneklerin hazırlanması	25
2.3.2 Böbrek dokularından homojenizat eldesi	26
2.3.3 ssDNA apoptosis elisa kit ile apoptotik hücre deteksiyonu	26
2.3.4 Telomerik tekrar analizi	27
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	33
3.1 İskemi/Reperfüzyon ve apoptoz ilişkisi	33
3.2 İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-asetilsisteinin (NAC) Apoptoz Üzerine Etkisi	36
3.3 Telomer Devamlılığı ve Apoptozis İlişkisi	38
4. GENEL DEĞERLENDİRME	39
KAYNAKLAR DİZİNİ	41
ÖZGEÇMİŞ	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Mitokondride ROS oluşumu ve mitokondriyal savunma.....	4
1.2 γ -Glutamil Döngüsü.	8
1.3 Glutasyon redüktazın yapısı.....	9
1.4 GSH/GSSG redoks döngüsü.....	10
1.5 Tiyolik bileşikler	11
1.6 Hücrede apoptotik yollar	15
1.7 Kromozom uçlarında görülen telomerik tekrar dizisi	20
1.8 Telomerdeki replikasyon sonu problemi.....	21
2.1 Böbrek dokularından homojenizat eldesine ilişkin işlem basamakları..	26
3.1 Ksol ve Ksag böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi	33
3.2 Reperfüzyon sonrası 1. saat (I/R) ve 1.saat (N) böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi.....	34
3.3 Reperfüzyon sonrası 24. saat (I/R) ve 24. saat (N) böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi.....	34
3.4 Reperfüzyon sonrası 5. Gün (I/R) ve 5. Gün (N) böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi.....	35

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.5 Reperfüzyon sonrası 10. Gün (I/R) ve 10. gün (N) böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi.....	35
3.6 Tüm örnek grupları (I/R) ve (N) böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi.....	36
3.7 K, (NAC + I/R 1. saat) ve (NAC/N 1.saat) böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi	36
3.8 Ksol, (I/R) 1. saat ve (N) 1.saat böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi	37
3.9 (I/R) 1. Saat, (N) 1. saat (NAC+I/R) 1.saat, (NAC/N) 1.saat böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi	38

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Hayvansal dokularda glutatyonun görevleri.....	7
2.1 Kullanılan kimyasallar	23
2.2 Kullanılan cihazlar	24
2.3 Kullanılan tamponlar.....	30
2.4 Hibridizasyonda kullanılan çözeltiler	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
H_2O_2	Hidrojen peroksit
$OH^\cdot$	Hidroksil radikali
$ONOO^-$	Peroksinitrit anyonu
O_2^-	Süperoksit anyonu
 <u>Kısaltmalar</u>	
ALA	Alfa-lipoik asit
AİF	Apoptosis indükleyici faktör
Cys	Sistein
DHLA	Dihidrolipoik asite
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon (okside form)
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
HCys	Homosistein
HB	Hematoksilen boyama
İ/R	İskemi-reperfüzyon
NAC	N-Asetilsistein

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar

PMNL	Polimorfo nükleer lökositler
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TNF- α	Tümör nekrozis faktör alfa

1. GİRİŞ

1.1 İskemi/Reperfüzyon

Canlı bir dokudaki aerobik metabolizmayı sürdürebilmek için gereken miktarda oksijen sağlanamamasına “iskemi”, bir iskemi periyodu sonrasında kesilmiş olan kan akımının tekrar sağlanması ise “reperfüzyon” olarak adlandırılmaktadır (Derek et al., 2007). İskemiyin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolarak hücre ölümüne meydana gelmektedir. İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda dokuya yerleşen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından salınan serbest oksijen radikalleri dokuda yıkım artırıcı etki yapar. Bu olaya reperfüzyona bağlı doku hasarı denir (Derek et al., 2007). Böbrek transplantasyonu, şok, travma, kardiyovasküler cerrahi, kısmi nefrektomi, çeşitli ürolojik girişimler ve renal arter cerrahisi gibi renal kan akımını azaltan cerrahi girişimler sonucu böbrek iskemisi gelişmekte, sonrasında iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı olarak adlandırılan patoloji ortaya çıkmaktadır. Akut böbrek yetmezliğinin en önemli nedeni renal vazokonstriksiyon, renal tübüler obstrüksiyon ve glomerular fonksiyonlarda bozulmaya sebep olan renal iskemidir. Bu bozulmaların hücre ölümüne nedenleri bilinmemektedir (Liano ve Pascaul; 1996). İskemiye uğramış böbreğin tedavisi reperfüzyon yoluyla kan akımının artırılmasıyla sağlanabilir. Ancak bu durumda da kaçınılmaz olarak reperfüzyon hasarı oluşmaktadır. Reperfüzyon hasarının önlenmesi ile renal iskemi nedeni ile gelişebilecek akut böbrek yetmezliği engellenebilir.

Renal iskemi sonucu oluşan iskemik akut böbrek yetmezliğinde spesifik proteinlerin oksidasyonunun veya oksidatif DNA hasarının gösterilebilmesi, hasarın oluşumunu engelleyen ajanların etkinliğinin belirlenmesi ve olası hastalıkların engellenmesi tedavi konusundaki bilgilerimize önemli bir katkı sağlayacaktır. İskemi böbrek reperfüzyon modelinde küçük oranda serbest radikal oluşmaktaysa da, reperfüzyon döneminde dokunun yeniden oksijenlenmesinin ardından çok daha büyük oranda serbest radikaller oluşmaktadır. Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^\bullet$), peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) vardır. Bu radikaller membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu, takiben apoptoz ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümüne meydana getirmektedir (Vaux et al., 1993; Paller et al., 1984). Daemen ve ekibi yaptıkları çalışmalarda renal iskemi reperfüzyon hasarından sonra gelişen enflamasyonun apoptoz ile indüklendiğini ve apoptozun yapılanmasının renal enflamasyonu

engellediğini bildirmişlerdir (Daemen et al., 1999,2001,2002). Apoptozun engellenmesi iskemi reperfüzyon hasarı için koruyucu veya terapötik bir yaklaşım olabilir. Apoptoz programlı hücre ölümü olup sitoplazmik kondenzasyon, plazma membranının boğumlanması ve nükleer dejenerasyon ile karakterize edilir.

1.1.1 İskemi/reperfüzyon hasarı

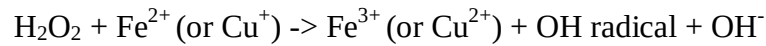
Canlı bir dokudaki aerobik metabolizmayı sürdürebilmek için gereken miktarda oksijen sağlanamaması iskemi olarak adlandırılır. İskemi sonucunda oksijenin ulaşmadığı dokularda anaerobik solunum nedeni ile biriken laktik asit ve toksik metabolitler hücre ölümü ve organ yetmezliklerine neden olmaktadır. İskemik hasarın giderilmesi için kritik zaman dilimi içerisinde dokuda kan akımının normale dönerek oksijen ile beslenmesi gerekir ve bu reperfüzyon olarak adlandırılır. İskemik dokunun reperfüzyonu dokunun hayatta kalabilmesi için çok önemlidir ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar. Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine kısa sürede fazla miktarda oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. İskemik dokuda hücreler geri dönüşümlü hasar görmüşse veya bu hasardan etkilenmemişse reperfüzyon bu hücrelerin geri kazanılmasını sağlar. Ancak bu iskemik hasarın yoğunluk ve süresine bağlı olmakla birlikte, pek çok hücrede reperfüzyon sonrası apoptozis ve nekroz ile hücreler ölmektedir. İskemi/reperfüzyon sonucu oluşan akut böbrek hasarı da diyalize ihtiyaç duyan yoğun bakım hastalarında yüksek ölüm riski oluşturan en önemli sorunlardan birisidir. Deneysel olarak iskemi/reperfüzyon modeli ile oluşturulmuş akut böbrek hasarı modellerinde, serbest oksijen radikallerinin hücrede direkt hasara yol açtığı ve bu hasarın şiddetine göre hücre ya apoptoz ya da nekroz ile ölüme gittiği gösterilmiştir. Daemen ve ekibi yaptıkları çalışmalarda renal iskemi reperfüzyon hasarından sonra gelişen enflamasyonun apoptoz ile indüklendiğini ve apoptozisin bloklanmasının renal enflamasyonu engellediğini bildirmişlerdir (Daemen et.al., 1999, 2001, 2002) Renal iskemi sonucu oluşan iskemik akut böbrek yetmezliğinde spesifik proteinlerin oksidasyonunun veya oksidatif DNA hasarının gösterilebilmesi, bu hasarın oluşumunu engelleyen ajanların etkinliğinin belirlenmesi ve olası hastalıkların engellenmesi tedavi konusundaki bilgilerimize önemli bir katkı sağlayacaktır.

1.2 Serbest Oksijen Radikalleri Ve Oksidatif Stres

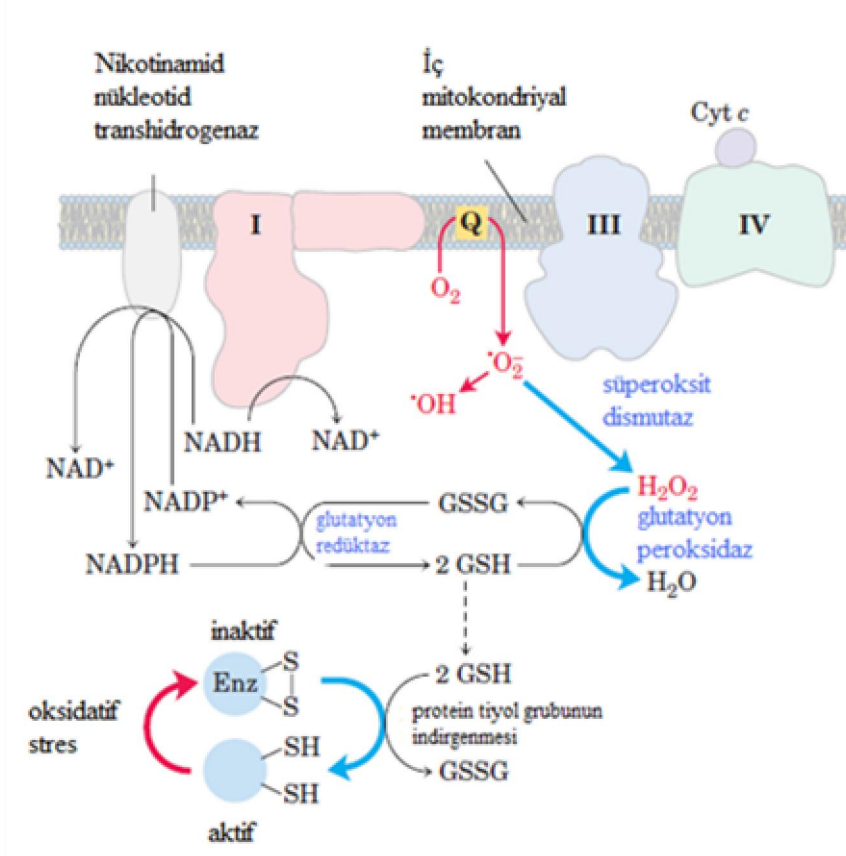
Oksidanlar, organizmada başlıca glukozun oksidasyonu sırasında olmak üzere tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırasında ve sonrasında sürekli bir oluşum ve antioksidan adı verilen moleküller tarafından da sürekli etkisizleştirme süreci içindedirler. Çünkü canlı organizma gerek dış ve gerekse iç etkilerin (stres, salgı maddeleri gibi) uyarılması ile her an zorlanmakta ve travmatize edilmektedir. Bu zorlamalar sırasında zaman zaman oksidan moleküller belirli düzeylerin üstüne çıkmaktadır (Çelik ve Yılmaz, 1999).

Mitokondride solunum zincirinde oksijenin indirgenmesi yolundaki birçok adımda, oldukça reaktif serbest radikallerin oluşma potansiyeli vardır ve bunlar hücreye zarar verebilirler. Bu reaktif oksijen türleri (ROS) süperoksit (O_2 'nin bir elektron ile indirgenmesinden oluşur), hidrojen peroksit (H_2O_2 ; iki elektronla indirgenmesinden) ve hidroksil radikalinden (üç elektronla indirgenmesinden) oluşur. Ayrıca ksantin oksidaz ve amino asit oksidaz gibi enzimler de ürün olarak hidrojen peroksit oluştururlar. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali oksijene kıyasla çok daha fazla reaktiftirler (Mathews et al., 2000). Organizmada, serbest radikallerin üretimi ve uzaklaştırılmasının hızı bir denge halindedir ve oksidatif denge olarak adlandırılır. Serbest radikal üretiminde artış ya da uzaklaştırılma hızındaki azalma bu dengeyi bozar ve reaktif oksijen türlerinin düzeyini artırır. Bu durum oksidatif stres adını alır ve doku hasarına neden olur (Keser et al., 2012).

Hidroksil radikali proteinlerde, nükleik asitlerde ve membran lipidlerindeki yağ asitlerinde (lipit peroksidasyonu) hasar oluşturur. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu olarak meydana gelir. Hidroksil radikali iyonize radyasyon sonucunda oluşur ve iyonize radyasyondan oluşan en aktif mutajen olarak görülür. Ayrıca Fenton reaksiyonunda H_2O_2 'den üretilir (Mathews et al., 2000):



Süperoksit radikali toksik değildir ancak oldukça reaktiftir; süperoksit oluşumu daha da reaktif olan hidroksil serbest radikalının ($\cdot OH$) üretilmesine neden olur (Şekil 1. 1) (Nelson ve Cox, 2004).



Şekil 1. 1. Mitokondride ROS oluşumu ve mitokondriyal savunma. Solunum zincirine elektron giriş hızı ile zincir üzerinden gerçekleşen elektron transfer hızı aynı olmadığı zaman, kısmen indirgenmiş ubikinon radikali ([•]Q⁻) bir elektronunu O₂'e verir. Kompleks I ve III'de süperoksit radikali ([•]O₂⁻) üretimi artar. Süperoksit, bir 4Fe-4S proteini olan akonitaz üzerine etki eder ve Fe²⁺ açığa çıkar. Fe²⁺ varlığında gerçekleşen Fenton reaksiyonu sonucu, oldukça reaktif olan hidroksil serbest radikali ([•]OH) oluşur. Mavi ile gösterilen reaksiyonlar, süperoksidin hasar yaratan etkilerine karşı hücreyi korur. İndirgenmiş glutatyon (GSH; bak. Şekil 22-27), H₂O₂'nin, enzimlerde ve diğer proteinlerde yükseltgenmiş durumdaki Cys artıklarının (—S—S—) indirgenmesi için elektron verir. Yükseltgenmiş formun (GSSG) NADPH ile indirgenmesi yoluyla GSH rejenerasyonu sağlanır.

Ayrıca biyolojik sinyal iletiminde önemli olan bir diğer serbest radikal nitrik oksitle kombine olur. Oluşan ürün peroksinitrittir (OONO⁻). Peroksinitrit lipid peroksidasyonuna ve proteinlerdeki tirozinin hidroksil gruplarının nitratlanmasına neden olur, sonuç olarak membran yapısına zarar verir (Mathews et al., 2000).

Bu reaktif oksijen türleri enzimler, membran lipidleri ve nükleik asitler ile reaksiyon vererek yapılarında hasara neden olabilir. Aktif olarak solunum yapan

mitokondride, solunumda kullanılan O_2 'nin % 0.1 ile % 4'ü ' O_2^- ' oluşturur. Bu miktar, serbest radikal çok hızlı biçimde etkisiz hale getirilmediği takdirde, ölümcül etkilere neden olabilecekten daha fazladır. Solunum zincirinde elektronların akışını yavaşlatan faktörler, muhtemelen Q çevriminde oluşan ' O_2^- 'nin yarı ömrünü uzatır. Bu da süperoksit oluşumunu artırır.

Serbest radikalleri inaktive etmek ve sebep oldukları oksidatif hasarı en aza indirmek için hücrelerde enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri bulunmaktadır. Antioksidanlar; ekzogen olan vitaminler (E, C) ve endojen olan glutatyon gibi radikal uzaklaştırıcıları, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimleri, lipoik asit, ürik asit, bilirubin ve albumini kapsar (Aksoy et al., 2005; Çelik and Özkaya, 2002).

E vitamini etkisi gösteren sekiz bileşik bilinmektedir: α -, β -, γ -, δ -, ϵ - vb. tokoferoller olarak adlandırılır. Tokoferoller içinde en bol bulunan ve en aktif olanı α -tokoferoller olarak adlandırılır. Tokoferoller bir kroman halka sistemi, bir benzen halkası ile bir piran halkasının kondenzasyonundan meydana gelir ve yağda çözünürler. Tokoferoller antioksidan olarak bilinirler. Moleküler oksijene maruz bırakılan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu azalttığı bulunmuştur. Buna göre tokoferollerin fonksiyonlarından birisi biyolojik membranların lipidlerindeki birçok doymamış yağ asitlerini moleküler oksijenin hasar oluşturuca etkisine karşı korumaktır (Keha ve Küfrevioğlu, 2011; Dilsiz et. al., 1997).

C vitamini (askorbik asit) yapı itibarıyla en basit vitaminlerden bir tanesidir. Bir şeker asidinin laktonundan ibarettir. Birçok hayvan ve bitki askorbik asidi glukozdan sentezleyebilir. Mikroorganizmalarda askorbik asit yoktur. Askorbik asit kolayca hidrojen atomu veren ve bu sırada dehidroaskorbik aside dönüşen kuvvetli bir antioksidandır (Keha ve Küfrevioğlu, 2011).

Alfa-lipoik asit (ALA) tiyol grubu içeren, antioksidan aktivitesi olan bir maddedir ve mikroorganizmalardan insanlara kadar, birçok organizmanın metabolizmasında kofaktör olarak kullanılan bir maddedir. ALA serbest radikalleri yok ederek, Vitamin E, askorbik asit ve glutatyonun rejenerasyonuna sağlayarak antioksidan özelliklerini göstermektedir. ALA diyetle alındığında, beyin dâhil birçok dokuda redükte formu olan dihidrolipoik asite (DHLLA) indirgenir. DHLLA'nın ALA'ya göre antioksidan etkisi daha fazladır. ALA ve DHLLA'nın antioksidan ve bazı durumlarda prooksidan özelliği oksidatif stresin tipi ve fizyolojik özellikleri tarafından belirlenmektedir (Özkaya et. al., 2009).

Aerobik hücrelerde bulunan Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüren antioksidan metabolizmanın önemli bir enzimidir (Keha ve Küfrevioğlu, 2011):



SOD; bakır ve çinko içeren formu sitoplazmada, mangan içeren formu mitokondrilerde ve bakterilerde, demir içeren formu ise bakterilerde, siyanobakterilerde ve bazı bitkilerde bulunur. Nikel içeren formu daha yeni tanımlanmıştır (Mathews et al., 2000). Bu enzimler yüksek konsantrasyonda ve oldukça aktif olarak bulunurlar. Süperoksit dismutaz ve flavin-bağımlı oksidazlar vasıtasıyla oluşan peroksit, hem grubu içeren bir enzim olan katalaz ya da peroksidazlar (eritrositlerde glutatyon peroksidaz) aracılığıyla parçalanırlar (Keha ve Küfrevioğlu, 2011).

Glutatyon (GSH) farklı bilimsel alanlar için önemli bir moleküldür. Son zamanlarda, tiyollerin gen ekspresyonu ve apoptozis sinyal iletimindeki rolleri üzerindeki çalışmalar devam etmektedir (Sies, 1999). Glutatyon (L-γ-glutamil-L-sisteinilglisin) hücrel antioksidan savunma mekanizmasına katılan protein olmayan, molekül kütlesi 307 olan tiyolik bir bileşiktir. Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşur ve sisteinin tiyol (-SH) artığı glutatyonun aktif grubudur (Sies et al., 1999; Pastore et al., 2003). Memeli, bitki, böcek, fungal ve bakteriyel hücrelerde bulunur ve bir çok hücrel reaksiyonlara katılır (Clarke et al., 1998). Memelilerde glutatyon miktarı eksojen toksinlerle karşı karşıya kalan organlarda fazladır. Başta karaciğer olmak üzere dalak, böbrekler, pankreas, lens ve kornea vücutta diğer organlara göre daha yüksek konsantrasyonda glutatyon içerir (Lomaestro et al., 1995). Intraseküler konsantrasyonu milimolar düzeyindeyken, plasma ve idrarda bu oran oldukça düşüktür. Hücrelerde glutatyon serbest veya proteinlere bağlı şekilde bulunur. GSH proteinlere bağlanarak glutatyonlanmış proteinleri oluşturur. Serbest glutatyon indirgenmiş formdayken (GSH) oksidatif stres durumunda okside forma (GSSG) (Şekil 1.2) çevrilir. GSSG daha sonra glutatyon reduktaz enzim katalizliğinde GSH'a dönüştürülür.

Hücrenin redoks hali glutatyonun indirgenmiş ve okside formlarının bağlı oranlarına (GSH/GSSG) bağlıdır ve bu oran hücre için önemli bir belirteçtir.

Normal koşullarda memeli hücrelerinde glutatıyon redoks çifti oranı GSH'ın GSSG'ye baskın olması nedeniyle 1-10 mM arasında değişmektir. Dinlenen hücrelerde ise bu oran 100'e kadar çıkar, oksidatif stres durumunda ise 10-1 mM'a kadar düşer.

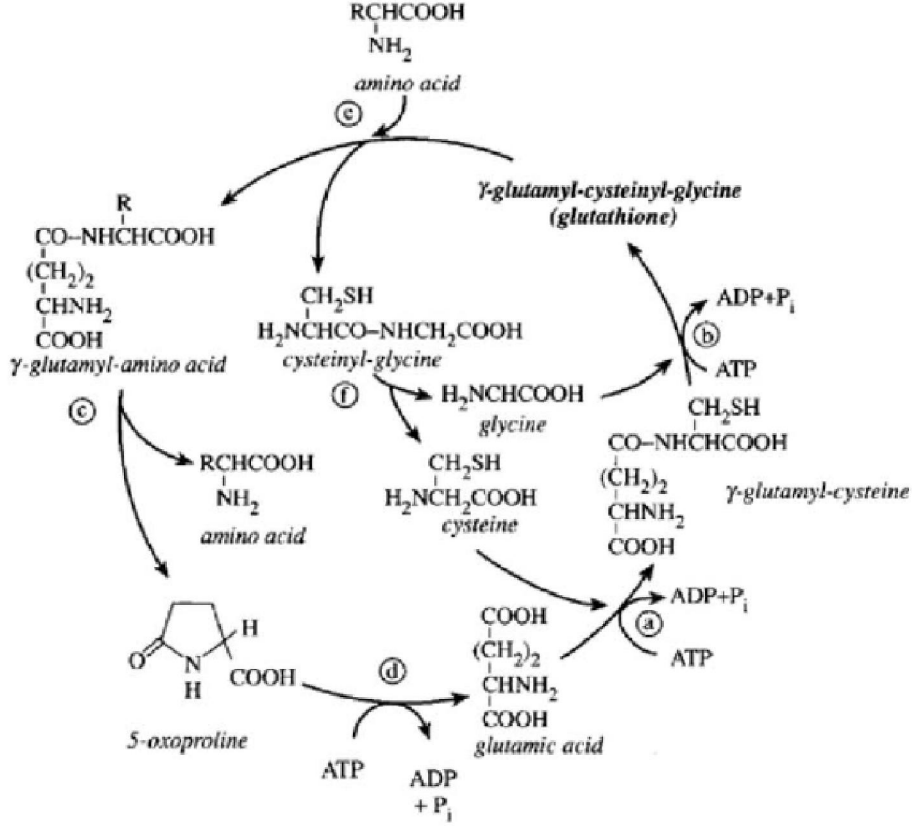
Glutatıyon iki karakteristik yapısal özelliğe sahiptir. Bunlardan biri γ -glutamil bağı ve sülfidril (-SH) grubudur. Bu iki özellik glutatıyonun çok çeşitli reaksiyonlara katılımını kolaylaştırır (Tablo 1.1) (Wu et al., 2004).

Tablo 1.1 Hayvansal dokularda glutatıyonun görevleri

Antioksidant görevleri	Serbest radikal ve diğer reaktif türlerin önlenmesi
	Hidrojen ve lipid peroksitlerin uzaklaştırılması
	Biyomoleküllerin oksidasyonunun önlenmesi
Metabolizma	Lökotrien ve prostaglandinlerin sentezi
	Formaldehidin formata dönüřtürülmesi
	Metilglioksalden D-laktat üretimi
	Elektrofillerden merkapturatların üretimi
	Glutatıyon-NO oluşumu
Regölasyon	Sisteinin depolanması ve taşınması
	Intraselüler redoks durumları
	Sinyal iletimi ve gen ekspresyonu
	DNA ve protein sentezi, proteolizis
	Hücre poliferasyonu ve apoptozis
	Sitokin üretimi ve immun cevap
	Protein glutatıyonilasyonu
	Mitokondriyel fonksiyon ve entegrasyon

Glutatıyon, transhidrojenasyon reaksiyonlarına katılarak koenzim A gibi çeşitli enzim ve proteinlerin sülfidril gruplarının oluşumunu ve korunmasını sağlar. Ayrıca ribonükleotit redüktaz katalizliğinde deoksiribonükleotitlerin oluşumunda ve dehidroaskorbatın askorbata indirgenmesi gibi reaksiyonlarda indirgeyici kapasite olarak görev alır. Glutatıyon ayrıca başta hidrojen peroksit olmak üzere diğer peroksitlerin ve serbest radikallerin detoksifikasyonunda görev alır. Ksenobiyotikler ile de reaksiyona girerek onların idrar ve feğes yoluyla merkaptürik asit formunda atılımını sağlar. Lökotrien, prostaglandin, steroid ve melanin metabolizmalarında endojen metabolitlerle glutatıyonun analog türevleri oluşur. Ayrıca γ -glutamil grubunun amino asitler (sistin ve nötral amino asitler), peptitler ve aminlerin transportunda görev aldığına dair kanıtlar vardır.

Glutatiyonun sentezi ve yıkımı γ -glutamil döngüsünde yer alan reaksiyonlarla gerçekleşir (Şekil 1.2). Bu döngüdeki reaksiyonlar bir çok metabolik ve fizyolojik reaksiyonla yakından ilişkilidir. Glutatiyon merkezi sinir sistemi için de oldukça önemli bir moleküldür. γ -glutamil döngüsü defekti olan hastalarda zeka geriliği ve çeşitli beyin rahatsızlıkları görülmektedir.



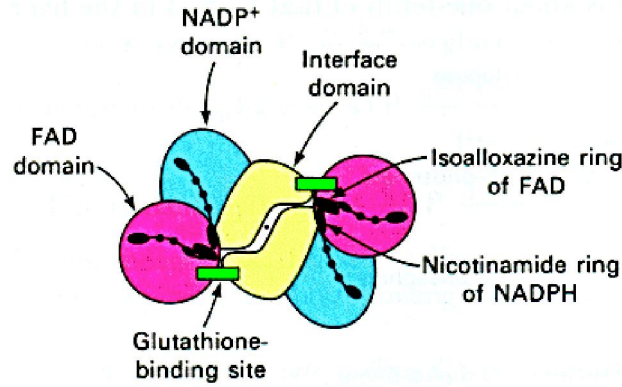
Şekil 1.2 γ -Glutamil Döngüsü. Glutatiyon sentezi ve metabolizması. (a) Glutamilsistein sentetaz; (b) glutatiyon sentetaz; (c) γ -glutamil siklotransferaz; (d) oksoprolinaz; (e) γ -glutamil transpeptidaz; (f) peptidaz.

Glutatiyon hücre membranlarını oksidatif hasara karşı korumakla kalmayıp birçok proteinin sülfidril grubunu indirgenmiş formda tutarak normal fonksiyonlarını korumalarını sağlar. Dönüşümsüz hücre hasarı ise hücrenin GSH içeriğini koruyamadığı durumlarda meydana gelir.

SOD reaksiyonu ile oluşan hidrojen peroksit glutatiyon peroksidaz (GSH-Px) tarafından zararsız hale getirilir. GSH-Px memeli dokularında selenoprotein olarak bilinen tek enzimdir, toksik ROOH gruplarını uzaklaştırır (Yılmaz et. al., 1997). Glutatiyon redüktaz, nikotinamid nükleotid transhidrogenaz (mitokondride) aktivitesiyle oluşan veya pentoz fosfat yolunda açığa çıkan NADPH'ın elektronlarını kullanır. Böylece, yükseltgenmiş glutatiyonu tekrar indirgenmiş formuna dönüştürür. İndirgenmiş glutatiyon aynı zamanda protein sülfidril

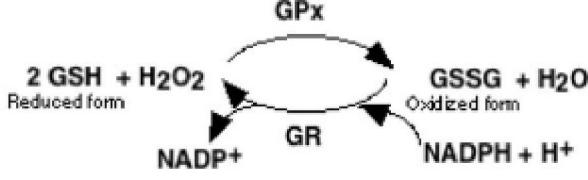
gruplarını indirgenmiş durumda tutar ve oksidatif stresin bazı zararlı etkilerinden korur. Nikotinamid nükleotid transhidrogenaz bu proses için kritiktir: glutatyon redüktaz aktivitesi için esansiyel olan NADPH'ı üretir (Nelson ve Cox, 2004).

GR flavoenzimlerin piridin-nükleotid disülfid oksidoredüktaz ailesindendir (Şekil 1.3), NADPH varlığında glutatyon disülfidin (GSSG) indirgen forma (GSH) indirgenmesini katalizler. GSH/GSSG nin yüksek konsantrasyonlarda enzim kritik bir role sahiptir (Erat et al., 2007). GR ile oluşturulan GSH havuzu aktif protein fonksiyonları için gereklidir ve GSH'nın mM konsantrasyonları protein Cys grupları ve reaktif oksijen türleri (ROS) arasındaki reaksiyonun oluşmasını engelleyen redoks tampon bariyeri olarak anahtar rol oynar (Yannarelli et al., 2007).



Şekil 1.3 Glutatyon redüktazın yapısı

Fizyolojik koşullar altında GSH/GSSG dengesi Glutatyon peroksidaz (GPx) ve Glutatyon redüktaz (GR) enzimleri ile sağlanır (Şekil 1.4). GR; GSSG'nin GSH'a indirgenmesini sağlar. Azalan GR hücrel GR aktivitesi ve artan GPx aktivitesi GSSG birikimine neden olur ve hücrel antioksidan GSH havuzu azalmaya başlar, bu durumda biyolojik hücrelerdeki artan oksidatif cevabın indikatörü olan glutatyon redoks çevriminde dengesizlik oluşur. Bu yüzden azalan GR/GPx aktivite oranı ya da azalan GSH/GSSG oranı hücrelerdeki oksidatif stresin ölçümü için kullanılırlar (Zhang et al., 2006).

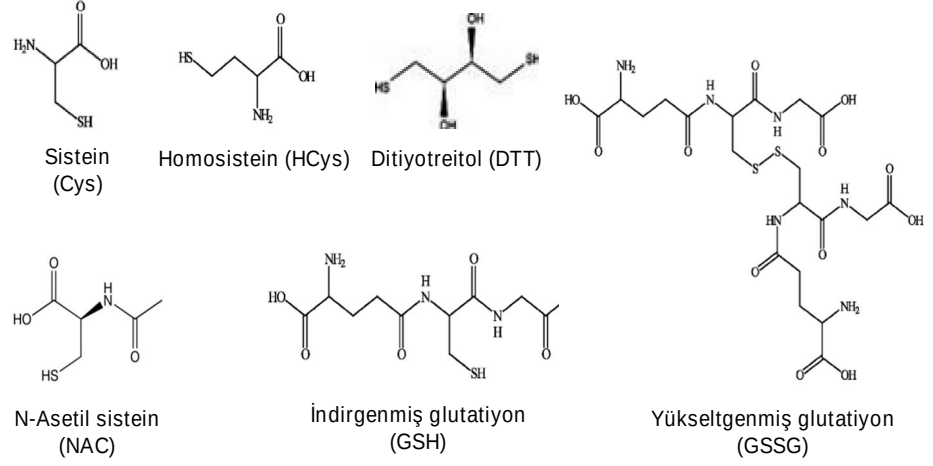


Şekil 1.4 GSH/GSSG redoks döngüsü

GR; GSH/GSSG oranının yüksek bir değerde tutulması yoluyla protein ve DNA biyosentezindeki serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu gibi birçok önemli fonksiyona sahiptir. GSH, indirgen formdaki intraselüler proteinlerin sülfidril gruplarının korunmasıyla hücrelerdeki tiyol redoks potansiyelini muhafaza eder. Aynı zamanda GSH, ekzojen bileşiklerin detoksifikasyonu ve sistenin taşınması ve depolanması için reaksiyon partneridir. Bağışıklık bozukluğu sendromu, Parkinson hastalığı ve diyabet gibi bir çok hastalıkta glutatyon seviyelerinin azaldığı yayınlanmıştır. Aynı zamanda, yüksek GSSG konsantrasyonlarının protein sentezinde görevli enzim sistemlerinin bir çoğunu inhibe ettiği yayınlanmıştır (Erat et al., 2006).

1.3 Tiyolik Bileşikler

Tiyolik bileşikler yapılarında sülfidril artıkları bulunduran bileşik grubudur. Biyolojik tiyoller yüksek molekül ağırlıklı protein tiyolleri ve düşük molekül ağırlıklı serbest tiyoller olarak iki gruba ayrılırlar. Düşük molekül ağırlıklı tiyoller ve disülfidler glutatyon (GSH), sistin (Cys) ve homosisteini (HCys) kapsamaktadır ve bunlar metabolizma ve homeostazisde çeşitli rollere sahiptirler (Ricci et al., 2006; Possari et al., 2006; Li et al., 2006; Potesil et al., 2005). Şekil 1.5’de bazı tiyolik bileşikler verilmektedir.



Şekil 1.5. Tiyolik bileşikler

1.3.1 N-Asetilsistein

N-Asetilsistein (NAC) kimyasal formülü $C_5H_9NO_3S$ olan tiyolik bir bileşiktir. Glutatyonun membrandan geçebilen prekürsörüdür ve direkt olarak intraselüler oksidanlarla etkileşime girer. Antioksidan özelliklerine ek olarak NAC, oksidatif stres ile ilişkili çeşitli inflamatuvar elementleri inhibe eder (Demiralay et al., 2006). NAC yiyeceklerin bileşenlerinde bulunur ve ayrıca hücreler tarafından da sentezlenebilir. NAC radikal önleyici etkilerinden dolayı birçok kimyasalın toksik etkilerine karşı koruma için geniş bir kullanıma sahiptir ve oksidanlara karşı en önemli intraselüler koruyucu molekül olan glutatyonun prekürsörüdür. Güçlü bir antioksidan olmasının yanı sıra bilinen bir toksisitesi yoktur (Yılmaz and Çelik, 2003). N-asetilsistein (NAC)'in serbest radikaller tarafından oluşturulan doku hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu ve bu etkisini GSH düzeyini arttırarak, direkt “scavenger” olarak etki göstererek veya stabil nitrozotil türevleri oluşturarak gerçekleştirdiği bildirilmektedir. NAC'ın, böbrek İ/R hasarının da içinde olduğu birçok deneysel böbrek yetmezliği modeline karşı koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir. (Aydoğdu et al., 2005).

1.4 Apoptoz

Organizma sürekli bir denge halindedir. Yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptozis ve nekrozdur. Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir. Programlı hücre ölümü anlamına gelen “apoptozis”, hücresel homeostazisin sürekliliği, hücre çoğalması ve hücre farklılaşmasında çok önemli olan hücre eliminasyonu için gerekli

fizyolojik bir olaydır. Apoptozis ile hasar görmüş olan hücreler, çevreye zarar vermeksizin ortadan kaldırılır. Apoptozis çok hücreli organizmalarda embriyogenezis sırasında, erişkinlerde birçok dokuda hücrel çöğalma ve yenilenme arasındaki homeostatik dengenin ve doku içeriğinin kararlılığının korunması için gereklidir (Şahaboğlu, 2006; Arino et al., 1995; Cawthon et al., 2002). Apoptotik mekanizma ve programlı hücre embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca vardır. Çeşitli uyarılar apoptozis mekanizmasını uyarır. Örnek olarak, tümör nekrozis faktör alfa (TNF-a), hücre içi kalsiyum düzeyinin artışı, glikokortikoidler, reaktif oksijen ürünleri, UV ışık, radyasyon, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar sayılabilir (Şahaboğlu, 2006; Cawthon et al., 2002).

Çekirdeğin yoğunlaşması ve parçalara ayrılması apoptozisin ana morfolojik belirticidir. Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve hücre şişerken zar yapısı bozulur. Daha sonra zarda tomurcuklanmalar oluşur ve hücre sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Aprioptotik folojik belirteçle hücreler, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınıp fagosite edilirler. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma zarındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre zarının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle zarın dış tabakasına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfotidilserin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (Şahaboğlu, 2006; Akşit et al., 2008).

Apoptozisde hücrel yapının bozulmasının nedeni, Na, K ve Cl taşıyıcı sistemin durması sonucu hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptoz uyarısını alan hücre çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovilluslarını kaybeder. Elektron mikroskopunda gözlenen değişiklikler ise öncelikle hücre zarının şekli bozulmasıdır ve bunu takiben kabarcıklanmalar oluşur ki bu yapılar ‘zeiozis’adını alırlar. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır. Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfat idilkolin asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP’ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu sonucu fosfotidilserin dış yüzey tabakaya yerleşir. Bu durum apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanması ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptoz 30–60 dakika gibi kısa bir sürede

tamamlanır. Elektron mikroskopunda apoptozis sırasında, kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmanın büzülmesi, plazma zarının kabarması, mitokondri dış zarında şişme, mitokondrial membran aralığına sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan Apoptoz İndükleyici Faktör (AİF) salınımı en önemli morfolojik değişikliklerdir (Şahaboğlu, 2006; Akşit et al., 2008).

Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilir. Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir. Apoptozis, hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir (Şahaboğlu, 2006; Cohen et al., 1993; Gavrieli et al., 1992; Lu et al., 2000).

1.4.1 Apoptoz mekanizmaları

1.4.1.1 Hücre içi uyarılar aracılığı ile apoptozis

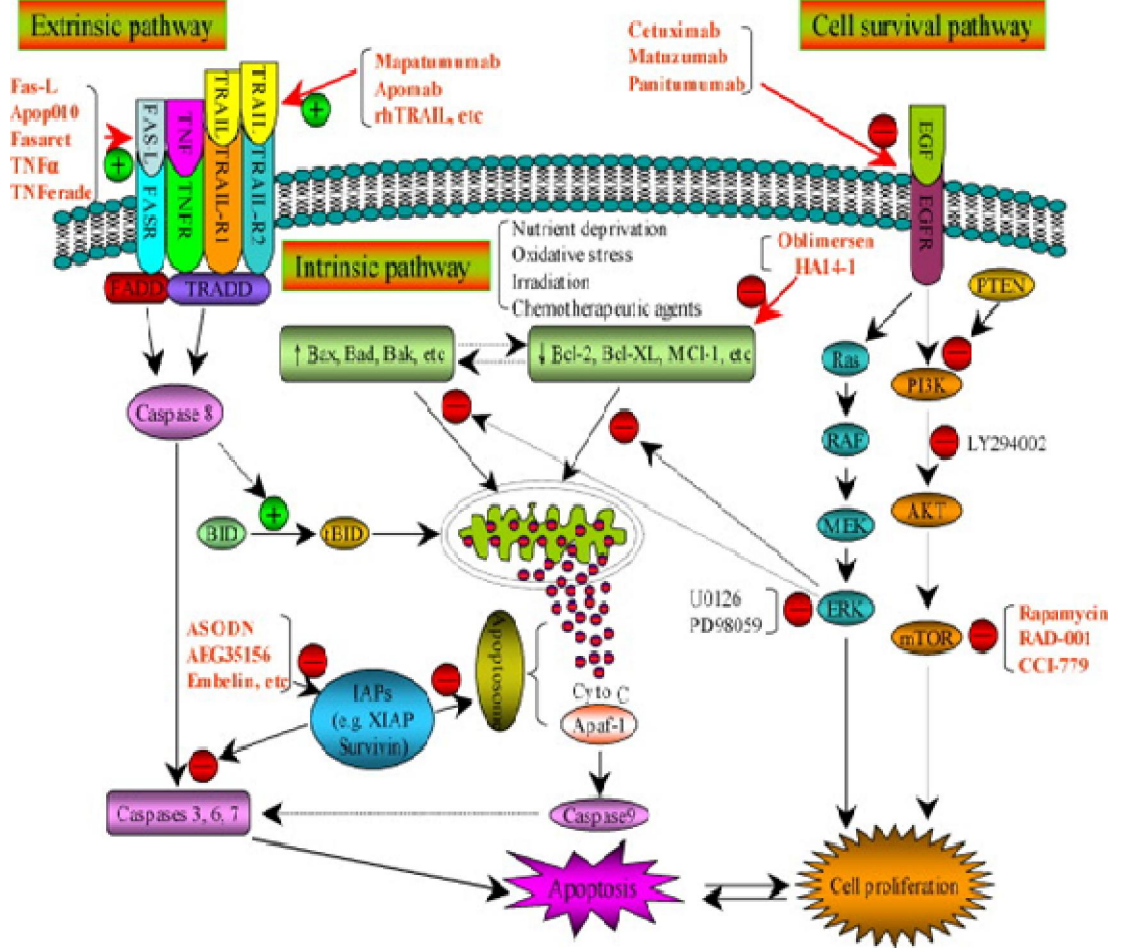
Birçok apoptotik uyarı, sonuçta mitokondri/apoptozom ölüm yolağı oluşturacak hücre organellerinde metabolik strese neden olabilirler. Apoptozisin çeşitli uyarıları doğrudan ya da dolaylı mitokondriden sitokrom c serbestlenmesine etki eder. Sitokrom c'nin sitoplazmaya sızması mitokondri/apoptozom bağımlı (intrinsik) ölüm yolağında anahtar olaydır. Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri bu yolağın kontrolünde önemli rol oynarlar. Bcl-2 gen ailesi üyeleri, kendi içlerinde birbirlerine antagonist çalışarak apoptozu uyarıran veya engelleyen bcl-2 proteinlerini kodlarlar. Bu proteinlerden pro-apoptotik olanlar (Bax, Bak, Bok, Bad, bid, Bim, Bmf) apoptozu uyarırken anti-apoptotik olanlar (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w) apoptozu engellerler. Bcl-2 gen ailesi üyelerinin oranı, hücrelerin yaşamasını veya ölmesini belirler. Bunların ekspresyon düzeyleri ve aktivasyon aşaması sitokrom c, prokaspaz -2, -3, -9, AİF (apoptoz içeren faktör), endonükleaz G, Smac/DIABLO gibi apoptozu açan moleküllerin salınımına etki eder. Bütün bu faktörler Bax/Bak kanalları ya da mitokondriyal membrandaki

spesifik olmayan porlar tarafından serbestlenir. Prokaspaz -9'un aktivasyonu dATP ya da ATP'nin varlığında Apaf-1 ve sitokrom c tarafından kolaylaştırılır. Sitokrom c, Apaf-1, kaspaz -9 ve dATP ya da ATP birleşerek moleküler ağırlığı yaklaşık 700 – 1400 kDa olan apoptozom ile büyük bir bileşik oluşturur. Apoptozom üretimindeki anahtar oyuncu mitokondridir. Bununla birlikte kaspaz -9, aktive olur ve apoptotik hücre ölümü yolağında kaspaz -3, 6, 7 aktive edilir ve apoptozis gelişir (Şahaboğlu, 2006; Aydoğdu et al., 2005; Orrenius et al., 2007; Philchenkov et al., 2004; Tomatır et al., 2003).

1.4.1.2 Hücre dışı uyaranlar aracılığı apoptozis

Bir diğer yolak da tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinden, ölüm reseptörlerinin aracılık yaptığı hücre dışı uyaranlar aracılığı ile oluşur. Bu yolak ölüm ligandının kendi reseptörüne bağlanması ile başlatılır. Şu ana kadar, ölüm reseptör ailesinin insanda en az sekiz tanesi tanımlanmıştır. Bunlar; Fas (CD95), TNF-R1, DR-3 (Apo-3, WSL-1, TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2), DR-6, EDA-R (ektodermal displazi reseptörü) ve NGF-R'dir. Ölüme neden olan reseptörler sitoplazma içinde ölüm alanı (DD, "dead domain") olarak adlandırılan bir bölge taşırlar. Ölüm reseptörü olan Fas (CD95), hücre yüzey reseptörü olup tümör nekroz faktör ailesinin en iyi tanımlanmış ölüm reseptörlerindendir. Apoptotik işaretin uyarıcısı olan Fas, birçok hücre tipinde sergilenir. Fas ligandı da (FasL) TNF ailesinin bir üyesidir. FasL'nın hedef hücredeki Fas reseptörüne bağlanması ile apoptotik işlem başlar. Bu mekanizma, bir immün tepki sonunda aktive olmuş T hücrelerinin uzaklaştırılması, virüs infekte hedef hücrelerin ortadan kaldırılması, tümör hücrelerinin öldürülmesi ve birçok patolojik durumdaki hücrelerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar. Ligandın hedef hücredeki reseptörüne bağlanmasını DISC (death-inducible signaling complex) formasyonunun oluşumu takip eder. Ölüm reseptörüne kendi ligantlarının bağlanması hücre içinde adaptör proteinin de (FADD) reseptöre bağlanmasına yol açar. FADD, bu kompleks içerisinde sırasıyla pro-kaspaz-8 ve -10'nun çalışmasına olanak verir. DISC'deki bu proenzimlerin yakın ilişkisi bunların katalitik aktivitesine, muhtemelen bir allosterik mekanizma tarafından pro-kaspaz-8 veya -10 molekülleri arasındaki dimerizasyona neden olur. Pro-kaspaz 8 aktif hale geçince kaspaz-8 oluşur ve kaspaz-8 direk hedef proteinleri bölerek apoptoza yol açan kaspaz-3'ü aktive eder. DISC içindeki kaspazların aktivasyonu hücre içi proteinlerden FLICE-inhibitör proteini (cFLIP) tarafından inhibe edilebilir. Bu proteinler hem DISC'i çalıştırabilir hem de kaspaz-8 ve -

10'nun aktivasyonunu baskılar (Şahaboğlu, 2006; Aydoğdu et al., 2005; Orrenius et al., 2007; Philchenkov et al., 2004; Tomatır et al., 2003; Sprick et al., 2004).



Şekil 1.6 Hücrede apoptotik yollar

1.4.2 Apoptozisin saptanmasında kullanılan yöntemler

1.4.2.1 Morfolojik görüntüleme yöntemleri

I. Işık mikroskobu kullanımı:

a. Hematoksilen boyama: Hematoksilen boyama (HB) hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metod olarak başlanması uygundur ve çeşitli açılardan (örn. ilk değerlendirme, maliyet) diğer metodlara karşı avantaj sağlar. Hematoksilen boyamada, hematoksilen boyası kromatini

boyadığından apoptotik hücreler nukleus morfolojisine göre değerlendirilir. Apoptozise özgü değişiklikler iyi bir boyama yapılmışsa kolayca gözlenebilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi "cell shrinkage", veya sitoplazmik küçülme "cytoplasmic shrinkage", kromatinin kondanse olması "nuclear condensation" ve nukleus zarının periferinde toplanması, nukleusun küçülmesi "pyknosis" veya parçalara bölünmesi "nuclear fragmentation" (Yılmaz, 2005).

b. Giemsa boyama: Giemsa ile boyamada hematoksilenle boyamada da olduğu gibi nukleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur (Yılmaz, 2005).

II. Floresan mikroskobu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı:

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini, dolayısıyla nukleusu görünür hale gelebilir. Eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Oysa, hematoksilen ya da Giemsa boyamanın kullanıldığı örneklerde hücrelerin tamamı yöntemin prensibi gereği zaten ölmektedir. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. propidium iyodür) beraber kullanılır. Bu boyama yöntemindeki prensip şudur: Bu yöntemlerde canlılığın belirleyicisi, hücrenin plazma membranının (hücre zarının) intact olup olmadığıdır. Membranı intact olan (canlı) hücreler propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlar. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskobu ile tanınabilir. Kuşkusuz bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayırımı hematoksilen boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisine bakılarak yapılır (Yılmaz, 2005).

III. Elektron mikroskobu:

Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptoziste en değerli yöntem ("gold standard") olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak

gözlendiği bir yöntemdir. Üstelik subselüler detaylar da incelenebilir (örn. mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi). Elektron mikroskobu çalışmalarında, nukleus fragmentasyonu net olarak izlenebilir, apoptotik hücrede, normal hücreyle kıyaslandığında sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilmektedir (Yılmaz, 2005).

1.4.2.2 Histokimyasal yöntemler

I. Anneksin V Yöntemi:

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS'ler, floresan bir adde (örn. F1TC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (Yılmaz, 2005).

II. TUNEL Yöntemi:

DNA kırıklarının serbest 3'OH kısmının biotin, digoxigenin ya da florescein gibi nükleotidler vasıtasıyla modifiye edilmiş enzimatik etiketler ile in situ olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu metodla saptanabilir (Yılmaz, 2005).

III. M30 Yöntemi:

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır (Yılmaz, 2005).

IV. Kaspaz-3 Yöntemi:

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu metodla tespit edilebilirler (Yılmaz, 2005).

1.4.2.3 Biyokimyasal yöntemler

I. Agaroze Jel Elektroforezi:

DNA fragmentasyonu, DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptoziste DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internukleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü "ladder pattern" oluşur. Bu bulgu apoptozisin karakteristik özelliğidir ve nekroziste görülmez. O yüzden apoptozisi nekrozisten ayırmada faydalı yöntemlerden biridir (Yılmaz, 2005).

II. "Western" Blotting:

Substrat kırılmaları; Aktif kaspazın belirlenmesi; Sitokrom c salıverilmesi gibi bu metod yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da bu metodla belirlenebilir. Yalnız, sitokrom c tespitinde önce alt fraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptozise gittikleri anlaşılır (Yılmaz, 2005).

III. "Flow" Sitometri:

DNA azalması; -Annexin V; "Flow" sitometri yardımıyla florasan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptoziste eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte

apoptozisin saptanmasında kullanışlı bir yöntemdir. İki farklı şekilde uygulanmaktadır (Yılmaz, 2005):

- a. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,
- b. Anneksin V kullanılarak.

Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemleri kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarı kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptozis lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu (sub-G1 piki) tayin edilir. İkincisinde, floresan mikroskobuyla uzun zaman alan sayma işlemi saniyeler içinde yapılarak sonuç alınır (Yılmaz, 2005).

1.4.2.4 İmmünolojik yöntemler

I. ELISA:

DNA fragmentasyonu; M30 düzeyi gibi ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür (Yılmaz, 2005).

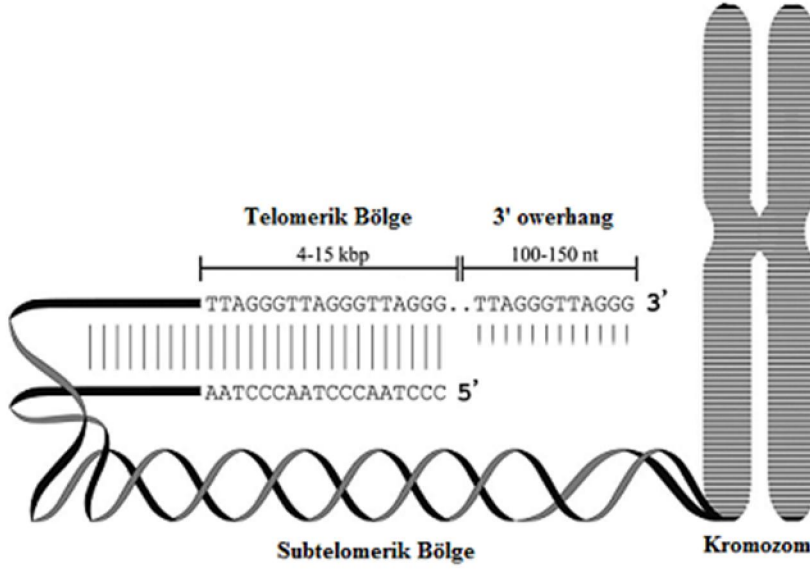
II. Flourimetrik Yöntem:

Kaspaz aktivasyonu (Hücre kültürü); Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu "plate"lere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur, ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır (Yılmaz, 2005).

1.5 Telomer Devamlılığı

Literatür araştırmaları apoptozun kontrolü ile telomer devamlılığı arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Telomerler ökaryotik kromozomların fiziksel uçlarıdır. Kromozom uçları türe spesifik korunmuş DNA dizilerinden ve bu dizilere bağlanan telomer bağlayan proteinler (Telomere-binding proteins,

TBP) olarak bilinen proteinlerden oluşmuşlardır. Telomerler kromozomun yapısal bütünlüğünün korunmasında önemli rol oynarlar. Telomerik DNA genel yapısı (T veya A)_m (G)_n şeklindedir. Omurgalılarda ise (TTAGGG)_n tekrar dizilerinden oluşur. Telomerik baz dizileri hücresel DNA'yı kararlı halde tutar ve onları yeni kombinasyonlardan (and-to-and fusion) korur. Tek bir hücrede türüne bağlı olarak 40.000-1 milyon telomerik tekrar bulunabilir (Okuyucu, 2008).

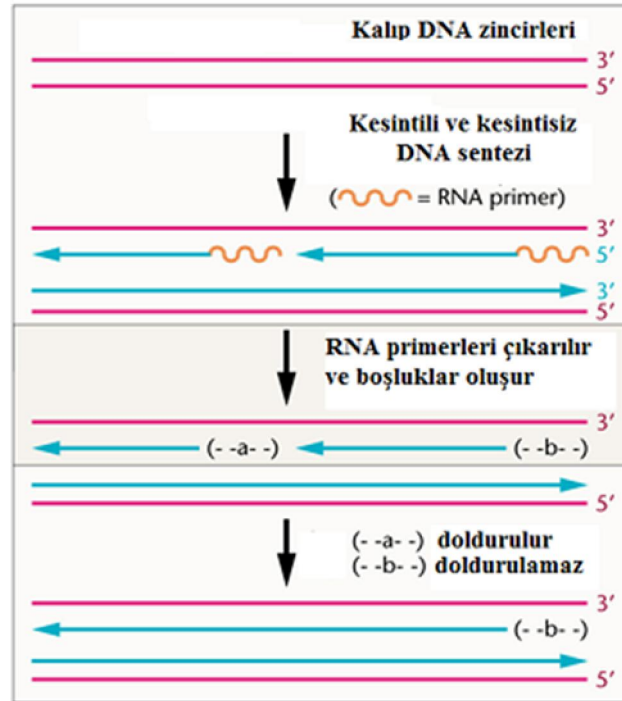


Şekil 1.7 Kromozom uçlarında görülen telomerik tekrar dizisi (Okuyucu, 2008).

Konvansiyonel DNA polimerazların sadece 5' → 3' doğrultusunda DNA'yı replike edebilmeleri nedeni ile oluşan uç replikasyon sorununa bağlı olarak hücre bölünme sayısı arttıkça, telomer boyu kısalır. DNA replikasyonuna bağlı telomer boyundaki bu kısalma hücre yaşlanma sınırının sinyalinin ortaya çıkmasında mitotik bir saat görevi görür. Telomerler hücre bölünmesi ile birlikte kritik bir noktaya kadar kısaltmaya devam ederler. O kritik noktada hücre yaşlanma sürecine girer ve daha fazla bölünmeyip hücre bölünme siklusundan çıkar (Okuyucu, 2008). Tümör hücrelerinde bu sorun büyük ölçüde telomeraz enzimi aktivasyonu ile aşılır. Ancak bazı tümör hücrelerinde ise kısa adıyla ALT (Alternative lengthening of telomerase) olarak bilinen rekombinasyona bağımlı telomerazdan bağımsız telomer devamlılığı rapor edilmiştir (Okuyucu, 2008).

Telomeraz eksikliği olan farelerde telomer kısalması ve telomerik füzyonlar ile birlikte apoptoz seviyesinin de arttığı gösterilmiştir. Apoptoz üreme ve homeopöetik sistem gibi yüksek oranda proliferatif dokularda gözlenmektedir

(Okuyucu, 2008). İnsan hücrelerinin telomer bağlayıcı proteinlerinin (TBP) genetik olarak manipüle edildiği bir çalışma telomer devamlılığı ve apoptozun kontrolü arasındaki bağlantıyı ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmada TRF-2'yi kodlayan gen mutasyona uğratıldığında apoptoz düzeyinin arttığı gösterilmiştir. TRF-2'nin telomer boyunu düzenlediği, telomerik füzyonları önlediği ve T-kıvrımlarının oluşumuna katkı sağladığı bilinmektedir. TRF-2 yokluğunda telomerler fonksiyon kaybına uğrarlar. Fonksiyon kaybı olan telomerlerin G-uzantıları olmayabilir ve bu nedenle de T-kıvrımlarını oluşturamazlar. Bu da disentrik kromozomların ortaya çıkmasına neden olur. Yapıdaki bu değişiklikler hücre bölünmesinin normal akışını etkileyerek hücre yaşlanması veya apoptoza yol açar (Okuyucu, 2008).



Şekil 1.8 Telomerdeki replikasyon sonu problemi (Okuyucu, 2008)

1.5.1 Southern blot (SB)

Southern tarafından 1975 yılında tanımlanan bu teknik, DNA ve telomer yapısının analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknikle DNA, Hinf1 veya Rsa1 gibi restriksiyon enzimleri ile belirli bölgelerinden kesilir ve daha sonra agaroz jel elektroforezi ile ayrılır. Elektroforezle ayrılan DNA parçaları nitroselüloz veya naylon jele aktarılır. Parçalara ayrılan DNA, telomere spesifik (CCCATT)_n gibi işaretli problerle hibridize

edilir. Probları işaretlemek için izotopik (^{32}P) veya digoxienin, biotin veya alkalin fosfataz gibi izotopik olmayan kemiluminesans maddeler kullanılabilir. SB ile yapılan TRF (Terminal Restriction Fragment) analizinin birkaç dezavantajı vardır. Elde edilen DNA'nın saf ve parçalanmamış olması gereklidir. Yüksek viskozitesi nedeniyle, parçalanmamış yüksek molekül ağırlıklı DNA elde edilmesi zordur. TRF bütün kromozomların ortalama telomer uzunluğunu yansıtır. TFR bilinmeyen uzunlukta subtelomerik bölge de içerir. Bu nedenle TRF gerçek telomer uzunluğu hakkında bilgi vermez. Bununla birlikte birkaç restriksiyon enzimi birlikte kullanılarak subtelomerik bölge azaltılır ve doğruluk artırılabilir. SB'ın diğer dezavantajı da analiz için en az 1 μg DNA gerekli olmasıdır. SB ile TRF analizinin dezavantajları fazla olsa da, günümüzde en sık kullanılan metoddur. Ayrıca diğer metodlarla karşılaştırmada standart bir metod olarak kullanılmaktadır (Karakaş, 2005).

2. MATERYAL METOD

2.1 Materyal

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmalar Tablo 2.1 de verilmiştir.

Tablo 2.1 Kullanılan kimyasallar

KİMYASAL ADI	FİRMA
Sodyum klorür (for molecular biology, $\geq 99.0\%$)	Sigma
Potasyum klorür (for molecular biology, $\geq 99.0\%$)	Sigma
Sodyum fosfat monobazik	Sigma
Methanol (anhydrous, 99.8%)	Sigma
Potasyum fosfat monobazik	Sigma
% 37 lik hidroklorikasit	Sigma
Sodyum sitrat	Sigma
Sodyum klorür	Sigma
Tris	Sigma
Hinfl kesim enzimi	NEB
RsaI kesim enzimi	NEB
ssDNA Apoptosis ELISA Kit	Chemicon
TeloTAGGG telomere length assay kit	Roche
Qiagen DNeasy Tissue Kit	Qiagen
Süt tozu	Lokal market

2.2 Cihaz ve Sistemler

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve temin edildikleri firmalar Tablo 2.2 de verilmiştir.

Tablo 2.2 Kullanılan cihazlar

CİHAZ ADI	FİRMA
Santrifüj	Hettich
İnkübatör	New Brunswick Scientific
Derin dondurucu	New Brunswick Scientific
Mikroplaka okuyucusu	Biotek
Agaroz jel elektroforez sistemi	Nyxtechnik
Elektroforez güç kaynağı	Nyxtechnik
UV membran bağlayıcı	Cleaver Scientific
Homojenizasyon cihazı	Qiagen
pH metre	Hanna
Manyetik karıştırıcı	IKA
Vorteks	IKA

2.3 Metod

Tez kapsamında ilk olarak Wistar albino türü sıçan sol böbrek dokularında 60 dakika boyunca iskemi oluşturuldu. İskemi oluşturulmadan alınan sağ ve sol böbrekler kontrol grubu (K) olarak kullanıldı. 60 dakika iskemi sonrası reperfüze edilen sol (I/R) ve iskemi oluşturulmamış sağ (N) böbreklerden farklı zaman dilimlerinde (1. saat I/R, 1. saat N, 24. saat I/R, 24. saat N, 5. gün I/R, 5. Gün N, 10. gün I/R, 10. gün N) alınan doku örneklerinde apoptotik hücre varlığı incelendi. Yapılan bu çalışmaya ek olarak iskemi öncesi antioksidan ajan enjekte edilen sıçanlarda aynı işlemler tekrar edilerek kullanılan NAC antioksidan ajanın apoptoz üzerine etkisi incelendi. Telomerik restriksiyonel fragmantasyon (TRF)

yöntemi ile de tüm örnek gruplarında telomerik tekrar devamlılığı apoptoz ilişkisi incelendi.

2.3.1 Örneklerin hazırlanması

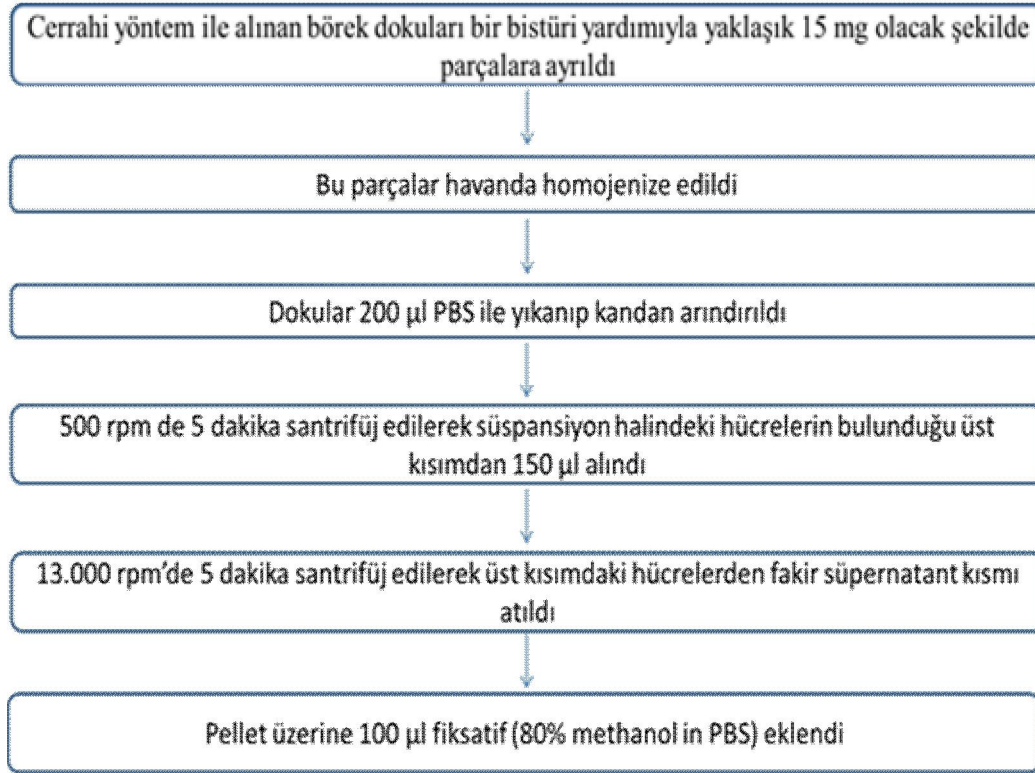
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD laboratuvarlarında deney ağırlıkları 220-260 gram arasında değişen, yaş olarak eşleştirilmiş Wistar albino türü erkek sıçanlardan elde edilen böbrek örnekleri kullanılmıştır. Bu çalışma için Çukurova Üniversitesi Etik Kurulu onayı alınmıştır. Deney ve kontrol gruplarında sıçanlara intramüsküler yoldan 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin verilip yeterli anestezi derinliği oluştuktan sonra karın ön duvarı median hattın 4-5 cm uzunluğunda kesi ile açılmıştır. Deney grubundaki sıçanlarda sol böbrek damarları kör diseksiyon ile ayrılmış ve atravmatik vasküler klemplere aracılığı ile kan akımı kesilerek iskemi oluşturulmuş, 60 dakika iskemi sonunda klempler çıkarılarak kan akımı tekrar sağlanmıştır. Çalışma materyalleri olarak iskemi sonrası reperfüzyonu takiben 1. saat, 24. saat, 5. gün, 10. gün olmak üzere anestezi altında sol böbrekler ve iskemi oluşturulmamış sağ böbrekler alınmış ve böbrek kapsülü sıyrıldıktan sonra bisturi yardımıyla longitudinal kesiyle ikiye ayrılarak toplanmıştır.

Antioksidan özelliği bilinen N-asetilsisteinin (NAC), I/R sonrası apoptoz süreci üzerine etkisini incelemek amacı ile ikinci grup çalışma örnekleri hazırlandı. Kontrol grubu olarak iskemi oluşturulmadan alınmış sol ve sağ (K) böbrekler kullanılmıştır. Deney grubu olarak da 60 dakika iskemi sonrası reperfüzyonu takiben 1. saatte anestezi altında alınmış sol (I/R) ve sağ (N) böbrekler, iskemi oluşturulmadan 2 saat önce 72 mg/kg dozunda NAC enjekte edilmiş ve iskemi sonrası reperfüzyonu takiben 1. saatte anestezi altında alınmış sol (NAC/I) ve iskemi oluşturulmamış sağ (NAC/N) böbrekler kullanılmıştır.

2.3.2 Böbrek dokularından homojenizat eldesi

Böbrek dokularından homojenizat eldesine ilişkin olarak yapılan işlemler Şekil 2.1’de şematize edilmiştir.

Şekil 2.1 Böbrek dokularından homojenizat eldesine ilişkin işlem basamakları



2.3.3 ssDNA apoptosis elisa kit ile apoptotik hücre deteksiyonu

Bu yöntem apoptotik hücre DNA sının formamid ile seçici denatürasyonu ve denatüre apoptotik hücre DNA sının monoklonal antikor ile deteksiyonu prensibine dayanır. Formamid apoptotik hücre DNA sının denatürasyonu için uygun bir ajan olup , apoptoz yokluğunda nekrotik hücre DNA sı ya da DNA kırıkları içeren hücrelerde denatürasyona neden olmamaktadır (Frankfurt ve ark.,2001). Formamid ajanının apoptotik hücre DNA ları üzerindeki seçiciliği DNA kırıkları ile değil kromatin yoğunlaşması ve DNA stabilizasyon proteinlerinin hidrolizi gibi apoptoz sürecinin belirteçlerinden olan kromatin değişiklikleri ile ilgilidir.

2.3.3.1 Ölçüm prosedürü

100 µl fiksatif (80% methanol PBS içerisinde) ile karıştırılan çalışma örnek hücre süspansiyonları ve kit içerisinde çıkan pozitif/negatif kontrol örnekleri 96 kuyucuklu plate e aktarıldı. 96-well plate 37 C de 4 saat inkübe edilerek hücrelerin plate kuyucuklarına bağlanması sağlandı. Kuyucuklara 50 µl formamid pipetlenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Plate 75 °C lik su banyosunda 10 dakika ardından +4 °C de inkübe edilerek denatürasyon sağlandı. Kuyucuklar 3 kez PBS ile yıkandı ve kuyucuklara 200 µl % 3 lik yağsız süt tozu karışımı pipetlendi. Plate 37 C de 60 dakika inkübe edilerek nonspesifik bağlanma bölgeleri bloke edildi. % 3 lük süt tozu çözeltisi uzaklaştırılarak kuyucuklara 100 µl antikor karışımı pipetlendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Antikor karışımı uzaklaştırılarak kuyucuklar 3 kez 250 µl 1x yıkama tamponu ile yıkandı. Kuyucuklara 100 µl substrat (ABTS) solüsyonu pipetlenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara 100 µl stop solüsyonu pipetlenerek 405 nm de absorbans ölçüldü.

2.3.4 Telomerik tekrar analizi

2.3.4.1 Böbrek dokularından genomik DNA izolasyonu

Böbrek dokuları bir bistüri yardımıyla yaklaşık 15 mg olacak şekilde parçalara ayrıldı ve TissueLyser homojenizasyon cihazında homojenize edildi. Homojenizattan Qiagen DNAeasy Tissue ticari dokudan DNA izolasyon kiti ile DNA izolasyonu yapıldı.

2.3.4.2 DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi ve görüntülenmesi

Kromozomal DNA'nın jel üzerinde görüntülenmesi ve restriksiyon öncesi spektrofotometre ile belirlenen miktar tayininin doğrulanması amacıyla DNA örneklerinin bir kısmına agaroz jel elektroforezi uygulandı.

2.3.4.3 DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA örneklerinden telomerik restriksiyon fragmanlarının saptanması amacıyla bu ve bundan sonraki basamaklarda TeloTAGGG “Telomere Length Assay” Kit (Roche, Almanya) kullanılmıştır. Dokulardan izole edilmiş olan genomik DNA örnekleri öncelikle

HinfI ve RsaI restriksiyon enzimleri ile muamele edildiler. Bu iki enzimin özelliği telomerik DNA'yı ve subtelomerik DNA'yı spesifik tekrar dizi (TTAGGG) özelliğinden dolayı kesmeyip, DNA'nın geri kalan kısımlarını (non-telomerik kısımlar) düşük moleküler ağırlık fragmanlarına kadar kesmeleridir. Telomer boyunun saptanmasına yönelik deneylerde sıklıkla bu 2 enzim birlikte kullanılır. Bu amaçla 1-2 µg DNA final hacmi 17 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile seyreltilti. HinfI ve RsaI enzimlerinin eşit hacimde karışımları hazırlandı. Her bir tüpe 2 µl kesim tamponu ve 1 µl enzim karışımı ilave edildi ve karıştırıldı. Reaksiyon karışımı 37°C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonu durdurmak amacıyla tüp içerisine 4 µl jel elektroforezi yükleme tamponu (5X) kondu ve karıştırıcıda karıştırıldı (Özşarlak Sözer, 2008).

2.3.4.4 Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş dna fragmanlarının agaroz jelde yürütülmesi

Her bir kuyucuğa 1-2 µg DNA içerecek şekilde restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA örnekleri yüklendi. Telomer uzunluğunun sağlıklı bir şekilde ölçülebilmesi için her bir örneğin eşit miktarda DNA içermesine özen gösterildi. Yaklaşık 500 ng moleküler ağırlık belirteci, 12 µl nükleaz içermeyen su ve 4 µl 5X yükleme tamponu karıştırıldı. Telomer uzunluğunun belirlenmesinde referans oluşturması için örneklerin her iki tarafına ilk ve son kuyucuğa 10'ar µl yüklendi. Daha sonra jel, 0.5xTBE tamponu içerisinde yükleme tamponu içerisindeki bromfenol mavisinin neden olduğu mavi boya yükleme yerinden 10 cm uzaklaşana dek yürütüldü (5V/cm). Daha sonra jel EtdBr (10 µg/ml) ile muamele edilerek UV'de görüntülendi (Özşarlak Sözer, 2008).

2.3.4.5 Southern blot yöntemi ile DNA'nın jelden membrana transfer edilmesi ve sabitlenmesi

UV'de görüntülenip kontrol edilen agaroz jel temiz bir kaba alındı. Transfer öncesi sırasıyla aşağıdaki işlem basamakları uygulandı ve bütün basamaklar oda sıcaklığında ve jel hafif çalkalanarak gerçekleştirildi:

1. Jel 10 dakika bromfenol mavisini sarıya dönene kadar 0,2 N HCl çözeltisi içerisinde depürinasyona tabi tutuldu. İki kez su ile yıkandı.
2. 2x15 dakika denatürasyon çözeltisinde bekletildi.

3. Tekrar iki kez su ile yıkandı.
4. 2x15 dakika nötralizasyon çözeltisi içerisinde bekletildi.
5. Jeli transfer çözeltisine hazırlamak amacıyla adaptasyon çözeltisi içerisinde (2xSSC-sodyum sitrat/sodyum klorür) 5 dakika bekletildi.
6. Transfer işlemine geçildi.

Jel üzerindeki DNA kapiler aktarım yoluyla naylon membrana transfer edildi. Jel düzenek üzerindeki iki ucu tampona değen blot kağıdı (Hybond®-Amersham, Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, İngiltere) üzerine ters ve arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Jel ile aynı boyutta kesilen naylon membran (Hybond-N⁺ positively charged nylon membrane, Amersham Biosciences, İngiltere) suda ıslatıldıktan sonra transfer çözeltisi olan 10xSSC'den (sodyum sitrat-sodyum klorür) geçirildi. Jel üzerine arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Üzeri yine aynı boyuttaki blot kağıtları ile örtüldü ve çok katlı kağıt havlular dizildikten sonra en üste ağırlık konarak gece boyunca (yaklaşık 16 saat) transfere bırakıldı. Süre sonunda ıslanmış kâğıt havlular ve blot kâğıtları kaldırıldı. Membran bir köşesinden işaretlendikten sonra pens ile ters çevrilip bir filtre kâğıdı üzerine alındı. Aktarımın başarılı olup olmadığının anlaşılması amacıyla jel UV'de görüntülendi. Transferin tam olup olmadığını anlamak için işlem sonrası jelde belirgin bir bantın kalmadığı kontrol edildi. Transfer olan DNA'nın membrana sabitlenmesi amacıyla "UV-crosslinker" cihazında 120 mJ'e tabi tutuldu (Özşarlak Sözer, 2008).

Tablo 2.3 Kullanılan tamponlar

Tampon	İçeriği	Formülasyon
Apürinasyon Tamponu	0.2 N HCl	%37'lik HCl'den 1:50
Denatürasyon Tamponu	0.5N NaOH/1.5 NaCl	300 ml 5M NaCl 100 ml 5N NaOH 600 ml distile su (1litre için)
Nötralizasyon Tamponu	1M Tris (pH 7.5) /1.5M NaCl	225 ml 5M NaCl 500 ml 1.5M Tris (pH 7.5) distile su ile 750 ml'ye tamamlanır.
Adaptasyon Tamponu	2x SSC	20xSSC'den 1:10 hazırlanır.
Transfer Tamponu	10xSSC	20xSSC'den 1:2 hazırlanır.
20xSSC stok çözeltisi	NaCl-Sodyum sitrat tamponu (pH:7.0)	175,3 g NaCl 88,2 g Sodyum sitrat 800 ml'ye dH ₂ O ile tamamlanır. pH :7,0'ye ayarlanır. Final hacmi:1lt.

2.3.4.5 Prehibridizasyonve hibridizasyon

Hibridizasyon işlemi sırasında problemlerin membrana ve DNA örneği üzerinde özgün olmayan bölgelere bağlanmasını en aza indirmek ya da önlemek amacıyla hibridizasyon öncesi işlemler yapılır (prehibridizasyon). Bu amaçla 200 cm²'lik bir membran için 18 ml olacak şekilde önceden 42°C'ye ısıtılmış DIG Easy Hyb (kit içerisinde hazır) çözeltisi içerisinde 30-60 dakika 42°C'de düşük

devirde hafif çalkalanarak “Thermoshaker”da inkübe edildi. Her 5 ml DIG Easy Hyb çözeltisine 1 µl DIG işaretli telomer probu olacak şekilde hibridizasyon çözeltisi hazırlandı. Prehibridizasyon işleminden sonra prehibridizasyon çözeltisi ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra membran hazırlanan hibridizasyon çözeltisi içerisinde DIG işaretli telomerik tekrar dizinlere spesifik prob ile 3 saat 42°C’de düşük devirde hafif çalkalanarak “Thermoshaker”da hibridizasyona bırakıldılar. 200 cm² membran için yaklaşık 6.5 ml hibridizasyon çözeltisi gerekmektedir. Probla nitroselüloz membran üzerindeki DNA tek zincir fragmanlarından tamamlayıcısı olan arasında, hidrojen bağları oluşumu ile çift zincirli DNA parçası meydana geldi. Hibridizasyon süresi sonunda hibridizasyon çözeltisi uzaklaştırıldı ve önce 2 defa 5’er dakika hibridizasyon sonrası 1. yıkama çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında yıkandı. Daha sonra hibridizasyon sonrası 2. yıkama çözeltisi içerisinde 2 defa 15’er dakika önceden 50°C’ye ayarlanmış “Thermoshaker”da düşük devirde hafif çalkalanarak yıkandı. Bu yıkama işlemlerinin sonunda hibridize olmayan fakat membranın yüzeyine tutunan problemler ortamdan uzaklaştırıldılar (Özşarlak Sözer, 2008).

2.3.4.6 Hibridize olmuş telomerik DNA’nın belirlenmesi

Membran yeni temiz bir kaba alındı. Oda sıcaklığında 100 ml yıkama tamponunda 5 dakika yıkandı. Yıkama tamponu uzaklaştırıldı ve membran 30 dakika oda sıcaklığında hafif çalkalanarak taze hazırlanmış bloklama çözeltisi içerisinde inkübe edildi. Bloklama çözeltisi uzaklaştırıldı. Daha sonra 75mU/ml olacak şekilde (1/10,000 oranında) bloklama çözeltisi içerisinde sulandırılmış Anti-DIG-Alkalen fosfataz (AP) çözeltisi hazırlandı. Membran bu çözelti ile probun yapısındaki digoksijenin ile anti-DIG arasında kompleks oluşumu için oda sıcaklığında 30 dakika hafif çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda Anti-DIG-AP antikor çözeltisi uzaklaştırılarak membran bağlanmayan fakat membran yüzeyine tutunmuş olan antikorları uzaklaştırmak için 2 defa 15’er dakika 200 ml yıkama tamponu (kitte hazır) içerisinde yıkandı. Yıkama tamponu uzaklaştırıldıktan sonra membran 2-5 dakika oda sıcaklığında 100 ml belirleme tamponu içerisinde inkübe edildi. Belirleme tamponu (kitte hazır) uzaklaştırıldıktan sonra fazla sıvının uzaklaştırılması amacıyla membran absorban bir kâğıt üzerine kondu. Daha sonra membran DNA bağlı yüzü üste gelecek şekilde bir naylon film üzerine yerleştirildi. Bu işlem sırasında membran yüzeyi kurumamalıdır. Membranın üzerine alkalenfosfataz enziminin substratı olan CDP-star maddesini içeren çözeltiden 40 damla damlatıldı ve membranın bütün yüzeyine homojen dağılması sağlandı. Membranın üzeri arada hava kalmayacak

ve düzgün bir yüzey oluşturacak şekilde tekrar naylon film ile kapatıldı. Daha sonra bir kaset içerisinde karanlık bir odada ışık geçirmeyecek şekilde yaklaşık 30 dakika radyografi filmi ile etkileştirildi. Daha sonra film banyo edilerek telomerik fragmanlara ait bant görüntüleri elde edildi (Özşarlak Sözer, 2008).

Bu yöntem kemilüminesans adını alır ve esası alkali fosfatın kemilüminesan özellik gösteren substratı ile reaksiyona girmesi sonucu substratın ışık sinyalleri (kemilüminesans) oluşturacak ürünlere dönüştürmesi esasına dayanır. Oluşan bu ışık sinyallerinin radyografi filmini bozundurma sonucu membrandaki bant görüntüsü filme yansır. Daha sonra filmdeki telomerik fragmanlara ait bölgeler moleküler ağırlık standartı ile karşılaştırılarak dansimetrik olarak tayin edildi (Özşarlak Sözer, 2008). Bu amaçla aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Ortalama Telomer uzunluğu} = \frac{\sum(OD_i)}{\sum(OD_i/L_i)}$$

OD_i: Kemilüminesan sinyal (optik dansite)

L_i: i pozisyonunda telomer fragmanının boyu (TeloTAGG Telomer Length Assay kiti, Roche, Almanya)

Tablo 2.4 Hibridizasyonda kullanılan çözeltiler

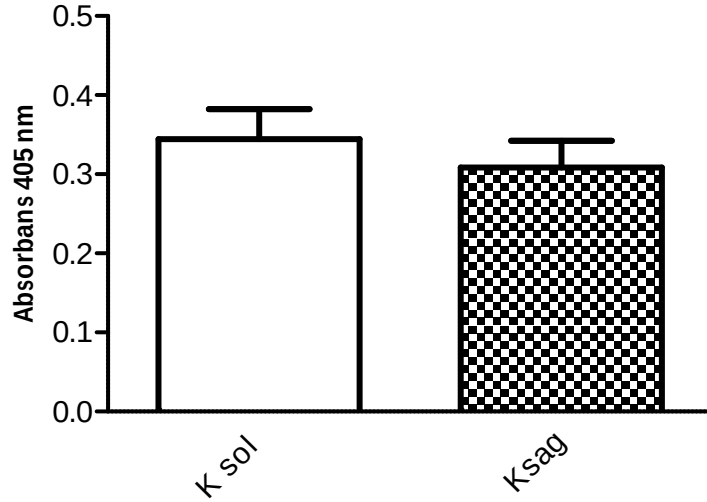
Tampon	İçeriği
1. yıkama çözeltisi	2xSSC %0.1 SDS
2. yıkama çözeltisi	0.2xSSC %0.1 SDS
Bloklama tamponu	Kit içerisinde hazır verilen 10x bloklama tamponundan maleik asit ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanır.
Anti-DIG-AP tamponu	Kit içerisinde verilen anti-DIG-AP çözeltisi daha önceden hazırlanmış olan bloklama tamponu ile 1:10 oranında seyreltilir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Böbrek örneklerinde ölçülen apoptozis absorbans düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edildi. Anlamlılık eşik değeri olarak $p < 0,05$ kullanılmıştır.

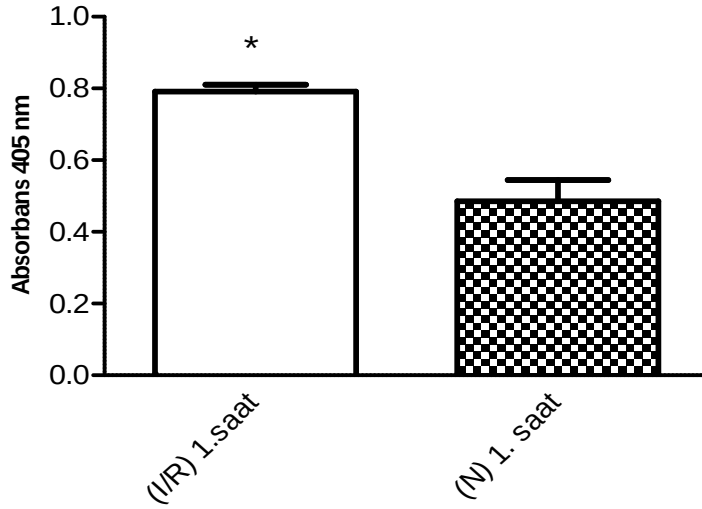
3.1 İskemi/Reperfüzyon ve apoptoz ilişkisi

Kontrol grubu sol (Ksol) ve sağ (Ksağ) böbrek örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



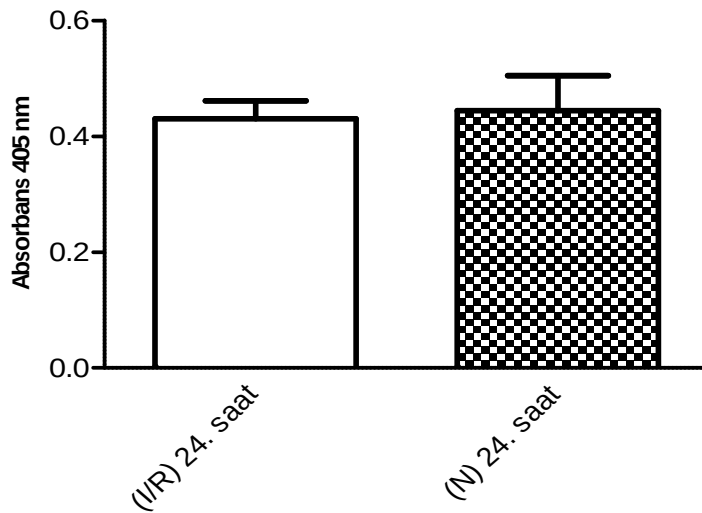
Şekil 3.1 Ksol ve Ksağ böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi (n=4)

Reperfüzyon sonrası 1. saat sol (I/R) böbrek örneklerinde 1. saat sağ (N) böbrek örneklerine göre apoptotik hücre oranının anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi (* $p<0.05$).



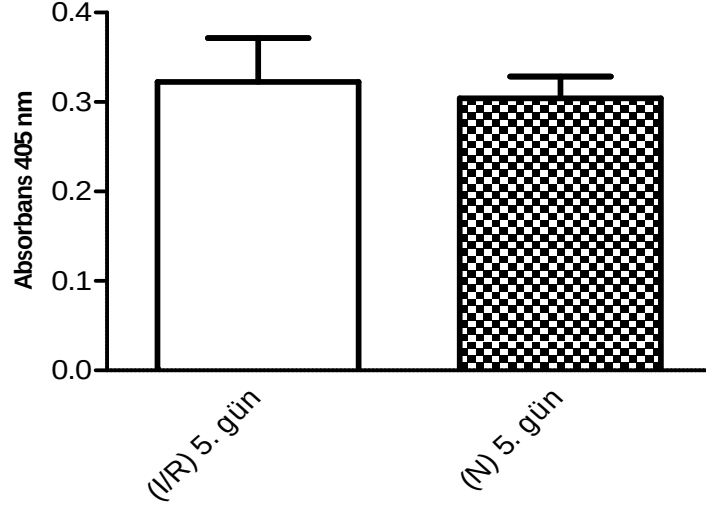
Şekil 3.2 Reperfüzyon sonrası 1. saat (I/R) ve 1. saat (N) böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi (* $p<0.05$, $n=4$).

Reperfüzyon sonrası 24. saat sol (I/R) ve 24. saat sağ (N) böbrek örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



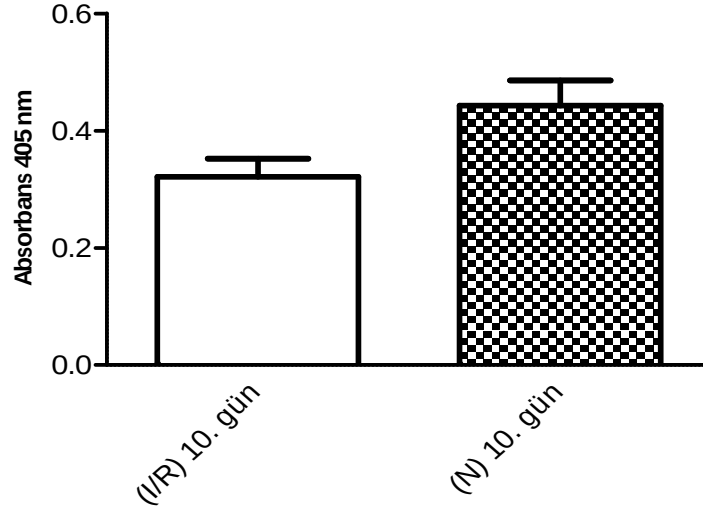
Şekil 3.3 Reperfüzyon sonrası 24. saat (I/R) ve 24. saat (N) böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi ($n=3$)

Reperfüzyon sonrası 5. gün sol (I/R) ve 5. gün sağ (N) böbrek örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



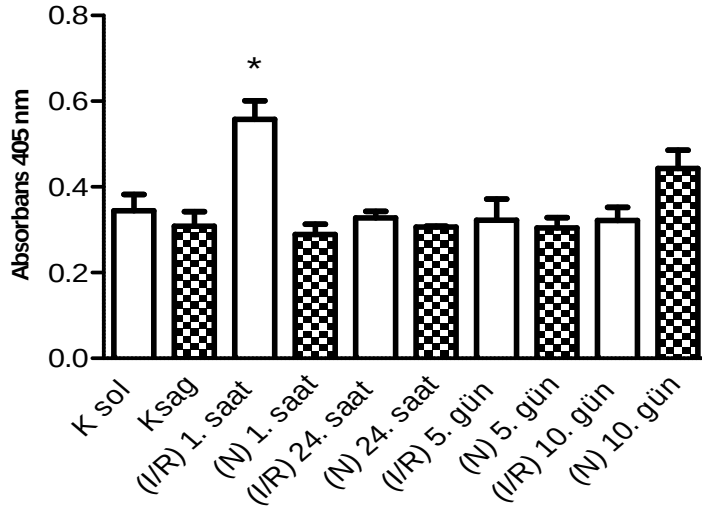
Şekil 3.4 Reperfüzyon sonrası 5. Gün (I/R) ve 5. Gün (N) böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi (n=4)

Reperfüzyon sonrası 10. gün sol (I/R) ve 10. gün sağ (N) böbrek örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 3.5 Reperfüzyon sonrası 10. Gün (I/R) ve 10. gün (N) böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi (n=4)

Tüm grupların sol (I/R) ve sağ (N) böbrek örnekleri Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile apoptotik hücre oranları açısından karşılaştırıldığında 1. saat sol (I/R) böbrek örneklerinde diğer grupların sol (I/R) ve sağ (N) böbrek örneklerine göre apoptotik hücre oranının anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi (* $p < 0.05$)

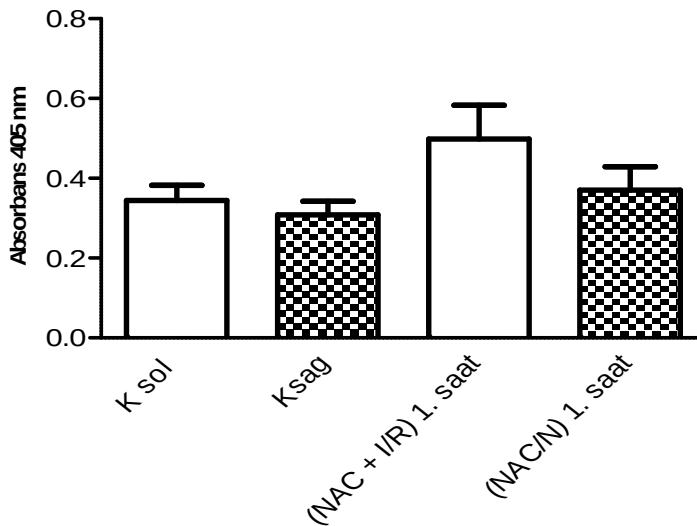


Şekil 3.6 Tüm örnek grupları (I/R) ve (N) böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi

(* $p < 0.05$).

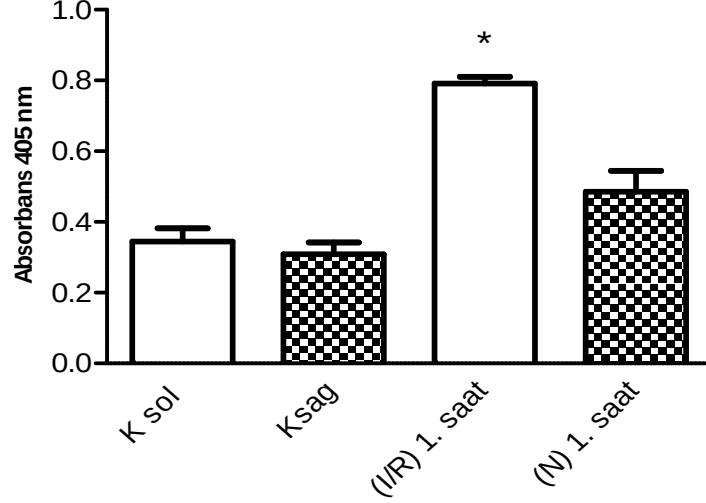
3.2 İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-asetilsisteinin (NAC) Apoptoz Üzerine Etkisi

Kontrol (K) grubu ve iskemi öncesi N-asetilsisteinin enjekte edildikten sonra reperfüzyonu takiben 1. saate anestezi altında alınmış sol (NAC + I/R 1. saat) ve sağ böbrek (NAC/N 1. saat) örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



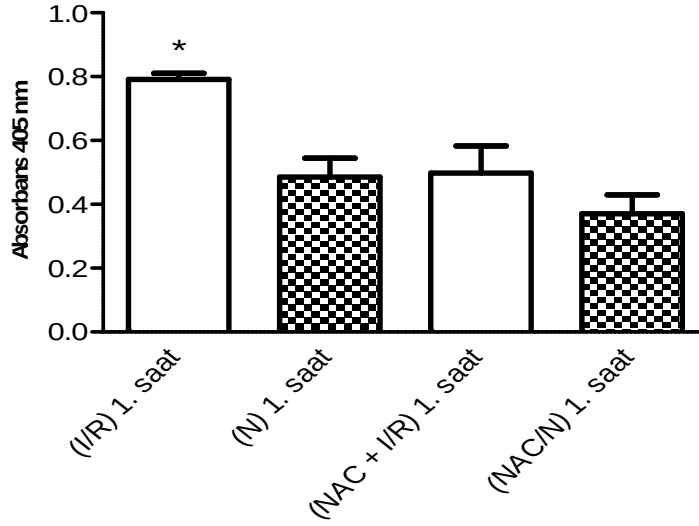
Şekil 3.7 K, (NAC + I/R 1. saat) ve (NAC/N 1. saat) böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi.

Kontrol grubu, reperfüzyon sonrası 1. saat sol (I/R 1. saat) ve sağ (N 1. saat) böbrek örnekleri arasında apoptotik hücre oranı istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 1. saat sol (I/R 1. saat) böbrek örneklerinde apoptotik hücre oranının anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi. (* $p<0.05$)



Şekil 3.8 Ksol, (I/R) 1. saat ve (N) 1.saat böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi (* $p<0.05$)

İskemi sonrası reperfüzyonu takiben 1. saatte alınmış sol (I/R) ve sağ (N) böbrek örnekleri ile iskemi öncesi NAC enjekte edilmiş ve reperfüzyonu takiben 1. saatte alınmış sol (NAC + I/R 1. saat) ve sağ (NAC/N 1. saat) böbrek örnekleri apoptotik hücre oranları açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 1. saat sol (I/R) böbrek örneklerinde apoptotik hücre oranının anlamlı düzeyde arttığı ya da iskemi öncesi NAC enjekte edilmiş böbrek örneklerinde (NAC + I/R 1. saat) apoptotik hücre oranının anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi (* $p<0.05$).



Şekil 3.9 (I/R) 1. Saat, (N) 1. saat (NAC+I/R) 1.saat, (NAC/N) 1.saat böbrek örnekleri apoptozis ilişkisi

3.3 Telomer Devamlılığı ve Apoptozis İlişkisi

Kullandığımız yöntemin hassasiyet sınırları içerisinde aldığımız sonuçlar anlamlı bir fark göstermemiştir.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Bir organ veya dokuya kan akımının kesilmesi ve daha sonraki reperfüzyon süreci hücre ölümü ve organ disfonksiyonuna yol açan bir dizi patolojik reaksiyonu başlatır. Son yıllarda araştırma tekniklerinin gelişmesiyle birlikte bu patolojik tablonun ortaya çıkmasında asıl önemli rolü reperfüzyon sürecindeki olayların oynadığı anlaşılmıştır. Reperfüzyon hasarı sonucu oluşan fonksiyon bozukluğu organdan organa değişiklikler göstermekle beraber, hasardan oksijen radikallerinin sorumlu olduğu belirlenmiştir. Böbrekte İ/R, oksidatif strese neden olur ve böylece reaktif oksijen ürünleri artarken antioksidan savunma sistemi kaybolur. İskemik dokuda hücreler geri dönüşümlü hasar görmüşse veya bu hasardan etkilenmemişse reperfüzyon bu hücrelerin geri kazanılmasını sağlar. Ancak bu iskemik hasarın yoğunluk ve süresine bağlı olmakla birlikte, pek çok hücrede reperfüzyon sonrası apoptozis ve nekroz ile hücreler ölmektedir. Sıçan böbrek dokusunda İ/R hasarı oluşturduğumuz çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında, 60 dakika sürekli iskemi sonrası 60 dakika reperfüzyon süresinin hücrelerde apoptozu tetiklediği ve bu sürenin sıçan böbrek dokusu için kritik reperfüzyon hasar süresi olduğu gözlenmiştir. Daha önce sıçan böbrek dokusunda yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiş, sürekli iskemi sonrası 1-4 saat reperfüzyon süresinin apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca sıçanlarda farklı doku örneklerinde yapılan benzer çalışmalarda apoptozu indükleyen kritik reperfüzyon süreleri belirlenmiştir (Chien et. al., 2001; Fliss et. al., 1996).

Dokularda, oksidatif hasara karşı enzimatik ve non-enzimatik antioksidan mekanizmalar vardır. Antioksidan enzim sistemleri; iki süperoksit dismutaz (CuZnSOD ve MnSOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir. Non-enzimatik endojen antioksidanların en önemlilerinden biri glutatyon (GSH)'dur. N-asetilsistein (NAC)'ın serbest radikaller tarafından oluşturulan doku hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu ve bu etkisini GSH düzeyini artırarak veya stabil nitrozotil türevleri oluşturarak gerçekleştirdiği bildirilmektedir. NAC' ı n, böbrek İ /R hasarının da içinde olduğu birçok deneysel böbrek yetmezliği modeline karşı koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir (Aydoğdu et al., 2005). Çalışmamızda güçlü bir antioksidan ve glutatyon sentezinin öncülü olarak rol oynayan NAC'ın sıçan böbrek dokusunda sürekli iskemi sonrası reperfüzyon hasarına bağlı gelişen apoptozu önleyici etkisini araştırdık. İ/R ile oluşturulmuş böbrek hasarının, apoptozun NAC tarafından önemli düzeyde azaltıldığı gözlenmiştir.

Bu tez çalışmasının sonuçları, sıçan böbrek dokusunda 60 dakika sürekli iskemi sonrası 60 dakika reperfüzyon süresinin hücrelerde apoptozu tetiklediğini ve bu sürenin sıçan böbrek dokusu için kritik reperfüzyon hasar süresi olduğunu göstermiştir. Ayrıca sonuçlar sıçan böbrek dokusunda İ/R hasarının ve apoptozun güçlü bir antioksidan olan NAC kullanımı ile azaltılabildiği, önlenemediğini göstermiştir. Bu bulgulardan yola çıkılarak klinikte böbrek vasküler cerrahisi veya böbrek nakli gibi ameliyatlarda, ameliyat öncesi NAC kullanımı ile iskemi sonrası 1 saat reperfüzyon süresinin ameliyat sırasında gelişebilen İ/R hasarından korumada etkili olabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aksoy, N., Vural, H., Sabuncu, T., Arslan, O. and Aksoy, S., 2005, Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stres in diabetic rats, *Nutrition Research*, 25: 625–630pp.
- Akşit, H. ve Bildik, A., 2008, Apoptozis, *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 19(1): 55-63pp.
- Arino, O., 1995, Mathematical modelling of the loss of telomere sequences, *J. Theor. Biol.*, 177: 45–57pp.
- Aydoğdu, N., Kaymak, K. ve Yalçın, Ö., 2005, Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri, *Fırat Tıp Dergisi*, 10(4): 151-155pp.
- Cawthon, R. M., 2002, Telomere measurement by quantitative PCR, *Nucleic Acids Res.*, 30-47pp.
- Chien, C. T., 2001, De Novo Demonstration and Co-localization of Free-Radical Production and Apoptosis Formation in Rat Kidney Subjected to Ischemia/Reperfusion , *JASN*, 12: 973-982pp.
- Clarke, E. D., Greenhow, D. T. and Adams, D., 1998, Metabolism-related assays and their application to agrochemical research: reactivity of pesticides with glutathione and glutathione transferases, *Pestic. Sci.*, 54: 385-393pp.
- Cohen, J. J., 1993, Apoptosis, *Immunol Today*, 14: 126-130pp.
- Çelik, S. ve Yılmaz, Ö., 1999, Diabetik Ratlarda Vitamin E'nin Serum Lipitleri ve Lipit Peroksidasyonu Üzerine Etkisi, *Tr. J. of Biology*, 23: 39-46pp.
- Çelik, S. and Özkaya, A., 2002, Effects of Intraperitoneally Administered Lipoic Acid, Vitamin E, and Linalool on the Level of Total Lipid and Fatty Acids in Guinea Pig Brain with Oxidative Stress Induced by H₂O₂, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 547-552pp.
- Clauss, M., Vandenabeele, P. and Buurman, W.A., 1999, Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation, *Journal of Clinical Investigation*, 104: 541-549pp.
- Daemen, M. and de Vries, A. B., 2001, Apoptosis and chemokine induction after renal ischemia-reperfusion, *Transplantation* ,71: 1007-1011pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Daemen, M. and de Vries, A. B., 2002, Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury, *Transplantation*, 73: 1693-1700pp.
- Demiralay, R., Gürsan, N. and Erdem, H., 2006, The effects of erdosteine, N-acetylcysteine, and vitamin E on nicotine-induced apoptosis of pulmonary cells, *Toxicology*, 219: 197-207pp.
- Derek, M., Yellon, D., Derek, J. and Hausenloy, D., 2007, Myocardial Reperfusion Injury, *N. Engl. J. Med.*, 357: 1121-1135pp.
- Dilsiz, N., Celik, S., Yilmaz, Ö. and Dıgrak, M., 1997, The Effects of Selenium, Vitamin E and their Combination on the Composition of Fatty Acids and Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell Biochemistry And Function*, 15: 265-269pp.
- Erat, M. and Ciftci, M., 2006, Effect of melatonin on enzyme activities of glutathione reductase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo, *European Journal of Pharmacology*, 537: 59–63pp.
- Fliss, H. and Gatteringer, D., 1996, Apoptosis in Ischemic and Reperfused Rat Myocardium *Circulation Research.*, 79: 949-956pp.
- Frankfurt, O. S. and Krishan, A., 2001, Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin, *J. Histochem. Cytochem.*, 49: 369-378pp.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A., 1992, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J. Cell Biol.*, 119: 493-501pp.
- Karakaş, Ö., 2005, Arpada Gen Aktarım Frekansının Artırılmasına Yönelik Çalışmalar, Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, İ., 2011, *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, Ankara.
- Keser, S., Celik, S., Turkoglu, S., Yilmaz, Ö. and Turkoglu, I., 2012, Hydrogen Peroxide Radical Scavenging and Total Antioxidant Activity of Hawthorn, *Chemistry Journal*, 2: 9-12pp.
- Nelson, D. L. and Cox, M. M., 2004, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Freeman, USA.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, Z. P., Duan, X. R., Liu, C. H. and Du, B. A., 2006, Selective determination of cysteine by resonance light scattering technique based on self-assembly of gold nanoparticles, *Anal. Biochem.*, 351: 18–25pp.
- Liaño, F. and Pascual, J., 1996, The Madrid Acute Renal Failure Group. Epidemiology of acute renal failure: A prospective multicenter community based study, *Kidney Int*, 50: 811-818pp.
- Lomaestro, B. M. and Malone, M., 1995, Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues, *The annals of pharmacotherapy*, 29: 1263-73pp.
- Lu, J., Ashwell, K., Ken, W. S. and Waite, P., 2000, Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis, *Spine*, 25: 1859-1866pp.
- Mathews, C. K., van Holde, K. E. and Ahern, K. G., 2000, *Biochemistry*, Pearson, USA.
- Okuyucu, A., 2008, Ratlarda Roziglitazon'un Telomer Dinamiğine Etkisinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması, *Uzmanlık Tezi*, Samsun
- Orrenius, S., 2007, Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death, *Drug Metabolism Reviews*, 39:443-455pp.
- Özkaya, A., Çelik, S. and Yılmaz, Ö., 2009, 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen Verilen Kobayların Beyin Lipit Bileşenleri Üzerine α -Lipoik asit'in Etkisi, *Fırat Univ. Journal of Science* 21: 61-65pp.
- Özşarlak Sözer, G., 2008, Tavşanlarda Balon Hasarı Sonrası Damar Düz Kas Hücrelerinde Telomer Devamlılığı Ve Oksidan Stresin Rolü, *Doktora Tezi*, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- Paller, M. S., Hoidal, J. R. and Ferris, T. F., Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure, *Journal of Clinical Investigation*, 74 (4): 1156– 1164, 1984pp.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. and Piemonte, F., 2003, Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification, *Clinica Chimica Acta*, 333: 19-39pp.
- Philchenkov, A., 2004, Caspases: potential targets for regulating cell death, *J. Cell. Mol. Med.*, 8(4): 432-444pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Possari, R., Carvalhal, R. F., Mendes, R. K. and Kubota, L. T., 2006, Electrochemical detection of cysteine in a flow system based on reductive desorption of thiols from gold, *Anal. Chim. Acta*, 575: 172–179pp.
- Potesil, D., Petrlova, J., Adam, V., Vacek, J., Klejdus, B., Zehnalek, J., Trnkova, L., Havel, L. and Kizek, R., 2005, Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (*Zea mays* L.) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chrom. A*, 1084: 134–144pp.
- Ricci, F., Arduini, F., Tuta, C. S., Sozzo, U., Moscone, D., Amine, A. and Palleschi, G., 2006, Glutathione amperometric detection based on a thiol–disulfide exchange reaction, *Anal. Chim. Acta*, 558: 164–170pp.
- Sies, H., 1999, Glutathione and its role in cellular functions, *Free Radikal Biology and Medicine*, 27 (9/10): 916-921pp.
- Sprick, M., R. and Walczak, H., 2004, The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1644:125-132pp.
- Şahaboğlu, A., 2006, Deneysel İskemi-Reperfüzyon Oluşturulmuş Sıçan Retinasında Apoptozisin İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa .
- Tomatır, A.,G., 2003, Apoptoz: Programlı hücre ölümü, *T. Klin. Tıp Bilimleri*, 23: 499-508pp.
- Vaux, D. L., 1993, Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 90: 786-789pp.
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., Turner, N., 2004, Glutathione metabolism and its implications for health, *J. Nutr.*, 134: 489-492pp.
- Yannarelli, G. G., Fernandez-Alvarez, A. J., Santa-Cruz, D. M. and Tomaro, M. L., 2007, Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress, *Phytochemistry*, 68 (4): 505-512.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yılmaz, İ., 2005, Erişkin Ratlarda Deneysel Varikozel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptozis Düzeylerinin Yükselmesi; Ve Yükselmiş Olan Apoptozisin Varikoselektomi Sonrası Gerileme Düzeyi Ve Süresinin Tunel Yöntemi İle Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.
- Yılmaz, O., Celik, S., Nazıroğlu, M., Cay, M. and Dilsiz, N., 1997, The Effects of Dietary Selenium and Vitamin E and their Combination on the Fatty Acids of Erythrocytes, Bone Marrow and Spleen Tissue Lipids of Lambs, *Cell Biochemistry And Function*, 15: 1-7pp.
- Yılmaz, O. and Celik, S., 2003, A combination of alpha-tocopherol, vitamin C and N-acetylcysteine increases unsaturated fatty acid levels in hydrogen peroxide-induced *Candida tropicalis* (ATCC13803), *Cell Biochem Funct*, 21: 269–274pp.
- Zhang, Y., Gu, Y., Lewis, D. F. and Wang, Y., 2006, Reduced Cellular Glutathione Reductase Activity and increased adhesion molecule expression in endothelial cells cultured with maternal plasma from women with preeclampsia, *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 13 (6): 412-417pp.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Serhat DEMİRKOL

Doğum tarihi, yeri :28.02.1981- Zonguldak

Medeni hali :Evli

Uyruğu :T.C

Adres :Yeşil Mah. 53 sok. No:12 D:11 Gaziemir/İZMİR

Tel :0 530 3252488

E-mail :serhat981@gmail.com

Eğitim Durumu:

OKUL	DERECE	YIL
Mehmet Çelikel Lisesi, Zonguldak	Lise	1995-1999
Ege Üniversitesi, İzmir	Lisans (Biyokimya)	1999-2003
Ege Üniversitesi, İzmir	Yük. Lisans (Biyoteknoloji)	2009- Devam Ediyor