

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYONUNDA NÖTRAL
SFİNGOMYELİNAZ İNHİBİSYONUN ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİNE VE APOPTOTİK HÜCRE
ÖLÜMÜNE OLAN ETKİSİ**

Hazal TUZCU BALABAN

DOKTORA TEZİ

2018-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYONUNDA NÖTRAL
SFİNGOMYELİNAZ İNHİBİSYONUN ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİNE VE APOPTOTİK HÜCRE
ÖLÜMÜNE OLAN ETKİSİ**

Hazal TUZCU BALABAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mutay ASLAN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2016-1908 proje numarası ile desteklenmiştir

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir“

2018-ANTALYA

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. 25/ 10/ 2018

imza

Tez Danışmanı: :Prof. Dr. Mutay ASLAN

Akdeniz Üniversitesi

Üye :Doç. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN

Akdeniz Üniversitesi

Üye :Prof. Dr. Aysel AĞAR

Akdeniz Üniversitesi

Üye :Doç. Dr. Güzin AYKAL

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Üye :Doç. Dr. Ayşenur YEĞİN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun /..... /..... tarih ve /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Narin DERİN

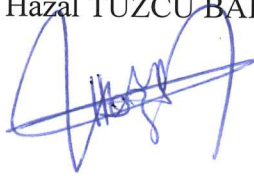
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda 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 beyan ederim.

Öğrenci

Hazal TUZCU BALABAN



Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mutay ASLAN



TEŐEKKÜR

Bu araştırmanın her aşamasında, sonuna kadar desteğini belli eden bilgisini ve emeğini hiç esirgemeyen proje yürütücüsü ve akademik danışmanım Sayın Prof. Dr. Mutay ASLAN'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Uzun, yorucu eğitim ve öğretim hayatımın tüm aşamasında ve yaşantımın her anlarında büyük bir sabırla desteklerini ve sonsuz sevgilerini hep yanımda hissettiğim annem Ayşe TUZCU, babam Süleyman TUZCU ve sevgili eşim Kadir BALABAN' a en samimi duygularımla sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Eğitim süreci ve tezin yazım süreci boyunca desteklerini ve yardımlarını hiç esirgemeyen tüm Sağlık Bilimleri Enstütüsü ęalıřanlarına çok teőekkür ederim.

Yüksek lisans ve doktora eğitim süresi boyunca görev yaptığım Patoloji Anabilim Dalı'nda bulunan tüm değerli öğretim üyesi hocalarıma ve ęalıřma arkadaşlarıma, katkıları ve bana zor zamanlarda verdikleri destek için Őükranlarımı sunarım.

ÖZET

Amaç: Önceki çalışmalar karaciğer (KC) ılık iskemi reperfüzyon (IR) hasarından sonra nötral sfingomyelinaz (N-SMase)/seramid yolağının hepatik dokuda aktive olduğunu göstermiştir. Fazla miktarda seramid birikiminin apoptotik stimulus oluşturduğu bilinmekte ve hepatik IR hasarından sonra apoptozis ve endoplazmik retikulum (ER) stresi arasında bağlantı kurulmaktadır. Bu sebeplerden dolayı mevcut çalışmada sıçan KC IR modelinde N-SMase inhibisyonunun ER stresi ve apoptotik biyobelirteçler üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Yöntem: Selektif N-SMase inhibitörü intraperitoneal enjeksiyonlar ile verildi. Karaciğer IR hasarı orta ve sol lateral hepatik loblara giden kan damarlarının 60 dakika klampe edilmesi ve sonrasında 60 dakika reperfüzyon ile sağlandı. Karaciğer dokusundaki sfingomyelin ve seramid düzeyleri optimize çoklu reaksiyon izleme (MRM) metoduyla ultrahızlı sıvı kromatografi ve tandem kütle spektrometri (MS/MS) ile ölçüldü. Gen ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile belirlendi.

Bulgular: Tüm IR gruplarında sfingomyelin düzeyleri kontrollere göre anlamlı bir artış gösterdi. Spesifik N-SMase inhibitörüyle tedavi IR gruplarında ölçülen seramid düzeylerini anlamlı olarak azalttı. İskemi reperfüzyon hasarında ER stresi biyobelirteci olan C/EBP-homolog protein (CHOP) ve 78 kDa glukoz-regüle protein (GRP78) düzeyleri anlamlı olarak arttı. Karaciğer IR hasarında N-SMase inhibisyonu ER stresi biyobelirteçlerinde anlamlı bir etki göstermedi. İskemi reperfüzyon hasarında N-SMase inhibisyonu phospho NF-kB seviyelerinde, heptatik TUNEL boyanmasında, sitozolik sitokrom c, kaspaz-3, -8 ve -9 aktivitelerinde anlamlı bir azalma sağladı.

Sonuç: Elde edilen bulgular KC IR hasarında seramid artışının apoptotik hücre ölümüne sebebiyet verdiğini doğruladı. Mevcut modelde N-SMase inhibisyonunun koruyucu etkisi apoptotik uyarıyı azaltmak suretiyle oluştu. Çalışmanın sonuçları KC IR hasarının önlenmesinde N-SMase inhibitörlerinin kullanılmasını destekler.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer; iskemi–reperfüzyon hasarı; seramid; nötral sfingomyelinaz.

ABSTRACT

Objective: Previous studies have revealed the activation of neutral sphingomyelinase (N-SMase)/ceramide pathway in hepatic tissue following warm liver ischemia reperfusion (IR) injury. Excessive ceramide accumulation is known to potentiate apoptotic stimuli and a link between apoptosis and endoplasmic reticulum (ER) stress has been established in hepatic IR injury. Thus, this study determined the role of selective N-SMase inhibition on ER stress and apoptotic markers in a rat model of liver IR injury.

Methods: Selective N-SMase inhibitor was administered via intraperitoneal injections. Liver IR injury was created by clamping blood vessels supplying the median and left lateral hepatic lobes for 60 min, followed by 60 min reperfusion. Levels of sphingomyelin and ceramide in liver tissue were determined by an optimized multiple reactions monitoring (MRM) method using ultrafast-liquid chromatography (UFLC) coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS). Gene expression levels were determined by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: Sphingomyelin levels were significantly increased in all IR groups compared with controls. Treatment with a specific N-SMase inhibitor significantly decreased all measured ceramides in IR injury. A significant increase was observed in ER stress markers C/EBP-homologous protein (CHOP) and 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78) in IR injury, which was not significantly altered by N-SMase inhibition. Inhibition of N-SMase caused a significant reduction in phosphoNF- κ B levels, hepatic TUNEL staining, cytosolic cytochrome c, and caspase-3, -8, and -9 activities which were significantly increased in IR injury.

Conclusion: Data herein confirm the role of ceramide in increased apoptotic cell death and highlight the protective effect of N-SMase inhibition in downregulation of apoptotic stimuli responses occurring in hepatic IR injury.

Key words: Liver; ischemia–reperfusion injury; ceramide; neutral sphingomyelinase.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı	2
2.2. İskemik Dönemde Gelişen Fizyopatolojik Olaylar	3
2.3. Reperfüzyon Döneminde Gelişen Fizyopatolojik Olaylar	5
2.4. ER Stresi Ve Katlanmamış Protein Cevabı	5
2.4.1. ER Stresine Bağlı PERK Sinyal Yolu	7
2.4.2. ER Stresine Bağlı ATF6 Sinyal Yolu	9
2.4.3. ER Stresine Bağlı IRE-1 Sinyal Yolu	9
2.5. Apoptoz	10
2.6. ER Stresiyle İndüklenen Apoptozis Yolakları	10
2.6.1 .ER Stres Markerı CHOP (C/EBP) Homolog Protein İndüksiyonu	11
2.6.2. BCL2 Protein Ailesi	12
2.6.3. JNK Protein Aktivasyonu	13
2.6.4. Kaspaz Aktivasyonu	13
2.7. Nötral Sfingomiyelinaz /seramid Yolağı	14
3.GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Albino Wistar Sıçanlarında Karaciğer İskemi Reperfüzyonu Oluşturulması	17
3.2. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarının Patolojik Verilerle Belirlenmesi	18
3.3. Serum Alanin Aminotransferaz Aktivitesinin Ölçümü	19
3.4. Sfingomyelinaz Aktivitesinin Ölçümü	19
3.5. Sfingomyelin ve Seramid Ölçümü	20

3.6. İmmünohistokimyasal Boyama	21
3.7. Elektron Mikroskopi	22
3.8. Western blot analizi	22
3.9. RNA Ekstraksiyonu	23
3.10. Primer-Probe Düzenlenmesi ve Optimizasyonu	23
3.11. Kuantitatif PCR Analizi	25
3.12. Nüklear Faktör Kappa-B İmmünoassay	25
3.13. TUNEL Analizi	25
3.14. Doku Örneklerinde Mitokondrial ve Sitozolik Fraksiyonların Ayrımı	26
3.15. Cytochrome c Protein Miktarının Tayini	26
3.16. Kaspaz Aktivitesinin Ölçümü	26
3.17. Protein Ölçümleri	27
3.18. İstatistiksel Analiz	27
4.BULGULAR	
4.1. Karaciğer Hasarı	28
4.2. Karaciğer N-SMase Aktivitesi, Sfingomyelin ve Seramid Düzeyleri	29
4.3. Karaciğer ER Stresi Biyobelirteçleri	30
4.4. NF-kB p65 Protein Düzeyleri	32
4.5. Apoptozis	34
4.6. Sitokrom c Protein Miktarı	34
4.7. Kaspaz Aktivitesi	34
5.TARTIŞMA	37
6.SONUÇLAR	41
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	49

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Analiz edilen sfingolipidler için ana ve ürün iyonlar.	20
Tablo 3.2. Q-RT-PCR deneyleri için kullanılan primer ve probelar	25
Tablo 4.1. Karaciğer kesitlerinin histopatolojik skorlaması.	29



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil. 2.1.	UPR sinyal yolağı	7
Şekil. 2.2.	ER Stresine Bağlı PERK sinyal yolağı	9
Şekil. 2.3.	ER stresine bağı IRE1 yolağı	10
Şekil. 2.4.	ER stresiyle indüklenen apoptotik mekanizmalar	11
Şekil. 2.5.	Bcl-2 Protein Ailesi Aracılı Apoptozis Yolu.	13
Şekil. 2.6.	Kaspaz Aktivasyon Yolakları	14
Şekil. 2.7.	Apoptotik yolaklar	15
Şekil. 2.8.	Bioaktif sfingolipid metabolitleri	16
Şekil. 3.1.	Karaciğer iskemi reperfüzyon modeli	17
Şekil. 4.1.	Karaciğer kesitlerinin hematoksilin eozin boyanması ve plazma ALT aktivitesi	28
Şekil. 4.2.	Sfingomyelinaz aktivitesi ve sfingolipid ölçümü	30
Şekil. 4.3.	Karaciğer dokusunda GRP78 immünoboyaması	31
Şekil. 4.4.	Endoplazmik retikulum stresi biyobelirteçleri	32
Şekil. 4.5.	Karaciğer NF-kB p65	33
Şekil. 4.6.	Karaciğer TUNEL boyaması	35
Şekil. 5.1.	İskemi reperfüzyon hasarının nötral sfingomyelinaz aktivitesi	39

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMP	:	Adenozin monofosfat
APAF1	:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
ASK1	:	Apoptoz sinyali düzenleyen kinaz 1
ATF4	:	Aktive transkripsiyon faktörü 4
ATF6	:	Aktive transkripsiyon faktörü 6
ATP	:	Adenozin trifosfat
ATPaz	:	Adenozin trifofataz
BAK	:	Apoptotik regülatör
BAP31	:	B hücre reseptör ilişkili protein 31
BAR	:	Çift fonksiyonlu apoptozis regülatörü
BAX	:	Apoptotik regülatör
Bcl-2	:	B-hücre lösemi/lenfoma2
bZIP	:	Basik-lösin fermuarlı transkripsiyon faktörü
Ca⁺⁺	:	Kalsiyum
CHOP	:	C/EBP Homolog Protein
DDIT3	:	DNA- hasarını uyarıcı Transkript-3
EIF2α	:	Ökaryotik translasyon başlama faktörü 2 α
ER	:	Endoplazmik retikulum
ERAD	:	ER ilişkili protein degradasyon sistemi
GADD153	:	Büyümeyi durdurucu ve DNA hasarını indükleyen gen
Grp78	:	Glukoz regüle edici protein 78
Grp94	:	Glukoz regüle edici protein 94
I/R	:	İskemi reperfüzyon
IRE	:	İnositol gerektiren enzim 1
JNK	:	c-Jun N-terminal Kinaz
KC	:	Karaciğer
KH	:	Kupffer hücreleri
NAD	:	Nikotin adenin dinükleotit
NF-κB	:	Nükleer faktör kappa B
Nrf2	:	Nükleer faktör-eritroid bağlantılı faktör 2
NOS₂	:	Nitrik oksit sentaz 2
NL	:	Nötrofil lökosit

O₂	:	Oksijen
PERK	:	PKR benzeri ER kinaz
ROS	:	Reaktif oksijen metabolitleri
SIP	:	Sfingosin 1 fosfat
SMase	:	Sfingomyelinaz
TNFα	:	Tümör nekroz faktör alfa
TRAF2	:	TNF-reseptör ilişkili faktör 2
UPR	:	Katlanmamış protein cevabı
XBP1	:	X-Box bağlayıcı protein 1
XDH	:	Ksantin dehidrogenaz
XO	:	Ksantin oksidaz



1.GİRİŞ

Karaciğer IR hasarı KC transplantasyonlarında, tümör çıkırılması için uygulanan KC ameliyatlarında, travmada ve hemorajik şoktan sonra gelişen KC yetmezliğinde önemli bir klinik problemdir (Doğan ve Aslan, 2011). Karaciğer cerrahisinde hepatik kan akımının kısmi veya total olarak kesilmesi gerekli olabilir. Kan akımının kesilmesi durumuna "ılık iskemi" denir ve revaskülerizasyonu takiben moleküler oksijenin sağlanmasıyla organda "reperfüzyon hasarı" oluşur (Doğan ve Aslan, 2011). Hepatik IR hasarı hepatositlerde apoptozisi tetikler ve organ yetmezliği ile ilişkili patolojik bulgulara sebebiyet verir (Rodriquez ve ark, 2015). Hepatik IR hasarında hepatositlerin apoptotik ölümü ile ER stresi arasında önemli bir ilişki tespit edilmiştir (Peralta ve Brenner, 2011). Endoplazmik retikulum stresi, ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikimi sonucunda oluşur ve protein homeostazisini bozar. Oluşan ER stresi sonucunda hücrelerde katlanmamış protein yanıtı [unfolded protein response (UPR)] denilen adaptif bir mekanizma ortaya çıkar. Bu mekanizma ER stresi sırasında oluşan toksik metabolitleri temizlemeyi ve protein homeostazisini düzenlemeyi amaçlar. Uzamış ER stresi UPR cevabının başarısız olmasına neden olur ve apoptotik süreci aktive eder (Rasheva ve Domingos, 2009). Sfingolipid metabolizmasında bozulmalar hem ER stresi (Boslem ve ark, 2011) hem de IR hasarında gösterilmiştir (Novgorodov ve Gudz, 2009). Seramid hücre membranında yer alan bir sfingolipiddir ve hücrenin strese cevabında anahtar bir mediyatördür. İskemi reperfüzyona bağlı mitokondrial hasarda kritik bir role sahiptir (Novgorodov ve Gudz, 2009). Literatürde var olan çalışmalar ılık KC IR hasarından sonra fazla miktarda seramid birikiminin olduğunu rapor etmektedir (Llacuna ve ark, 2006; Unal ve ark, 2016). Fazla miktarda seramid oluşumunun her memeli hücresinde apoptotik uyarıya sebebiyet verdiği bilinmektedir (Mullen ve Obeid, 2012). Seramid de novo sentezle, sfingomyelinin sfingomyelinaz (SMase) enzimi aracılığıyla parçalanmasıyla ve glikosfingolipidlerin yıkımıyla oluşur (Wu ve ark, 2010). Farklı tipde olan SMase enzimleri vardır. Karaciğer ılık IR hasarında asit ve nötral SMase enzimleri araştırılmıştır (Llacuna ve ark, 2006; Unal ve ark, 2016). Mevcut çalışmada sıçan KC IR modelinde nötral-SMase inhibitörü kullandık ve bu inhibitörün ER stresi ve apoptozis üzerindeki etkilerini inceledik. Çalışmamız KC IR hasarında oluşan ER stresi ve apoptozis üzerinde selektif N-SMase inhibisyonunun etkilerini inceleyen ilk araştırmadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı

Bir organa ulaşan kan akımının azalmasının sonucunda organın oksijen ve beslenme desteğinin de azalması meydana gelir (Doğan ve Aslan, 2011). Karaciğer (KC) iskemi reperfüzyon (IR) hasarı, KC iskemisini takiben kan akımının restorasyonu sonucunda gelişir (Szocs, 2004). Organda kan akımı ve oksijen desteğinin tekrar sağlanmasıyla reperfüzyon meydana gelir. Bu durum iskemik dönemin neden olduğu doku hasarını hücresele seviyede yükseltir. Özellikle transplantasyon ve KC cerrahisinde KC canlılığına doğrudan etkisi olan bu durum fenomen iskemi reperfüzyon (I/R) hasarı olarak bilinir (Doğan ve Aslan, 2011). Hücresele düzeyde yapılan çalışmalar, reperfüzyon hasarının gelişmesinde endoplazmik retikulum stresinin ve apoptozisin önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Otani, 2004; Gorchach ve ark, 2006). I/R hasarı karaciğerde ilk kez 1975’de Pereyra-Toledo ve arkadaşları tarafından deneysel olarak gerçekleştirilen KC transplantasyonun da ortaya çıkmıştır. Transplante edilmiş KC’de pasif bir süreç olan konjesyon, ilerleyici trombozis, ve sonrasında organ yetmezliği ile sonuçlanan greft nekrozu gelişmiştir (Yamaoka ve ark, 1992).

Karaciğer reperfüzyon hasarı, sıcak I/R hasarı ve soğuk-depolama reperfüzyon hasarı olarak gruplandırılabilir. KC cerrahisi ile bağlantılı olan sıcak iskemi reperfüzyon hasarıdır Soğuk depolama reperfüzyon hasarı ise transplantasyon öncesinde organın korunması sırasında gelişmektedir (Mortensen ve ark, 2001). Karaciğer transplantasyonu, birkaç çeşit toksik KC hasarları, no-okluziv hastalıklar ve hipovolemik şok gibi gelişen önemi oldukça yüksek durumlarda meydana gelir. KC bulunan birbirinden farklı damarlara ait kan dolaşımının geçici süre için engellenmesi (klampe edilmesi) gerekmektedir Bunun sebebi karaciğer tranplantasyonlarında, kanser ve bazı hastalıkların cerrahi olarak tedavisinde, operasyon esnasında kan kayıplarını ve operasyon sonrası gelişebilecek birtakım komplikasyonların azaltılmasıdır (Glantzounis ve ark, 2005; Hines ve ark, 2003). Damarın klempe edilmesi esnasında KC kısmi veya tam iskemi olmaktadır. Sonrasında ise reperfüzyon durumuna geçmektedir (Mortensen ve ark, 2001). Sıcak I/R hasarında başlangıç evresi ve geç evre olmak üzere iki evre vardır. Başlangıç evresi, reperfüzyondan sonraki iki saatten kısa ve oksidan stresle kendini karakterize eden etkisi önemli bir evredir. Bu

dönemde reaktif oksijen metabolitleri (ROS)'un üretilir. Reaktif oksijen türlerinin salgılanması doğrudan hepatositlerde hasara sebebiyet verir.

Geç evre ise hepatik reperfüzyon oluştuktan 6-48 saat sonraki evredir. Geç dönemde ise birleşen nötrofil lökosit (NL) aracılığı ile inflamasyon durumu gerçekleşir (Hines ve ark, 2003). Karaciğer I/R hasarı, hepatoselüler hasara yol açan ve hepatositlerin, sinuzoidal hücrelerin, sinuzoidlerin duvarında fagositoz yapan Kupffer hücrelerin (KH) içine sızan makrofajların nötrofillerin ve plateletlerinde bu durumla iç içe olduğu çeşitli ve oldukça karmaşık olan olaylar kaskatıdır (Delva ve ark, 1989).

Tıpta KC IR hasarı KC rezeksiyonlarında, KC transplantasyonlarında, travma ve hemorajik şok durumlarında gelişir (Szocs, 2004).

2.2. İskemik Dönemde Meydana Gelen Fizyopatolojik Olaylar

Karaciğer I/R hasarı patofizyolojisinde iskemi, organ ve dokuda venöz veya arteriyel kan akımının yavaşlayıp azalması ile ilişkili olarak organ ve dokunun yetersiz perfüzyonunun sonucunda bu doku veya organların oksijenden mahrum kalması olayıdır. İskemi sırasında hücrel oksidatif fosforilasyon azalır ve ilk olarak mitokondrielerde gerçekleşen adenosin trifosfat (ATP) sentezi son bulur. ATP azalması ise hücre içinde bazı sistemleri etkileyerek Na^+/K^+ ATPaz pompa bozukluğuna sebep olur. ATP kaybı aynı zamanda hücre içi asidoz gelişimine bağlı olarak pH'nın düşmesine, intrasellüler Ca^{++} birikimine ve pürin metabolitlerinin birikimine yol açar. Bütün bunların sonunda hücrel enerji depolarının boşalması ve hücrelerde toksik metabolitlerin birikmesi durumuna bağlı olarak hücre ölümü meydana gelir (Zimmerman ve Granger, 1992).

ATP aktivitesinin eksilmesine bağlı olarak zarda aktif sodyum pompasının yetersizliği meydana gelir ve bu durum hücre içinde sodyumun birikmesine ve potasyumun hücre dışına çıkarılmasına neden olur. Hücre içinde solid metabolik materyalin artması izoozmotik olacak şekilde suyun birikmesine ve bunun sonucunda akut olarak hücrel şişmeye yol açar (Doğan ve Aslan, 2011).

İskeminin ilk dakikalarında glikolitik yol aşırı bir şekilde uyarılır. İskemik dokuda mevcut olan oksijen oksidatif fosforilasyonu desteklemek için yetersiz kalır. Piruvatın glikoliz sonucunda oluştuktan sonra, sitrik asit siklusuna devam edememesi sebebiyle laktata dönüşmesi gerçekleşir. Biyokimyasal olarak çok önemli bir süreç olan glikoliz,

laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi sonucu oluşan inorganik fosfatın birikimine yol açar. Bunun sonucunda hücre içi pH düşer ve asidoz meydana gelir (Zimmerman ve Granger, 1992). Metabolik asidozun oluşması hepatositlerde nekrotik hücre ölümünün başlaması durumuna karşı oldukça koruyucudur. Fakat iskemi olmuş hücrelerde reperfüzyonun sağlanmasıyla birlikte pH normale döner. pH'ın normale dönmesi ise pH'a bağımlı proteazları ve fosfolipazları aktive ederek hücre ölümüne yol açmaktadır. Bu durum fenomen "pH paradoksu" olarak isimlendirilir İskemiye uğramış hücreler asidik pH'da reperfüze olduklarında hücre ölümü son bulmaktadır. (Grace, 1994; Bond ve ark, 1993).

İskemi ve belirli toksinler nedeniyle erken dönemde endoplazmik retikulumdan (ER) ve mitokondriden kalsiyum salınımı gerçekleşir. Bunun sonucunda plazma membranını net şekilde geçen kalsiyum transferi sitozolde kalsiyumun konsantrasyonunda artmaya yol açmaktadır. Ca^{++} 'un hücrede artması sonrasında, membranın permeabilitesinde spesifik olmayan artışı ile desteklenmektedir. Yükselen Ca^{++} konsantrasyonu, membran hasarını başlatan pH bağımlı fosfolipaz, membran ve sitoiskelatal proteinleri parçalama görevini gerçekleştiren proteaz, ATP azalmasını hızlı bir şekilde gerçekleştiren ATPaz gibi birçok enzimin aktivasyonuna yol açar (Zimmerman ve Granger, 1992).

İskemi döneminde ATP üretimi son bulur fakat kullanımı devam eder. Bunun sonucunda ATP'den adenzin monofosfat (AMP) ve adenzin oluşur. Oluşan adenzin, hızla bir şekilde hücrenin dış kısmına difüze olarak hipoksantin ile inozine parçalanır. Normal şartlarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz (XDH) enzimi aracılığı ile nikotin adenin dinükleotit (NAD) kullanılarak ksantine dönüşmesi gerçekleştirilir. Fakat iskemi sırasında XDH, kalsiyum bağımlı proteazlar aracılığı ile ksantin oksidaza (XO) dönüşür (Zimmerman ve Granger, 1992). Bu enzimler (XO ve XDH) arasındaki önemli fark, XDH, NAD^{+} 'ı elektron alıcısı olarak kullanırken; XO, O_2 'ni elektron alıcısı olarak kullanarak süperoksit ve/veya hidrojen peroksit oluşturur. Fakat her iki form da hipoksantinden ksantin oluşumunu ve sonrasında ksantinden ürik asit oluşumunu katalize eder (Berry ve Hare, 2004; Harrison, 2002). Süperoksit oluşması için gerekli olan oksijen iskemi döneminde bulunmaz. Reperfüzyon sırasında oksijenin aniden ortama katılması serbest radikal patlamasına neden olur ve XO

tarafından oluşturulan süperoksit anyonu, doku yaralanmasına yol açar (Parks ve ark, 1988).

2.3. Reperfüzyon Döneminde Gelişen Fizyopatolojik Olaylar

İskemik dokuya kan dolaşımının yeniden sağlanması reperfüzyon olarak tanımlanır. İskemi olan dokuya hücrenin rejenerasyonu ve de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekmektedir. Fakat, iskemi olan dokunun reperfüzyonu sırasında eş zamanlı ortaya çıkan reaksiyonlar dokuda yalnızca iskemi ile meydana gelen hasara göre çok daha ciddi bir hasar oluşmasına neden olur (Zimmerman ve Granger, 1992). İskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ortaya konulmuştur. Bu faktörler birbiriyle ilişkisi fazlasıyla karmaşık olan, humoral ve hücrel olaylar serisidir (Monsinjon ve ark, 2001). I/R hasarı karakteristik olarak, serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına (Rose ve ark, 1994); PMNL'nin aktivasyonuna (Carden); sitokin salınımında artışa (Shames ve ark, 2002); kompleman sistemin aktivasyonuna (Riedemann ve Ward, 2003) ve eikozanoidlerin üretiminde artışa neden olur (Myers ve ark, 1995).

2.4.ER Stresi Ve Katlanmamış Protein Cevabı

Endoplazmik retikulum (ER), membran yapısındaki proteinlerin ve hücre dışına gönderilecek proteinlerin yapıldığı ve 3 boyutlu hale geldiği mebran yapısındaki dinamik ve multifonksiyonlu bir organeldir. Aynı zamanda proteinlerin doğru yapıldığını kontrol eden kilit merkezidir (Szegezdie, 2006). Sitozolde düşük oranda Ca^{+2} bulunmasına rağmen ER fazla miktarda Ca^{+2} bulundurmaktadır.(Hussain ve Ramaiah, 2007) Hücrenin dışına yollanacak ve membran yapısında olan proteinlerin hepsi ER'nin sitozolik yüzeyi üzerinde yer alan, hücre için en temel organel olan ribozomlar tarafından ER lümenine taşınmaktadır. Taşınan ve ER'ye gelen yeni sentezlenmiş proteinler bir dizi önemli reaksiyon olan hidroksilasyon, N-bağımlı glikolizasyon, disülfid bağ oluşumu lipidizasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlara uğradıktan sonra katlanırlar. Moleküler şaperonlar olan glukoz-regüle edici protein 78 (Grp 78), glukoz-regüle edici protein 94 (Grp 94), kalneksin ve kalretikulin gibi lektin benzeri proteinler, proteinlerin tek tek her katlanma aşamasının başarılı ve düzgün bir şekilde tamamlanması için görev yapmaktadır. (Rasheva ve Domingos, 2009; Düzgün, 2010). Proteinlerin katlanma işlemi oldukça önemli ve karmaşık bir dizi işlem döngüsünden oluşmaktadır. Dolayısıyla hata olasılığı çok

fazladır. Hipoksi, N-bağımlı glikolizasyon inhibisyonu, kalsiyum homeostazının bozulması, inflamatuvar etki, oksidatif stres, gelişen enfeksiyonlar, ortamın sıcaklık durumu gibi birçok önemli faktörün proteinlerin doğru katlanmasında etkisi oldukça fazladır([http://vizyon21yy.com/documan/Genel_Konular/Bilim_Teknoloji/Tip/Endo pl_azmik_Redikulum.pdf](http://vizyon21yy.com/documan/Genel_Konular/Bilim_Teknoloji/Tip/Endo_pl_azmik_Redikulum.pdf). Erişim Tarihi:20/ 10/ 2011).

ER zayıf çevresel değişimlerle ve hücresel streslerle, sinyal yollarının koordinasyonunu sağlayan büyük bir makine olarak tanımlanmaktadır. (Hotamisligil, 2010). Böylelikle hücre fonksiyonu çok muntazam bir şekilde düzenlenir ve hücre sağ kalımı sağlanır. Aşırı mutant protein, enerji ya da besin eksikliği, viral proteinler redoks değişimi gibi çeşitli fizyopatolojik olaylar protein katlanmasında ER kapasitesini bozabilir veya ER stresini başlatabilir ve ER stresinin meydana gelmesi, katlanmamış proteinlerin ya da yanlış katlanmış proteinlerin ER lümeninde birikmesine yol açar. Sonrasında ise ER stresi KC'de lipid metabolizmasını, glukoz homeostazını ve demir dengesini bozar (Ron ve Walter, 2007). Hücreler toksik protein bileşiklerini yok etmek için bir mekanizmanın aktifleşmesini sağlarlar. Bu mekanizma hücre içi sinyal yollarından oluşur ve genel olarak “katlanmamış protein cevabı” (unfolded protein response, UPR) olarak adlandırılır (Jing ve ark, 2012).

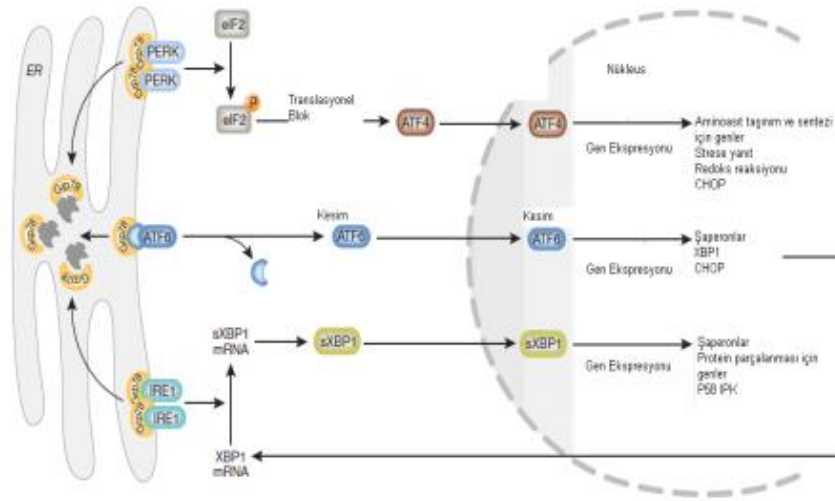
Hücreler için proteinlerin birikimi, hücreye oldukça zarar veren toksik bir etkiye sahiptir. Günümüzde genetik mutasyonlar, yaşlanma veya nedeni bilinmeyen çevresel faktörler nedeniyle ortaya çıkan anormal katlanmış proteinlerin birikimi, tip 2 diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıkların ve nörodejeneratif hastalıklardan olan alzheimer, parkinson, hungtungton gibi çeşitli patolojik ve fizyolojik durumların bir özelliği olarak kabul edilmektedir. Bir hücrenin meydana gelen stresi hissetmesi, hücrenin strese cevap vermesi ve stresi azaltması homeostazın sağlanması için mutlaka şarttır. Katlanmamış protein cevabı, katlanmamış proteinlerin birikmesini eksiltmek için cevap oluşturur ve ER işlevlerini düzenlemektedir. Eğer adapte durumu sağlanamazsa ve proteinlerin birikmesi devam ederse diğer çevre dokuya zarar vermemek için hücre bir dizi gen ürünü tarafından düzenlenen apoptozise yönlendirilir (Szegezdie, 2006; Kaufman, 2002).

Katlanmamış protein cevabı, ER stresini azaltır ve üç temel stratejiyle protein homeostazını düzenler. Bunlardan ilki, protein translasyonunu baskılayarak daha fazla katlanmamış protein oluşumunu durdurmak; ikincisi, katlanmamış proteinleri tekrar

katlayan ER ile ilişkili moleküler şaperonları uyarmak; ve üçüncüsü ise katlanmamış proteinleri ortadan kaldırmaya yarayan ER ilişkili protein yıkımını (ER associated degradation ERAD system) aktif hale geçirmek (Harding ve ark, 1999). Hücrede UPR cevabının oluştuğunu gösteren markerlar arasında ER membranında bulunan PKRbenzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK), glukoz-regüle edici protein78 (GRP78) ve C/EBP Homolog Protein (CHOP) bulunur (Bertolotti ve ark, 2002).

UPR'nin aktivasyonu 3 farklı ER stres sensörü tarafından düzenlenmektedir Bu mediyatörler aktive transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) PKR benzeri ER kinaz (PERK), ve inozitol gereken enzim 1 (IRE1) olarak adlandırılan integral proteinlerdir (Şekil 2.1).

UPR'nin aktivasyonunun sağlanması ile translasyon ve protein sentez yükü azalır. Bununla birlikte ER'de katlanmamış proteinlerin birikimini önleme, ER katlama enzimlerini kodlayan genlerin translasyonun artırılması gibi birçok hücresel cevabın oluşması meydana gelmektedir (Rasheva ve Domingos, 2009; Ron ve Walter, 2007).



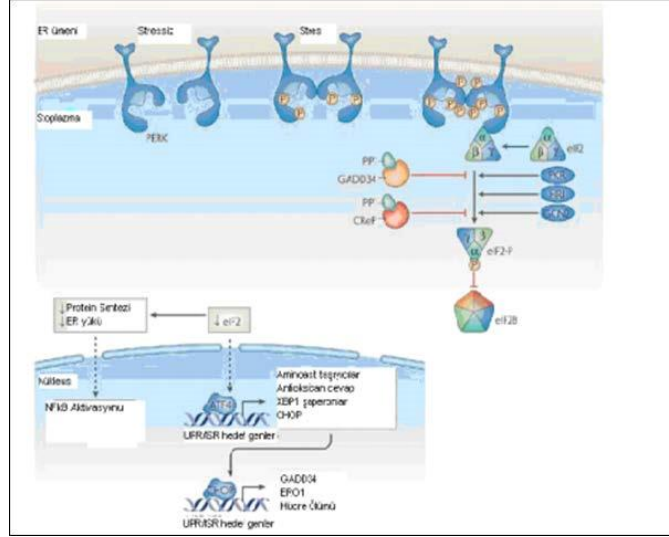
Şekil 2.1. UPR sinyal yolu

2.4.1. ER Stresine Bağlı PERK Yolağı

PERK, UPR aktivasyonunun başlatılmasında etkili olan, ER'de yer alan ER stresini algılayan NH₂-terminal ve sitozolik kinaz domaine sahip tip 1 transmembran proteinidir. PERK α ökaryotik başlama faktörü 2 (eIF2α)'yi fosforilleyerek translasyonu yavaşlatan önemli bir mediyatördür (Hussain ve Ramaiah, 2007). Hatalı proteinlerin birikimi PERK yolu aracılığıyla protein translasyonunun azalmasına

sebebiyet verir ve bu durum UPR genlerinin artışı ile ilişkilidir (Colgan ve ark, 2011). Aktivasyonu ve yapısından dolayı diğer bir ER stres sensörü olan IRE-I ile benzerlikleri vardır. Ancak endoribonükleaz aktivitesi azdır. ER stresi başladıktan sonra katlanmaya yardımcı olması için lümeneye GRP78 gönderilir ve ardından sitozolik domainin trans dimerizasyonu ve otofosforilasyonu gerçekleşir. Bunun sonucunda da PERK aktivasyonu başlar.

PERK, aktive olduktan sonra eIF2 α 'nın 51. pozisyonunda olan serinin fosforilasyonunu gerçekleştirir. Fosforillenen eIF2 α , hücre içinde genel translasyonu durdurur. Ancak aktive transkripsiyon faktör 4 (ATF4) gibi spesifikiteye sahip mRNA'ların translasyonu devam eder ve bu mRNA'ların miktarları artar. Böylelikle ER stresine karşı PERK aktivasyonu ile hücrenin protein yükü azaltılır ve katlanmamış proteinler düzeltilir (Szegezdie ve ark, 2006; Rasheva ve Domingos, 2009) Transkripsiyon faktörü bZIP ailesinin bir üyesi olan ATF4, 351 amino asitten meydana gelir (Xu ve ark, 2005). ATF4 nükleusa girdikten sonra CHOP, GADD34, ATF3 ve bazı aminoasitlerin taşınmasını sağlar. Bunun yanında önemli bir antioksidan olan glutasyon biyosentezini ve oksidatif strese karşı dirençte rol oynayan genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Rasheva ve Domingos, 2009). CHOP, ATF4 tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilir. Güçlü bir apoptozis sinyalidir ve hücre ölümünü teşvik etmektedir (Szegezdie ve ark, 2006; Hussain ve Ramaiah, 2007) (Şekil 2.2). PERK, önemli bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-eritroid bağlantılı faktör 2 (Nrf2)'yi de fosforillemektedir. Normal şartlarda sitoplazmada kompleks halde inaktif bir şekilde bulunan Nrf2, ER stresi sonucunda fosforillendikten sonra aktif hale geçerek nükleusa gider. Aktif Nrf2' nin görevi antioksidanları, enzimlerin detoksifikasyonunu, immun sinyalizasyonunu ve hücrelerin büyüüp gelişmesini kapsayan genleri indüklemektir (Hussain ve Ramaiah, 2007).



Şekil.2.2. PERK sinyal yolağı

2.4.2. ER Stresine Bağlı ATF6 Yolağı

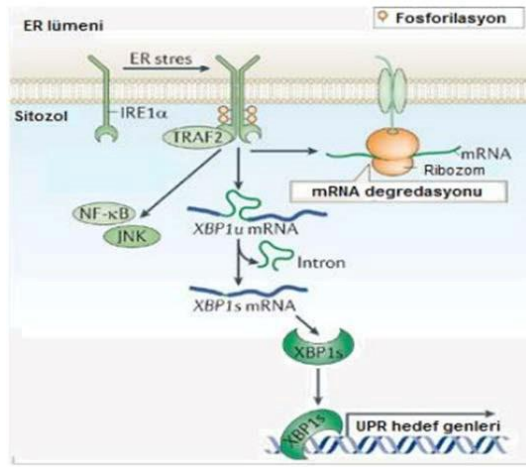
Transkripsiyon faktörü ATF6, ER lümenal domain içeren ve sitozolik domaine sahip olan tip II transmembran proteinidir. COOH terminali ER lümeninde, NH₂- terminal DNA bağımlı domaini sitozole dönüktür ve normal koşullarda ER membranında Grp78 ile birlikte inaktif bir şekilde bulunmaktadır. ER strese girdikten hemen sonra Grp78 katlanmaya yardımcı olmak için lümeneye ayrılır. GRP78'in ayrılmasından sonra, ATF6'nın golgi organeline taşınması indüklenir ve orada serin proteaz 1 ve metalloproteaz 2 tarafından kesilerek aktif forma dönüşümü gerçekleştirilmektedir. ATF6'nın aktivasyonu gerçekleştikten sonra nükleusa aktarılır ve böylece protein katlanmasıyla bağlantılı hedef genlerin aktivasyonu sağlanmaktadır (Şekil 2.1).

Bunun sonucunda bu proteinlerin sentezi artmaktadır ve ER katlanma fonksiyonu artarak strese karşı korunma sağlanmaya çalışılmaktadır Aktive edilen bu hedef genlerin içinde GRP78, GRP94, protein disülfid izomeraz, CHOP, XBP1, kalretikulin ve Herp bulunmaktadır (Szegezdie ve ark, 2006; Rasheva ve Domingos, 2009).

2.4.3. ER Stresine Bağlı IRE-1 Sinyal Yolağı

Bifonksiyonel enzim aktivitesi olan IRE1, serin/treonin protein kinaz ve sitozolik domaininde endoribonükleaz (RNAaz) aktivitesine sahiptir. Tip 1 transmembran proteinidir ve UPR'nin en iyi korunmakta olan sinyal ağıdır. Memelilerde 2 izoformu bulunmaktadır. Bunlar IRE-1 α ve IRE1 β dir. IRE-1 α'nın ekspresyonu her yerden olurken, IRE-1 β ekspresyonu sadece bağırsak epitel hücreleriyle ve akciğerde gerçekleşmektedir. IRE1, Grp78 ile birlikte iken inaktiftir. ER stresi oluşunca Grp78

ayrılarak endoribonükleaz ve kinaz aktivitelerinin otofosforilasyonu gerçekleşerek etkinleşmektedirler (Szegezdie ve ark, 2006) (şekil 2.3.).



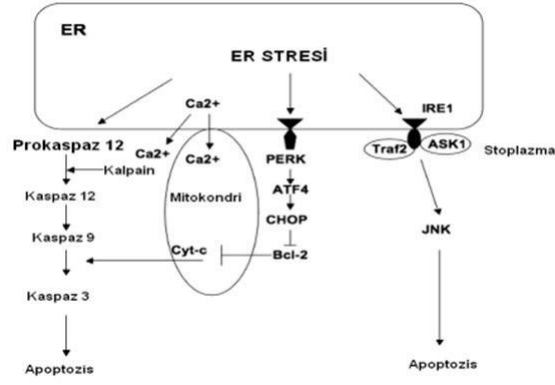
Şekil 2.3. ER stresine bağlı IRE1 yolu

2.5. Apoptoz

Apoptoz, ölmeye programlanmış hücrelerin kendi nükleer DNA'larını, nükleer ve sitoplazmik proteinlerini parçalayacak enzimleri aktive eden, çok sıkı bir şekilde regüle edilen intraselüler programla yürütülen bir hücre ölümü yoludur. Apoptoz, farklı morfolojik özellikleri sayesinde ilk olarak 1972 yılında tanımlanmış, Yunanca 'dökülme' anlamı taşıyan kelime ile isimlendirilmiştir (Kerr, 1972).

2.6. ER Stresiyle İndüklenen Apoptozis Yolakları

ER stresine indüklenen ATF6, PERK, ve IRE1 sinyal yolları hücrelerin sağlığını sağlayan yolları başlatmanın yanında, ER stresinin kronik olarak uzadığı durumda hücre fonksiyon bozukluğunun gerçekleşmesiyle apoptozis yollarında indüklenmesini sağlamaktadırlar (Qu ve ark, 2009) ATF6, PERK, ve IRE1 yoluyla oluşan sinyaller uzun süren ER stresi durumunda pro-apoptotik sinyalleri indüklemektedirler. Ancak doğrudan hücre ölümüne neden olmazlar. Downstream moleküller olan JNK veya CHOP'nin aktivasyonunu başlatarak hücrenin ölüm yoluna gitmesini sağlamaktadırlar (Szegezdie ve ark, 2006). (Şekil 2.3). ER stresine indüklenen apoptoz, transkripsiyon faktörlerinin (CHOP), kinazların (JNK), Bcl-2 ailesinin üyelerinin, ve kaspazların aracı olduğu hücre ölüm yollarından oluşmaktadır. ER stresine indüklenen apoptozisin CHOP, JNK ve Bcl-2 ailesi üyelerinin proapoptotik sinyal saldırdığı ve sonuç olarak kaspaz aktivasyonu oluşturduğu görülmektedir (Szegezdie ve ark, 2006; Colgan ve ark, 2011).



Şekil.2.4. ER stresiyle indüklenen apoptotik mekanizmalar

2.6.1. ER Stres markerı CHOP (C/EBP Homolog Protein) İndüksiyonu

CHOP, ER stresi tarafından indüklenen apoptozun önemli bir düzenleyicisidir (Szege-Sdie ve ark, 2006).

ER stres sırasında en yüksek oranda indüklenebilen genler arasında yer alır (Hussain ve Ramaiah, 2007). ATF6 ve PERK yollarının indüklediği CHOP, bazik-lösin fermuarlı (bZIP) transkripsiyon faktörü olup C/ERB homolog protein ailesinin bir üyesidir (Düzgün, 2010). Aynı zamanda GADD153 (Growth Arrest and DNA Damage İnducible Gene) ya da DDIT-3 (DNA- Damage İnducible Transcript-3) olarak da tanımlanır (Hussain ve Ramaiah, 2007; Oyadomari ve Mori, 2004). CHOP apoptozu arttıran birçok genin transkripsiyonunu aktive etmektedir. ER stres durumlarında çok daha hassas olmaktadır (Szegezdie ve ark, 2006) Proapoptotik olduğu gösterilen CHOP'un aşırı ekspresyonunun apoptozise yol açtığı rapor edilmiştir. CHOP, dinlenme durumunda çok düşük seviyelerde eksprese edilmektedir fakat ER stresi durumunda ekspresyonu artmaktadır (Qu ve ark, 2009). Genellikle çocukluk çağında ortaya çıkan malign tümörlerden neuroblastomada ve kolon kanserleri ile ilişkili kanser hücrelerinde ve bazı tümör dokularında eksprese edildiği ve kansere karşı ilaç gelişiminde ilgi odağı olarak hedef gösterilmesi çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Düzgün, 2010; Qu ve ark, 2009).

CHOP'un transkripsiyonu ER membranında yer alan PERK, ATF6 ve IRE1 tarafından aktive edilmektedir. Fakat PERK-EIF2a- ATF4 yolu CHOP için gereklidir. PERK sinyal yolunun aktivasyonu erken ER stres cevabında protein sentezinin inhibisyonu boyunca hücreler için koruma olarak görev yapmaktadır ve hücre yaşamını büyük ölçüde düzenlemektedir. Fakat ER stres cevabının ileriki aşamasında, PERK-EIF2a- ATF4 yolu ER stresi tarafından aktive olur. CHOP'un ekspresyonunu indükler ve

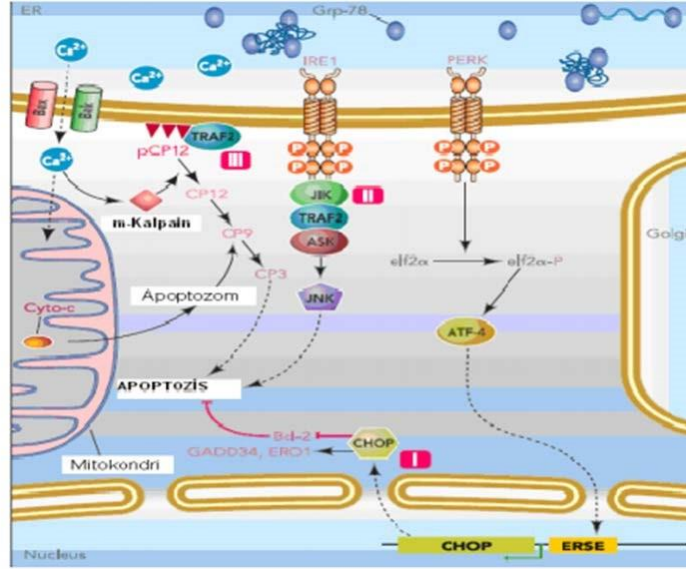
apoptozisi düzenler (Qu ve ark, 2009). CHOP'un maksimum olarak indüklenmesi için, bütün ER strese cevap yolları mutlaka gereklidir. Çünkü CHOP'un promotor bölgesi ATF4, ATF6, XPP-1 ve ATF2/ATF3 tarafından transaktive olan 4 cis- davranışlı elementler tarafından düzenlenmektedir. CHOP'un ekspresyonu GADD34, ERO1, DR5, karbonik anhidraz VI ve TRB3 gibi proapoptotik proteinlerin indüksiyonuna da sebebiyet verir. ERO1, ER luminal proteinken, diğerleri sitozoliktir (Hussain ve Ramaiah, 2007; Marciniak ve Ron, 2004; Ohoka ve ark, 2005).

2.6.2. Bcl-2 Protein Ailesi

Büyüme faktörleri ve diğer sağkalım sinyalleri Bcl-2 protein ailesinin antiapoptotik bireylerinin üretimini uyarırlar. B-hücreleri lenfomada bir onkogen olarak tanımlanmış ve C. elegans proteini Ced-9'a homolog olan bu aile daha sonra Bcl-2 ismini almıştır (Cory ve Adams, 2002). Bu ailede, hepsi apoptozu regüle etmek için fonksiyon gösteren 20'den fazla protein vardır; Bunlardan anti-apoptotik olanlardan önemli ikisinin adı Bcl-2 ve Bcl-X dir. Bu anti-apoptotik proteinler normalde mitokondrial membranlarda ve sitoplazmada yerleşmişlerdir. Hücreler yaşamsal sinyallerden mahrum kaldıklarında ya da strese maruz kaldıkları zaman mitokondrial membrandan Bcl-2 ve/veya Bcl-X kaybolur ve bunların yerini aynı ptotein ailesinden Bak, Bax, ve Bim gibi proapaototik bireyler yer alır (Reed, 1997). Mitokondriyal aracılı apoptoziste olduğu gibi ER stresıyla uyarılan apoptoziste Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. ER stresıyla indüklenen hücre ölümünde Bcl-2 proteinleri ile olan ilişkisi oldukça nettir, fakat ER stresi tarafından nasıl düzenlendiği daha az bilinmektedir (Szegezdie ve ark, 2006). BAX ve BAK, ER stresıyla indüklenen apoptozis için gereklidir ve mitokondriden proapoptotik faktörlerin salınımını düzenleyerek ER'den kalsiyum salınımını gerçekleştirmektedir (Rasheva ve Domingos, 2009; Zong ve ark, 2003).

Pro-apopototik proteinler olan BAX ve BAK, apoptozise iki yolla etki etmektedir. İlkinde ER stresi sırasında BAX ve BAK, ER membranında konformasyonel değişikliklere ve oligomerizasyona maruz kalmaktadır. Bu da ER'den stoplazmaya Ca^{+2} 'un salınmasına yol açmaktadır. Sitozolde Ca^{+2} konsantrasyonunun artması ise kalpaine aktive etmektedir ve kalpaine prokaspaz 12'yi keser ve bunun sonucunda aktif kaspaz 12 oluşmaktadır. Aktive olan kaspaz 12 'de prokaspaz 9'u keser ve aktive eder böylece kaspaz kaskadı aktive olmuş olur. İkinci yolda ise mitokondri tarafından sitozolik Ca^{+2} 'nin alınmasıdır Sitozolik Ca^{+2} 'nin artması mitokondriyal iç

membranının depolarizasyonunu ve sitokrom C salınımını gerçekleştirmektedir Bu da kaspaz 9'un aktive edilmesini sağlar Net olarak ortaya çıkan sonuç ise kaspaz kaskadının başlatılmasıdır (Lai ve ark, 2007).(Şekil 2.4)



Şekil 2.5. BCL2 Protein Ailesi Aracılı Apoptozis Yolu.

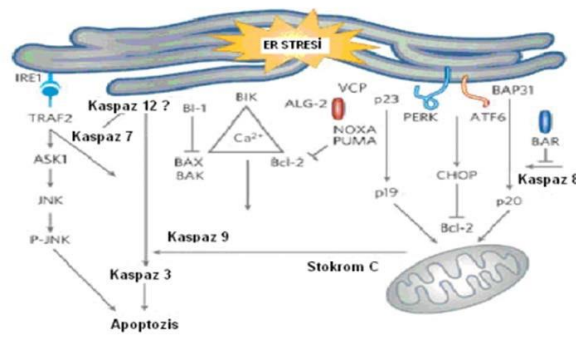
2.6.3. JNK Protein Aktivasyonu

ER stresinde başka bir apoptotik yol olan c-jun N- terminal kinaz (JNK), sinyal iletiminde görevli olan proteinlerin bir ailesidir. Gen ekspresyonunu düzenler ve ER stresine karşı sağ kalım ve hücre ölümü arasındaki önemli durumun belirlenmesini sağlamaktadır. (Lai ve ark, 2007). JNK, UPR'nin IRE1-TRAF2-ASK1 kompleksi tarafından aktive olmaktadır. IRE1, Xbp1'deki rolünden bağımsız olarak JNK sinyal yolunu aktive ederek apoptozisi tetiklemektedir. IRE-1-TRAF2 etkileşimi apoptozisi tetikleyen transkripsiyonel bir baskılayıcı olan ATF3'de aktive etmektedir. Ayrıca JNK'nın, fosforilasyonla BCL2 proteinleri düzenlemesinde bilinmektedir(Hussain ve Ramaiah, 2007; Rasheva ve Domingos, 2009).

2.6.4. Kaspaz Aktivasyonu

Apoptozun süreci, kaspazların katalitik olarak aktif hale geldiği başlangıç fazı ve bu enzimlerin hücre ölümünü sağladığı uygulama fazı olarak ikiye ayrılır. Apoptoz, sonradan birleşen iki farklı yolak ile başlar. Bu yolaklar reseptör başlangıçlı yolak ile mitokondrial yolaktır. Her iki yolak kaspazları aktive etmek üzere bir noktada birleşir. (Wallach, 1999). Proteazların çoğu gibi, kaspazlar inaktif pro-enzimler ya da zimojenler olarak bulunurlar ve apoptozun başlatılması için aktive edici kırılma

işlemine uğrarlar. Kaspazlar, sadece diğer kaspazlarca hidrolize edildiklerinde değil, aynı zamanda otokatalitik olarak da hidrolize edilebilen kendi kırılma bölgelerine sahiptirler. Bir başlatıcı kaspaz kendi aktif formunu oluşturmak üzere kırıldıktan sonra, diğer kaspazların hızlı ve sıralı aktivasyonu ile enzimatik ölüm programı harekete geçer (Salvesen ve Duckett, 2002). ER bağlantılı sistein proteaz ailesinin üyelerinden olan kaspazlar aktivasyonu apoptozis için gereklidir (Rasheva ve Domingos, 2009). 10 dan fazla üyesi olan kaspaz ailesinin üyelerinden Kaspaz 12, 3, 6, 7, 8 ve 9'un işlevleri ER stresiyle ilgili çalışmalarda rapor edilmiştir. Farklı yollardan ER stresi tarafından aktive olabilen kaspaz 12, ER stresiyle indüklenen apoptozisin için kilit noktada bulunmaktadır. Yollardan ilki kalpainler tarafından aktive olmaktadır. Kalpainler kalsiyum tarafından aktive olan stoplazmik proteazlardır. ER'da kaspaz 12'nin aktive olmasından sonra kaskad şeklinde reaksiyon zinciri başlar. İlk olarak kaspaz-12 prokaspaz 9'u keser ve kaspaz 9 meydana gelir. Kaspaz 9'da kaspaz 3'ün aktivasyonuna yol açar. Bunun sonucunda apoptozis gerçekleşir. Yollardan ikincisi ise IRE1 ve TRAF2 ile direk olarak otoaktivasyon gerçekleşmektedir. Üçüncü yol ise Kaspaz 7'nin bazı apoptotik uyarılara cevap olarak ER'da transloke olması ve doğrudan kaspaz 12 'yi aktive etmesidir (Qu ve ark, 2009). ER stresiyle diğer kaspazlarında bağlantılı olduğunu ve diğer kaspazların aktivasyonunuda indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca ER transmembran proteinleri, BAP 31 ve BAR prokaspaz 8 ile kompleks oluşturmaktadır. BCL-2 ve BCL-X'de ER stresinde prokaspaz 8 aktivasyonunu düzenlemektedir (Hussain ve Ramaiah, 2007). (Şekil 2.5).

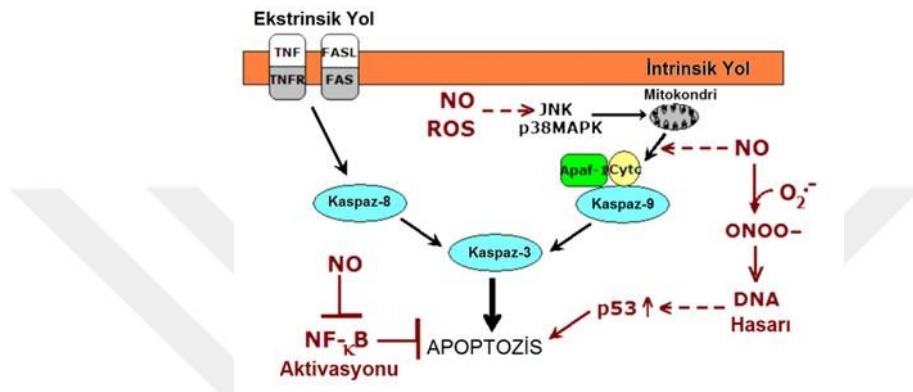


Şekil.2.6. Kaspaz Aktivasyon Yolakları

2.7. Nötral Sfingomiyelinaz /seramid Yolağı

Apoptozis iki farklı yol üzerinden indüklenebilir. Ekstrinsik yol, TNF-alfa ve Fas ligandının membran reseptörlerine bağlanması sonucunda kaspaz-8 aktivasyonuna neden olurken, intrinsik yolak, hücresel stress ile indüklenen mitokondrial sitokrom-c

salınımına neden olur. Salınan sitokrom c, apoptotik proteaz-aktif edici faktör-1 (Apaf-1) ve prokaspaz-9 ile kompleks teşkil ederek kaspaz 9'un aktivasyonuna neden olur. Hem intrinsik, hem de ekstrinsik yollar, kaspaz 3'ün aktivasyonu, nükleer parçalanma, hücrel ve morfolojik değişimler ile sonuçlanır. Nükleer faktör-kappaB, anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu arttırmak suretiyle apoptozise karşı koruyucu olarak görev alır (Aslan ve ark, 2008). Nitrik oksit ve reaktif nitrojen metabolitlerinin ekstrinsik ve intrinsik apoptotik yollara etkisi şekil 2.6'de özetlenmiştir.

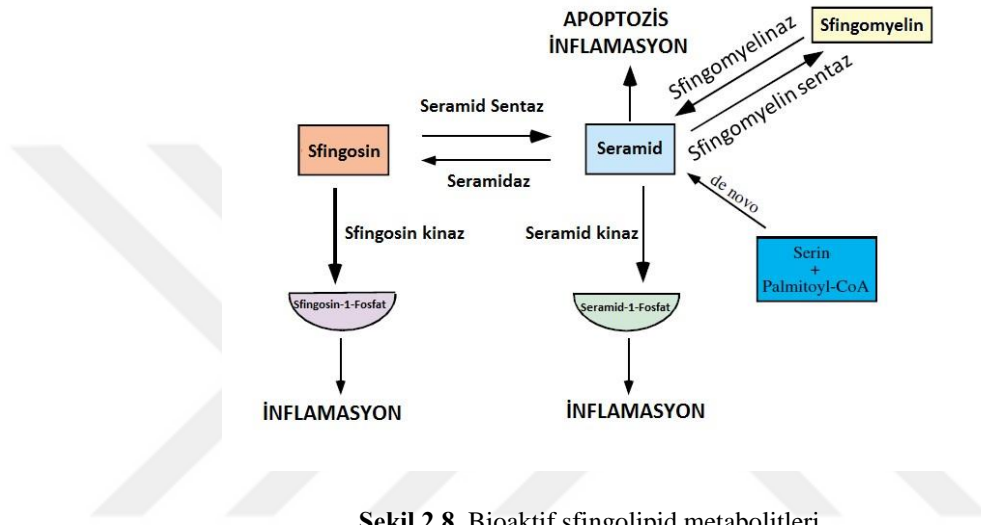


Şekil 2.7. Apoptotik yollar. (Kaynak: Aslan M, Cort A, Yucel I. Free Radic Biol Med. 2008 Aug 15;45(4):367-76).

Literatürde KC IR hasarında nötral sfingomyelinaz inhibisyonunun koruyucu rolünü araştıran hiçbir çalışma yoktur. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar apoptozisin nötral sfingomyelinaz/seramid yolağı üzerinden aktive olabileceğini göstermiştir ancak KC IR modellerinde bu yolak araştırılmamıştır. Bilindiği gibi sfingomyelinaz enzimi hücre membranlarındaki sfingomyelini fosfokolin ve seramide dönüştürür. Seramid, hücre içinde bioaktif lipidlere dönüşerek hücre proliferasyonunu, hücre ölümünü ve inflamasyonu regüle eder. Yani bu yolak hücrelerde oldukça aktif ve önemlidir.

Sfingolipidler hücre membranlarının yapısal öğelerindedir. Yakın zamanda sfingomyelinin çeşitli lipid mediatörlerinin oluşumuna sebebiyet verdiği gösterilmiştir. Özellikle sfingosin-1-fosfat (S1P) epidermal hücrelere etki ederek keratinosit proliferasyonuna ve farklılaşmasına neden olmaktadır (Herzinger ve ark, 2007). Fosforile sfingolipid metabolitleri olan seramid-1-fosfat ve sfingosin-1-fosfat çok etkili bioaktif mediatörlerdir ve yakın zamanda inflamatuvar cevapta etkin rol oynadıkları gösterilmiştir (Chalfant ve ark, 2005).

Seramid, sfingolipidlerin metabolizmasında merkezi konumda yer alır (şekil 2.7). Seramid, serin ve palmitoyl-CoA'nın birleşmesiyle oluşur. Seramid aynı zamanda sfingomyelinin sfingomyelinaz enzimi tarafından hidrolize olmasıyla da oluşur. Seramid oluştuktan sonra seramid kinaz enzimi tarafından seramid-1-fosfat'a dönüştürülür veya sfingomyelin/glikosifingolipid sentezi için kullanılır (şekil 2.7). Seramid, seramidaz enzimleri tarafından sfingosine parçalanabilir. Sfingosin ise sfingosin kinazlar tarafından sfingosin-1-fosfat'a dönüştürülebilir.



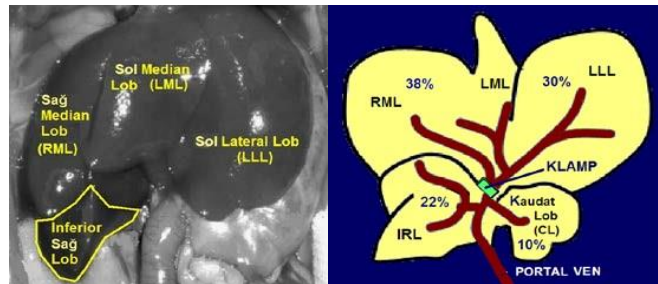
Şekil 2.8. Bioaktif sfingolipid metabolitleri

Hücrede oluşan seramid sfingomyelin sentaz enzimi için de bir substrattır. Seramid hücrede stres yanıtı oluşturmak suretiyle NF-kB'nin nükleer translokasyonunu ve NOS2 enzim düzeylerini artırarak nitrozoaktif stresi ve apoptozisi tetikler. Sfingomyelinaz enzim inhibisyonu NF-kB aktivasyonunda belirgin bir azalmaya neden olarak NOS enzim miktarını ve apoptozisi baskılar (Chalfant ve ark, 2005). Çalışmamız KC IR hasarında oluşan ER stresi ve apoptozis üzerinde selektif NSMase inhibisyonunun etkilerini inceleyen ilk araştırmadır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Albino Wistar Sıçanlarında Karaciğer İskemi Reperfüzyonu Oluşturulması

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Patoloji Anabilim Dalları ve Deneysel Hayvanlar Ünitesinin ortak çalışmasıyla gerçekleştirilen bu çalışmada Albino Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Denekler üzerinde yapılan tüm işlemler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanı Bakım ve Kullanım Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve onaylanmıştır. Uygulanan IR modeli “ılık lobar iskemi” modeli oldu. Bu modelde KC dokusunun %70’inde iskemi oluşturuldu ve diğer %30’unda ise kan akımına müdahale edilmedi. İskemi oluşturulmayan KC lobları kontrol grubunu teşkil etti. KC IR uygulanan sıçanlar ameliyat öncesinde 12 saat oral beslenme almadı ve sadece su içmeleri serbest oldu. Sıçanlara operasyon öncesinde intraperitoneal olarak anestezi uygulandı (25 mg/kg Ketamin ve 8 mg/kg ksiazin (xylazine) hidroklorür). Anestezi sonrasında sıçanların abdomenleri traş edildi ve betadin ile dezenfeksiyon sağlandı. Dezenfeksiyondan sonra orta hat insizyonu gerçekleştirildi ve vena porta açığa çıkarıldı. Orta ve sol lateral hepatik lobları besleyen portal venler 1 saat süreyle klempe edildi. 60 dakikanın sonunda mikrovasküler klempe açıldı ve 60 dakika süreyle reperfüzyon tekrar sağlandı. Uygulanan IR modelinde KC’in kaudal ve sağ lobu intakt kalmaktadır. Bu loblar kontrol KC grubunu teşkil etti (şekil 3.1). Bu lobların intakt kalması iskemi süresince gelişebilecek intestinal konjesyonu engelledi. Tüm operasyon süresince sıçanların abdomenleri ısıtma lambaları ile ısıtıldı ve vücut ısıları korundu. Elde ettiğimiz kan örnekleri iskemi öncesinde ve iskemi sonrasında önce kuyruk veninden sonra sağ ventrikülden olmak üzere sırasıyla alındı. İskemi reperfüzyonunun sonunda sol ventrikülden injekte edilen %0.9’luk NaCl ile KC perfüze edildi. Sol ve orta loblardan alınan dokular IR oluşturulan KC grubunu teşkil etti. Elde edilen KC dokuları biyokimyasal analiz için sıvı nitrojenle donduruldu ve -80’de saklandı. İmmünohistokimyasal analiz için alınan KC dokuları %4 paraformaldehid/tampon karışımı içerikli solüsyona alındı.



Şekil 3.1: Karaciğer iskemi reperfüzyon modeli (Liver International 2007:384-392 ref. modifiye edilmiştir)

Çalışmaya 36 adet Albino Wistar Sıçan alındı. Çalışma için gerekli olan sıçanlar Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından sağlandı. Çalışmaya alınan sıçanlar ilk olarak 4 gruba ayrıldı.

1. Sham grubu: 8 adet
2. Kontrol grubu: 10 adet
3. Nötral sfingomyelinaz inhibitörü uygulanan grup 10 adet
4. DMSO grubu: 8 adet

Sham grubu: Sıçanlardan 8 tanesi Sham grubunu oluşturdu. Sham grubundaki hayvanlara sadece laparotomi yapıldı.

Kontrol grubu (Kontrol ve IR): Sıçanlardan 10 tanesi ilaç verilmeyen KC IR ve kontrolü oluşturdu.

Nötral sfingomyelinaz inhibitörü uygulanan grup (GW ve GW+IR): Bu grubu oluşturacak 10 tane sıçana KC iskemisi oluşturulmadan 72 saat önce nötral sfingomyelinaz inhibitörü başlandı ve intraperitoneal olarak 3 gün süreyle verildi. 3 gün boyunca günlük 1.25 mg/kg GW4869 intraperitoneal olarak enjekte edildi. GW4869, %2.5 dimetilsulfoksit (DMSO) içeren salin içerisinde çözüldü.

DMSO grubu (DMSO ve DMSO +IR): DMSO grubunu teşkil eden 8 tane sıçana, %2,5'lük dimetil sulfoksit içeren salin nötral sfingomyelinaz inhibitörü uygulanan grup ile aynı miktarlarda 3 gün boyunca intraperitoneal olarak enjekte edildi.

3.2. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarının Patolojik Verilerle Belirlenmesi

Elde edilen KC dokularından parafin kesitler alınıp hematoksilin-eozin ile boyandı. Çalışmamıza katılan Üniversitemiz Patoloji Anabilim Dalından Yrd. Doç. Dr. Betül Ünal elde edilen dokuların patolojik değerlendirmesini yaptı. Hematoksilin-eozin boyalı 4 mikron kalınlığındaki parafin kesitler değerlendirildi. x200 büyütmede 20 alan bakıldı. Konjesyon, hücre şişmesi, ayrıca nekroz varlığı puanlandı.

Konjesyon ve hücre şişmesinin değerlendirilmesi:

None:0

Aciner Zone III: 1

Aciner Zone III-II: 2

Aciner Zone III-II-I: 3

Nekroz değerlendirilmesi:

None:0

Single cell/focal: 1

Submassive (bridging nekroz): 2 Masif

nekroz+infarkt: 3

Elde edilen toplam skor (max 9 puan üzerinden):

0: normal-değişiklik yok

1-3 zayıf

4-7 orta

7-9 şiddetli hasar olarak gruplandırılabilir.

3.3. Serum Alanin Aminotransferaz Aktivitesinin Ölçümü

Karaciğer IR hasarının bir göstergesi olarak tüm gruplarda plazma ALT düzeyleri kitle ölçüldü (Cayman Chemical, Cat No: 700260, Ann Arbor, MI, USA).

NADH oksidasyon hızı, laktat dehidrogenaz (LDH) ile bağlantılı bir reaksiyon ile ölçüldü. Bir ünite enzim aktivitesi 37°C'de, bir dakika süreyle 1 µmol NADH'yı NAD⁺'ye okside eden enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.4. Sfingomyelinaz Aktivitesinin Ölçümü

Sakrifiye edilen ratlardan alınan KC dokuları sıvı nitrojen içerisinde hemen donduruldu. Bu dokular daha sonra 4°C'deki homojenizasyon tamponu içerisinde (50 mM K₂HPO₄, 80 µM leupeptin, 2.1 mM pefablok SC, 1 mM fenilmetilsulfanilflorid, 1 µg/ml aprotinin, pH 7.4) homojenize edildi. Nötral sfingomyelinaz (N-SMase) aktivitesi ardışık enzimatik reaksiyon yöntemiyle spektrofotometrik kit ile ölçüldü (Biovision, Catalog # K599-100, Milpitas, CA, USA). Sfingomyelinaz, ortama eklenen sfingomyelini seramid ve fosforilkoline parçalar. Ortama ilave edilen alkalin fosfataz enzimi ise fosforilkolini koline dönüştürür. Bunu takiben ilave edilen kolin oksidaz enzimi ortamda betain ve hidrojen peroksit oluşumunu sağlar. Hidrojen peroksit ortamda bulunan horseradish peroksidaz (HRP) enzimiyle parçalanır ve renk oluşumuna neden olur. Bir ünite sfingomyelinaz aktivitesi 37°C'de, bir dakika süreyle 1 µmol kolini oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı. Örneklerdeki sfingomyelinaz aktivitesi nmol/dk/mL olarak verildi ve standart eğri yardımıyla belirlendi.

3.5. Sfingomyelin ve Seramid Ölçümü

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Kütle Spektrometri Laboratuvarında, ultra-hızlı sıvı kromatografi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japonya) sistemine bağımlı LC/MSMS (LCMS-8040 Shimadzu Corporation, Japonya) cihazı vardır. Bu sistemde grubumuz tarafından seramid ve sfingomyelin ölçümleri yapılmıştır.

Electrospray ionizasyon kütle spektrometri:

Seramid stok solüsyonu ve deuterium işaretli internal standardı metanol içinde hazırlanacaktır. Ölçülecek ceramidler için optimize multiple reaction monitoring (MRM) metodu geliştirilmiştir (Bui ve ark, 2012). Bu metod ultra-hızlı sıvı kromatografi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japonya) sistemine bağımlı LC/MSMS (LCMS-8040 Shimadzu Corporation, Japonya) cihazında uygulanmaktadır. Kromatografik ayrımlar 60°C'de XTerra MS C18 Column (2.5 µm, 2.1 mm X 50 mm) ile yapılmaktadır. Akış hızı 0.450 ml/dk. İnjektion hacmi 10 µl'dir. Mobil faz A, Su/Asetonitril/ İsoopropanol (80:10:10 v/v içinde 10 mM amonyum format); Mobil faz B Asetonitril/isopropanol (90:10 v/v içinde 10 mM amonyum format). Gradient: 0 dk %65 Mobil Faz B; 0-2 dk %65 Mobil Faz B; 2-7 dk %90 Mobil Faz B; 7-13 dk %90 Mobil Faz B; 13-15 dk %100 Mobil Faz B; 15-16 dk %65 Mobil Faz B; 16-18 dk %65 Mobil Faz B. Sfingomyelin ve seramidler için kalibrasyon aralığı 0-1000 ng/ml linear kalibrasyon aralığında optimize edilecek ve örnek ölçüm süresi 18 dk olacaktır. Pozitif elektro-sprey-iyonizasyon (ESI) modunda ölçüm yapılacaktır.

Tablo 3.1. Analiz edilen sfingolipidler için ana ve ürün iyonlar.

	<u>Ana iyon m/z</u>	<u>Ürün İyon m/z</u>
16:0 SM (d18:1/16:0)	703.30	184.20
18:0 SM (d18:1/18:0)	731.40	184.20
24:0 SM (d18:1/24:0)	815.50	184.20
C16 Seramid (d18:1/16:0)	538.50	264.40
C16 Seramid (d18:1/16:0)*IS	554.30	264.30
C18 Seramid (d18:1/18:0)	566.30	264.40
C20 Seramid (d18:1/20:0)	594.60	264.50
C22 Seramid (d18:1/22:0)	622.60	264.40
C24 Seramid (d18:1/24:0)	650.40	264.30

16:0 SM (d18:1/16:0), N-palmitoyl-D-erythro sphingosylphosphorylcholine
18:0 SM (d18:1/18:0), N-stearoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine
24:0 SM (d18:1/24:0), N-lignoceroyl-D-erythro sphingosylphosphorylcholine
C16 Ceramide (d18:1/16:0), N-palmitoyl-D-erythro-sphingosine
C18 Ceramide (d18:1/18:0), N-stearoyl-D-erythro-sphingosine
C20 Ceramide (d18:1/20:0), N-arachidoyl-D-erythro-sphingosine
C22 Ceramide (d18:1/22:0), N-behenoyl-D-erythro-sphingosine
C24 Ceramide (d18:1/24:0); N-lignoceroyl-D-erythro-sphingosine

LC-MS/MS için örnek hazırlanması:

1. 500 µl örneğe, 1 ug/ml internal standart
2. Üzerine 375 µl kloroform/metanol (1:2 v/v) ilave edilir.
3. Örnekler 30 sn sonike edilir.
4. 100 distile su ilave edilir.
5. Örnekler 5 dk vortekslenir.
6. Oda ısısında 30 dk bekletilir.
7. 2000g'de 5 dk santrifüj edilir.
8. Süpernatant alınır.
9. 125 kloroform ve 125 µl distile su ilave edilir.
10. Vortekslenir ve 30 dk oda ısısında bekletilir.
11. Yaklaşık 500 µl üst-organik tabaka temiz tübe aktarılır ve azot altında uçurulur.
12. Örnek 100 µl metanolde:formik asit (99.9:0.1) çözünür ve viallere konur.

3.6. İmmünohistokimyasal Boyama

Alınan KC dokuları %10 formalin tampon solüsyonunda fikse edildikten sonra transvers düzlemde kesildi. Dokular fosfat tamponunda yıkandıktan sonra parafinde bloklanarak 4-µm kesitler alındı. Peroksidaz boyaması için kesitler deparafinize edildi, rehidrasyondan sonra Tris tamponunda yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için kesitler %3 hidrojen peroksit ile 5 dk muamele edildi. Primer antikor uygulaması 60 dk 25⁰C'de tavşan poliklonal antikor GRP78 (1:100, #ab53068 Abcam, Cambridge, MA, USA) ile gerçekleştirildi. Doku kesitlerinde sekonder antikor olarak biyotinle işaretli antikor kullanıldı ve reaksiyon streptoavidin-peroksidaz konjugatı ile gerçekleştirildi. 30 dakika sekonder antikor inkübasyonundan sonra 0.1 mM, pH 7.6 tris fosfat tamponu içerisinde 3,3diaminobenzidin tetrahidroklorid ve 50 ul % 30 hidrojen peroksit solüsyonu ilave edilerek renk oluşumu ışık mikroskopisi ile gözlemlendi. Dokuda görülen boyanma morfometrik analiz ile quantifiye edildi. İmmüno-boyanma skoru pozitif boyanan hücrelerin yüzdesine ve boyanma şiddetine göre

belirlendi. Pozitif boyanan hücrelerin yüzde skoru 0= %5'den az hücre/40x büyütme alanı; 1= %5-30 arası hücre/ 40x büyütme alanı; 2= %30-50 hücre/40x büyütme alanı 3= %50'den fazla hücre/ 40x büyütme alanı. Boyanma şiddetinin skoru 0=hiç boyanma yok; 1=hafif boyanma var (soluk kırmızı kahve); 2= orta derecede boyanma var (kırmızıkahverengi); 3= kuvvetli boyanma var (koyu kırmızı-kahverengi). Bakılan her kesit için toplam immünoboyanma skoru her iki skorun toplamından elde edildi. Elde edilen skorların istatistiksel analizi Sigma Stat (version 2.03) software programı ile yapıldı.

3.7. Elektron Mikroskopisi

Bir mm³ trimlenmiş doku örnekleri 0.1 M fosfat tamponunda (pH:7,3) hazırlanmış % 2,5 'luk gluteraldehit içinde +4 derecede 2 saat fiske edildi. Üç kez 10' ar dakika 0.1 M fosfat tamponunda (pH:7,3) yıkanarak fazla fiksatif dokudan uzaklaştırıldı. Daha sonra örnekler 0.1 M fosfat tamponunda (pH:7,3) hazırlanmış %1 osmium tetroxide içinde 2 saat ikincil fiksasyona tabii tutuldu. Üç kez 10' ar dakika 0.1 M fosfat tamponunda (pH:7,3) yıkama yapıldıktan sonra örnekler %30, %50,%70 etil alkol solüsyonlarında +4 derecede dehidrate edildi. Örnekler % 75 etanol içinde hazırlanmış uranil asetat çözeltisinde +4 derecede bloke edildi ve sonrasında. %80, %90, %96, %100 etil alkol solüsyonlarında, + 4 derecede, sekonder dehidratasyon yapılarak dokudan su tamamen uzaklaştırıldı. Örnekler 2 kez 10' ar dakika propilenoksit solüsyonunda +4 derecede, ardından 1 gece 1:1 oranında hazırlanmış araldit/ propilenoksit karışımında inkübe edildi. Polimerizasyonu takiben plastikleşen doku bloklarından ultramikrotomda 1 mikron kalınlıkta yarı ince kesitler lam üzerine alınarak Toluidin mavisiyle boyandı. Işık mikroskopunda hedef alan belirlenerek ultra ince kesit alındı. 30-70 nanometre kalınlıkta ultra ince kesitler formvar ile kaplanmış nikel gridlere alınarak, immünogold boyama yapıldı. Primer antikor olarak poliklonal tavşan anti-GRP 78 antikor 1:100 dilüsyonda (Cayman, Ann Arbor, MI) ve anti-CHOP (1:200, Santa Cruz, CA) sekonder antikor olarak da 25 nm gold partiküller ile konjuge goat-anti rabbit IgG 1:100 dilüsyonda (Aurion, EMS, Netherlands) kullanıldı. Kontraslama kurşun sitrat/uranil asetat ile yapılarak elektron mikroskopik (LEO 906E, Oberkochen, Almanya) inceleme gerçekleştirildi.

3.8. Western blot analizi

Çıkarılan KC dokuları sıvı nitrojen içerisinde hemen donduruldu. Bu dokular daha sonra 4°C'de homojenizasyon tamponu içerisinde (50 mM K₂HPO₄, 80 µM leupeptin,

2.1 mM Pefabloc SC, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg ml⁻¹ aprotinin, pH 7.4) homojenize edildi. Homojenatlar 23,000 x g'de 40 dk, 4°C'da santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlarda protein konsantrasyonu 595 nm'de Coomassie reaktifi kullanılarak belirlendi. Bu ölçümde bovin serum albumini de standard olarak kullanıldı. Elde edilen protein homojenatı Laemli tamponu ile 1:2 oranında karıştırıldı, %9'luk poliakrelamid jele tatbik edilerek elektroforetik ayırım sağlandı. Jelde ayrılan proteinler, selüloz asetata transfer edilerek western blot analizi gerçekleştirildi. Primer antikor olarak tavşanlarda geliştirilmiş GRP78 (1:300, #ab53068 Abcam, Cambridge, MA, USA), CHOP (1:200, # sc-575, Santa Cruz Biotechnology Inc. USA) fosfo-NF-κB p65 (Ser536) (0.5 mg/ml, Abcam, Cambridge, MA) ve aktin (1:1000, cytoskeleton Inc. Denver, CO) antikorları, sekonder antikor olarak da HRP-bağlı anti-tavşan antikorları kullanıldı (1:10,000; Zymed Laboratories, San Francisco, CA). Elde edilen membran, radyografik olarak görüntülendi. Görüntülenen protein bantları tatbik edilen standart doğrultusunda moleküler ağırlıkları itibariyle değerlendirildi. İmmünoreaktif proteinler kemilüminesans ECL reaktifi ile görüntülendi (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Tüm western blotlar NIH ImageJ 1.44p software programı kullanılarak dansitometrik olarak analiz edildi.

3.9. RNA Ekstraksiyonu

Karaciğer dokusundan total RNA AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kiti (Axygen Biosciences, Union City, CA) kullanılarak elde edildi. Pürifiye edilen RNA konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 260 nm'de belirlendi. RNA 70 µl TE tamponunda [10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA (pH 7.5)] çözüldü. 10 µl RNA 490 µl distile su ile 1:50 oranında dilüe edildi. Dilüe RNA örneği 260 ve 280 nm'de ölçüldü. 260 nm'de 1 ünite aborbans 40 µg/ml RNA'ya eşdeğer kabul edildi. Gerçek zamanlı PCR (Q-RT-PCR) analizinden önce RNA örnekleri RNase içermeyen su ile final konsantrasyonu 120 ng/µl olacak şekilde ayarlandı.

3.10. Primer-Probe Düzenlenmesi ve Optimizasyonu

Tüm mRNA sekansları için GenBankası kullanıldı. Primer ve probe düzenlenmesi Oligoware 1.0 software ile yapıldı (Yapar ve ark, 2005) ve Alpha DNA (Montreal, Quebec, Kanada) tarafından sentez edildi. Çalışmada kullanılan primer ve probelar tablo 3.2.'de verilmiştir. Q-RT-PCR one-run RT PCR kiti (SNP Biyoteknoloji, Ankara, Türkiye) kullanılarak yapıldı. Primer konsantrasyonlarının optimizasyonu ileri ve geri primerlerin farklı konsantrasyonları denenerek yapıldı. Maksimum DRn (bazal ve

maksimum floresan arasındaki fark) veren minimum primer miktarları kullanıldı. Optimum probe konsantrasyonu optimum primer konsantrasyonları kullanılarak farklı probe miktarlarıyla yapılan deneyler sonucunda belirlendi. En düşük Ct (threshold cycle; amplifiye edilen hedefin sabit bir eşik değere geldiği fraksiyonel siklus sayısı) değerini veren probe konsantrasyonu kullanıldı. Optimize edilen tampon içeriği: 18.3 µl one run mix, 1.1 µl primer mix (10 pmol), 1.1 µl probe (5 pmol), ve 0.3 µl RT/hotstart Taq mix. Total RNA 5 µl olarak ilave edildi ve doku mRNA'sı ölçüldü. Q-RT-PCR deneyleri Mx3000p Multiplex Quantitative PCR sisteminde yapıldı (Stratagene, La Jolla, CA). Siklus durumu: Basamak (1), 30 dk 50 °C; Basamak (2), 10 dk 95°C; ve 40 siklus Basamak (3), 15 saniye 95 °C ve 1 dk 60 °C. Kontrol olarak yapılan deneylerde şablon yokluğunda amplifikasyonun olmadığı görüldü.

Tablo 3.2. Q-RT-PCR deneyleri için kullanılan primer ve probelar

Gen			Genbank No.
18S ribozomal RNA	İleri Primer	5'-CGGACAGGATTGACAGATTGATAG-3'	NR_046237.1
	Ters Primer	5'-GTCTCGTTCGTTATCGGAATTAAC-3'	
	Probe	5'-CTCGATTCCGTGGGTGGTGGTGC-3'	
GRP78	İleri Primer	5'-ACCGTCGTATGTGGCCTTCACT-3'	NM_013083.2
	Ters Primer	5'-CATTCCAAGTGCCTCCGATGAGG-3'	
	Probe	5'-AGCGTCTGATTGGCGATGCGGCC-3'	
CHOP	İleri Primer	5'-CATCCCTAGCTTGGCTGACTGAG-3'	NM_001109986.1
	Ters Primer	5'-AATCTGGAGAGCGAGGGCTTTG-3'	
	Probe	5'-CCAGCAGAGGTCACAAGCACCTC-3'	

3.11. Kuantitatif PCR Analizi

Mx3000P analiz sistemi için geliştirilen MxPro QPCR Software kullanılarak amplifikasyonun log-linear fazı izlendi ve her RNA örneği için Ct değerleri elde edildi. Tüm deneyler 3 tekrarlı yapıldı ve her gen için mRNA düzeyleri 18S ribozomal RNA (rRNA) ile orantılanarak kat değişim olarak verildi. $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Monsinjon ve ark, 2001). Analiz edilen genlerin mRNA düzeyleri kontrol grubuna göre aşağıda verilen denkleme göre hesap edildi.

$$\text{Kat değişim} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

$$\Delta Ct = (\text{Ct hedef} - \text{Ct 18S rRNA})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ deney grubu} - \Delta Ct \text{ kontrol}$$

3.12. Nüklear Faktör Kappa-B İmmünoassay

Doku örneklerinde NF-kB düzeylerini ölçmek için ELİSA kiti kullanıldı (Invitrogen cat#KHO0371, Frederick, MD). Dokular hücre ekstraksiyon tamponu içerisinde homojenize edildi ve buz üzerinde 30 dk. bekletildi. 10,000 g'de 30 dk. santrifüjasyondan sonra süpernatantlar temiz tüplere aktarılarak NF-kB miktarı belirlendi. Miktarı bilinen NF-kB standartlarınının 450 nm'deki aborbans değerleri kullanılarak elde edilen eğriden örnekteki NF-kB protein miktarı hesap edildi.

3.13. TUNEL Analizi

Karaciğer dokularında apoptotik hücreler parafin kesitlerde terminal deoksinükleotid transferaz (TdT) FragEL DNA fragmentasyon kiti (Oncogene, Boston, MA) ile belirlendi. Apotosis'in en tanımlayıcı özelliği DNA fragmentasyonunun olmasıdır. Bu

yöntemde, ortama ilave edilen terminal deoxynucleotidyl transferaz (TdT), fregmante DNA'nın 3'-OH uçlarına biotin işaretli deoxynükleotid ilave eder. Daha sonra ortama streptavidin-horseradish peroksidaz (HRP) konjugatı ilave edilerek biotinlenmiş nükleotidler bağlanır. Ortama ilave edilen diaminobenzidin ile renk oluşumunun belirlenmesi apoptotik hücrelerin saptanmasını sağlar.

3.14. Doku Örneklerinde Mitokondrial ve Sitozolik Fraksiyonların Ayrımı

Bir gram KC doku örneği 5 ml tampon [1 mM EGTA, 250 mM sukroz, %1 proteaz inhibitör karışımı Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 20 mM HEPES (pH 7.2)] içerisinde homojenize edildi. Homojenat 1500 g'de 4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınarak 10,000 g'de 4°C'de 15 dk santrifüj edildi. Elde edilen mitokondrial çöküntü aynı tampon içerisinde homojenize edilerek saklandı. 10,000 g'de elde edilen süpernatant tekrar 40,000 g'de 30 dk santrifüj edilerek sitozolik fraksiyon elde edildi. Mitokondrial ve sitozolik fraksiyonların miktarı 20 µg protein olacak şekilde sitokrom c western blot analizi için kullanıldı. Sitokrom c western blot analizi için primer antikor olarak fare monoklonal anti-sitokrom c antikoru (1:200, ab13575, Abcam, Cambridge, MA) kullanıldı. İmmünooblottarda sitokrom c 15kDa'luk bantlar olarak gözlemlendi.

3.15. Cytochrome c Protein Miktarının Tayini

Homojenize doku örneklerinde sitokrom c miktarını belirlemek için ELİSA kiti kullanıldı (#ab110172, Abcam, Cambridge, MA). Doku örnekleri 5 ml soğuk fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) içerisinde homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler 10,000 g'de 20 dk. 4 °C'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantda sitokrom c miktarı ölçüldü. Süpernatantların protein konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde ayarlandı ve kit prospektüsüne göre çalışıldı. Kontrol örnekleri referans olarak alındı. Örneklerdeki sitokrom c kuyucuklar içinde antikor yardımıyla tutuldu ve HRP konjuge sitokrom-c antikoru kullanılarak ölçüm yapıldı. 600 nm'de oluşan mavi renk kinetik olarak okundu ve abzorbans değişimi (Δ OD/dk) kon göre % olarak verildi.

3.16. Kaspaz Aktivitesinin Ölçümü

Karaciğer dokusunda kaspaz-3 (Catalog No. APT165, Chemicon International),

kaspaz-8 (Catalog No. APT129, Chemicon International) ve kaspaz-9 (Catalog No.

APT173, Chemicon International) ölçümleri kit ile yapıldı.

Kit ile gelen hücre lizat tamponu (5ml 5X) 1X olacak şekilde dilüe edildi. Dokulara 200 µl hücre lizat tamponu ilave edildi. 5 dk 10,000 x g'de santrifüj edildi. Elde edilen

süpernatantlarda kaspaz enzim aktiviteleri belirlendi. Kaspaz enzimleri DEVD amino asit dizilimini tanırlar [D, Aspartik asit-Aspartat; E, Glutamik asit- Glutamat; V, Valin; D, Aspartik asit-Aspartat]. DEVD- p-nitroanilin (pNA) substratını parçalayarak pNA'nın açığa çıkmasını sağlarlar. Serbest pNA 405 nm'de abzorbanans verir. Elde edilen sonuçlar kontrolün katı şeklinde rapor edilir.

3.17. Protein Ölçümleri

Tüm örneklerde protein konsantrasyonu 595 nm'de Coomassie reaktifi kullanılarak belirlendi (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Bu ölçümde bovine serum albumini de standard olarak kullanıldı.

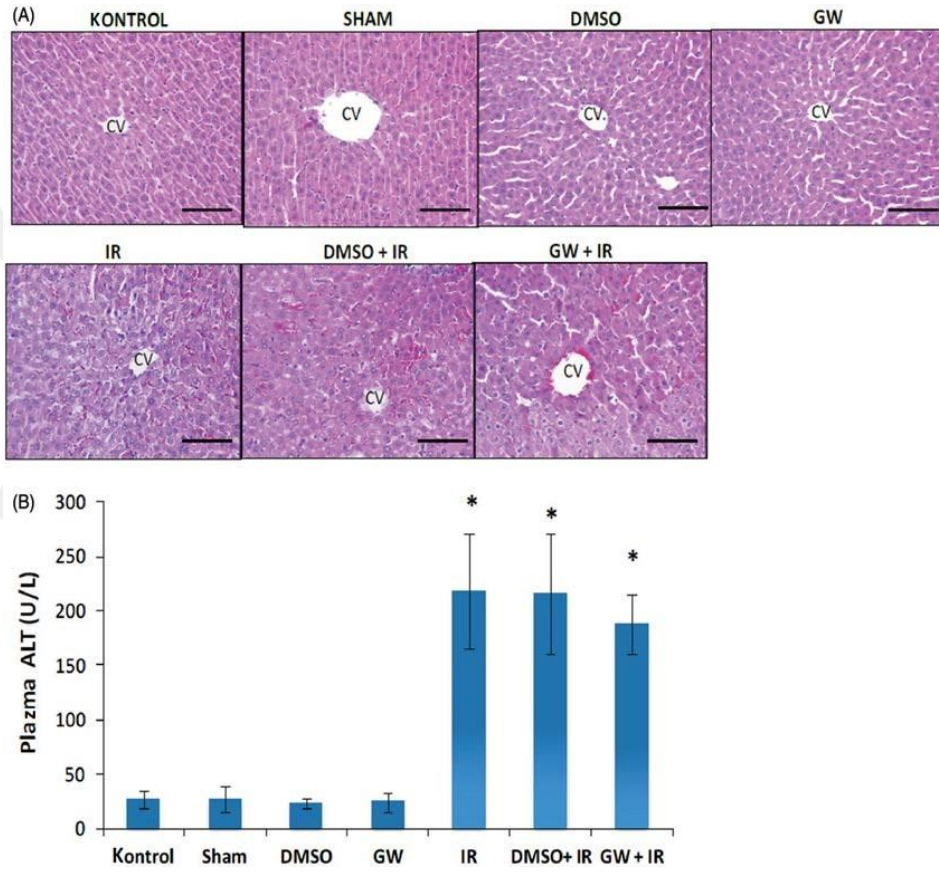
3.18. İstatistiksel Analiz

Tüm verilerin istatistiksel analizi SigmaStat statistical software version 2.0 ile yapılmıştır. Her ölçüm için uygulanan ayrıntılı istatistiksel yöntem şekil ve tablo alt yazılarında verilmiştir.

4.BULGULAR

4.1. Karaciğer Hasarı

Her deney grubundan temsili bir mikroskopik görüntü şekil 4.1A'da gösterilmiştir. Karaciğer hasarının histopatolojik skorlaması tablo 4.1'de verilmiştir. Konjesyon, intraselüler ödem ve total histopatolojik skor IR, GW+IR ve DMSO IR gruplarında kontrol, GW, sham ve DMSO gruplarına göre anlamlı olarak artış gösterdi. Plazma ALT seviyeleri de tüm IR gruplarında anlamlı olarak artmıştı (şekil 4.1B).



Şekil 4.1. Karaciğer kesitlerinin hematoxilen eozin boyanması ve plazma ALT aktivitesi. A) Her deney grubundan temsili bir mikroskopik görüntü. Büyütme: 20×. CV, santral ven; IR, iskemireperfüzyon; GW, GW 4869 tedavisi verilen grup; DMSO, dimetil sulfoksit verilen grup. Bar, 200 µm. B) Tüm değerler ortalama ± SEM. n= 8-10. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dunn's testi ile belirlendi. *, p<0,05 kontrol, sham, GW ve DMSO grupları ile kıyaslandığında.

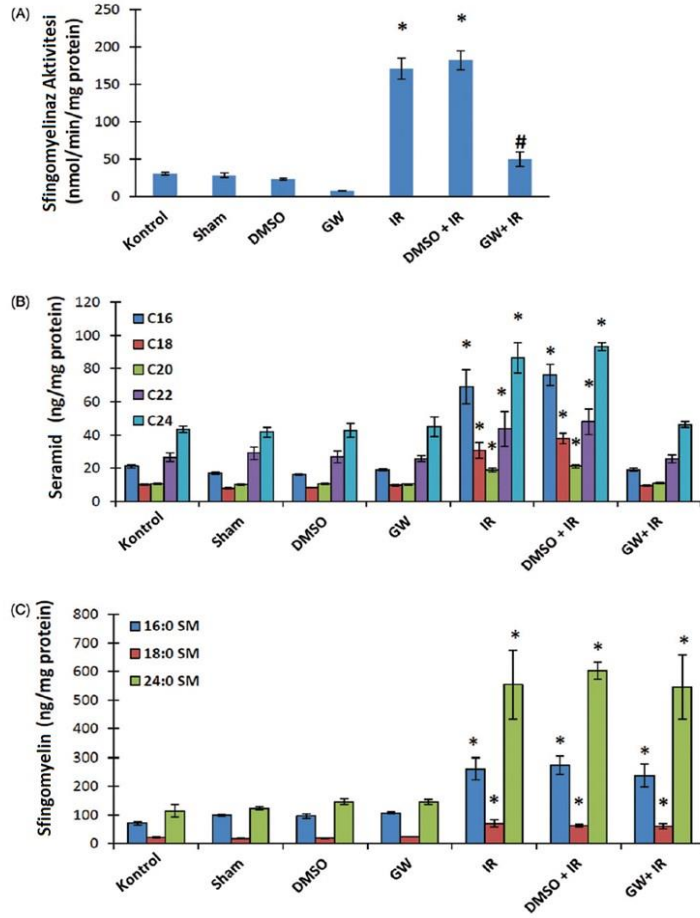
Tablo 4.1. Karaciğer kesitlerinin histopatolojik skorlaması.

Grup	Konjesyon	İntraselüler ödem	Nekroz	Total skor
Control (n = 4)	0.75 ± 0.50	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58	1.75 ± 0.50
Sham (n = 4)	0.50 ± 0.58	0.50 ± 0.58	0.25 ± 0.50	1.25 ± 1.50
IR (n = 4)	2.25 ± 0.50*	2.25 ± 0.50*	2.00 ± 0.00	6.50 ± 1.00*
GW (n = 4)	0.75 ± 0.50	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	1.25 ± 1.26
GW + IR (n = 4)	1.75 ± 0.50*	2.75 ± 0.50*	2.25 ± 0.96	6.75 ± 1.50*
DMSO (n = 4)	0.50 ± 0.58	0.25 ± 0.50	0.25 ± 0.50	1.00 ± 0.82
DMSO + IR (n = 4)	2.50 ± 0.58*	2.50 ± 0.58*	2.25 ± 0.50	7.25 ± 1.26*

Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. IR, iskemi-reperfüzyon; GW, GW 4869 tedavisi alan grup; DMSO, dimetil sulfoksit verilen grup. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dunn's testi ile belirlendi.. *, p<0.05 kontrol, sham, GW ve DMSO grupları ile kıyaslandığında.

4.2. Karaciğer N-SMase Aktivitesi, Sfingomyelin ve Seramid Düzeyleri

Karaciğer N-SMase aktivitesi IR ve DMSO+IR gruplarında kontrol, GW, sham ve DMSO gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti (şekil 4.2A). Spesifik NSMase inhibitörü ile tedavi GW+IR grubunda N-SMase aktivitesini düşürdü. GW+IR, kontrol, sham ve DMSO grupları arasında N-SMase enzim aktivitesi anlamlı bir değişim göstermedi. GW ve GW+IR grupları arasında N-SMase aktivitesi anlamlı ölçüde farklılık gösterdi. Karaciğer dokusunda sfingomyelin ve seramid düzeyleri şekil 4.2B ve şekil 4.2C'de verilmiştir. Selektif N-SMase inhibitörü GW4869 1.25 mg/kg dozunda karaciğer dokusunda sfingomyelin ve seramid düzeylerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. Seramid düzeyleri IR ve DMSO+IR gruplarında kontrol, GW, sham, DMSO ve GW+IR gruplarına göre anlamlı olarak artış gösterdi. N-SMase ile tedavi tüm IR gruplarında seramid düzeylerini anlamlı olarak azalttı. Sfingomyelin düzeyleri tüm IR gruplarında kontrol, sham, DMSO ve GW gruplarına göre anlamlı olarak artış gösterdi.

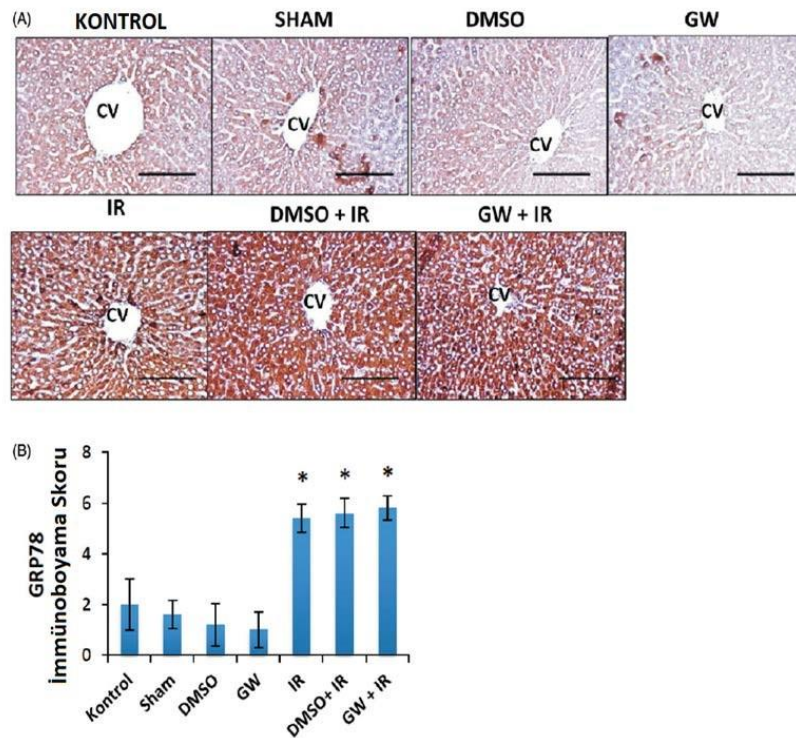


Şekil 4.2. Sfingomyelinaz aktivitesi ve sfingolipid ölçümü. IR, iskemi–reperfüzyon; GW, GW 4869 tedavisi verilen grup; DMSO, dimetil sulfoksit verilen grup. A) Sfingomyelinaz aktivitesi. Tüm değerler ortalama \pm SD olarak verilmiştir. $n=8-10$. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dunn's testi ile belirlendi. *, $p<0,05$ Kontrol, Sham, GW ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında. **, $p<0,05$ GW grubu ile karşılaştırıldığında. B) Karaciğer seramid düzeyleri. Tüm değerler ortalama \pm SEM olarak verildi. $n=8-10$. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dunn's testi ile belirlendi. *, $p<0,05$ kontrol, sham, DMSO, GW ve GW+IR grupları ile karşılaştırıldığında. C) Karaciğer sfingomyelin seviyeleri. SM; sfingomyelin. Tüm değerler ortalama \pm SEM olarak verildi. $n=8-10$. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dunn's testi ile belirlendi. *, $p<0,05$ kontrol, sham, DMSO ve GW grupları ile karşılaştırıldığında.

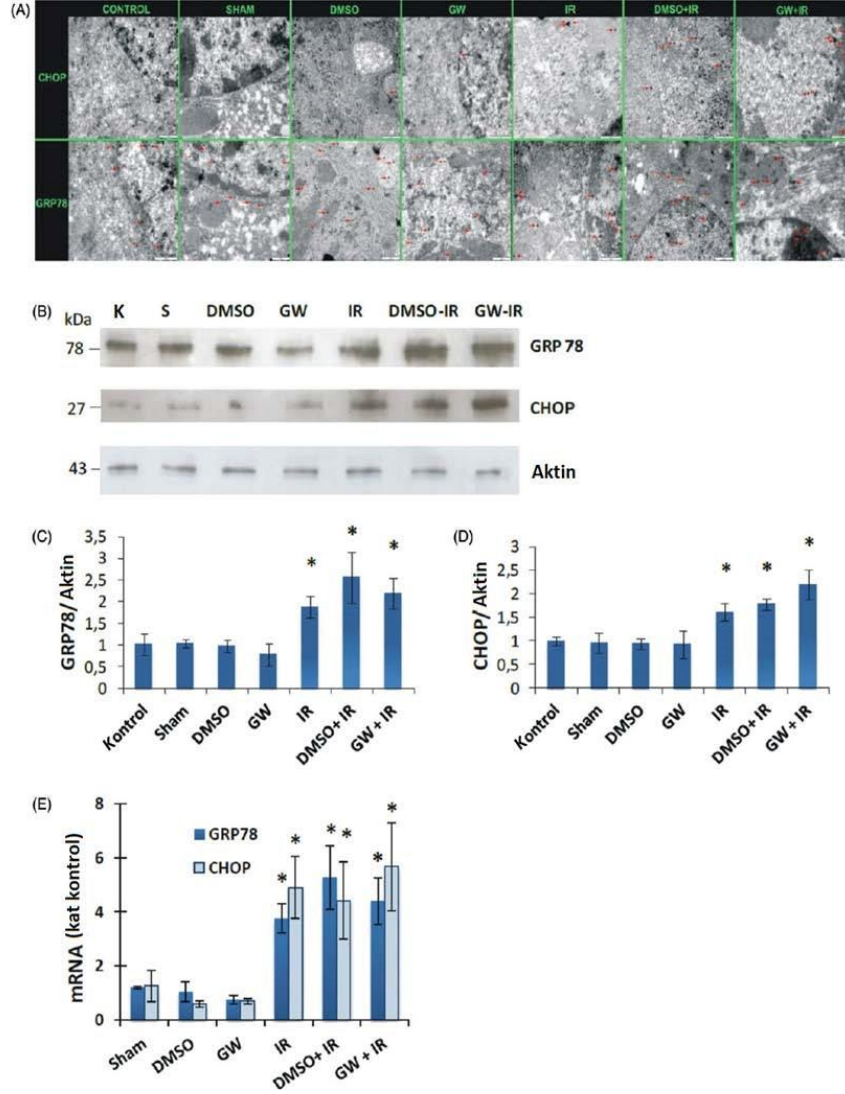
4.3. Karaciğer ER Stresi Biyobelirteçleri

İskemi-reperfüzyon hasarı ER stresi biyobelirteçlerinde anlamlı bir artış sağladı. Glukoz-regüle protein 78 ekspresyonu anlamlı olarak KC dokusunda arttı. Tüm IR gruplarında perisantral hepatositlerde pozitif immünoboyama gözlemlendi (şekil 4.3A). İmmünoboyanma kontrol, DMSO, GW ve sham gruplarında belirgin değildi. Pozitif boyanan hücrelerdeki boyanma yüzdesi ve şiddetine göre elde edilen immünoboyama skorları IR, GW+IR ve DMSO+IR gruplarında kontrol, sham, GW ve DMSO gruplarına göre istatistiksel artış gösterdi (şekil 4.3B). Karaciğer IR hasarında GW tedavisinin ER stresi biyobelirteçlerine etkisi hepatik yapının elektron mikroskopik

incelemesi ile de belirlendi. GRP78 ve CHOP'un hücresel lokalizasyonunu belirlemek için immünoelektron mikroskopi yapıldı. Karaciğer dokusunun elektron mikroskopisi hücresel hasarı, mitokondrial şişmeyi ve pürtüklü ER yapılarının hasarını gösterdi (şekil 4.4A). Altın nanopartiküllerle işaretli GRP78, tüm deney gruplarında ER membranında gözlemlendi. IR gruplarında ise ağırlıklı olarak ER lümeninde ve hücre sitoplazmasında görüldü. Altın nanopartiküllerle işaretli CHOP tüm deney gruplarında ağırlıklı olarak hücre çekirdeğinde ve sitoplazmasında gözlemlendi. IR gruplarında altın nanopartiküllerle işaretli GRP78 ve CHOP kontrol, sham, GW ve DMSO gruplarına göre anlamlı bir artış gösterdi. Western blot analizi de tüm IR gruplarında GRP78 ve CHOP'un kontrol, sham, GW ve DMSO gruplarına göre anlamlı olarak arttığını gösterdi. (şekil 4.4B, şekil 4.4C ve şekil 4.4D). KC IR hasarında N-SMase inhibitörü ile tedavi analiz edilen ER stresi biyobelirteçlerinde anlamlı bir azalma oluşturmadı. Tüm IR gruplarında görülen GRP78 ve CHOP mRNA düzeylerindeki artış protein seviyelerinde görülen yüksekliği doğruladı (şekil 4.4E).



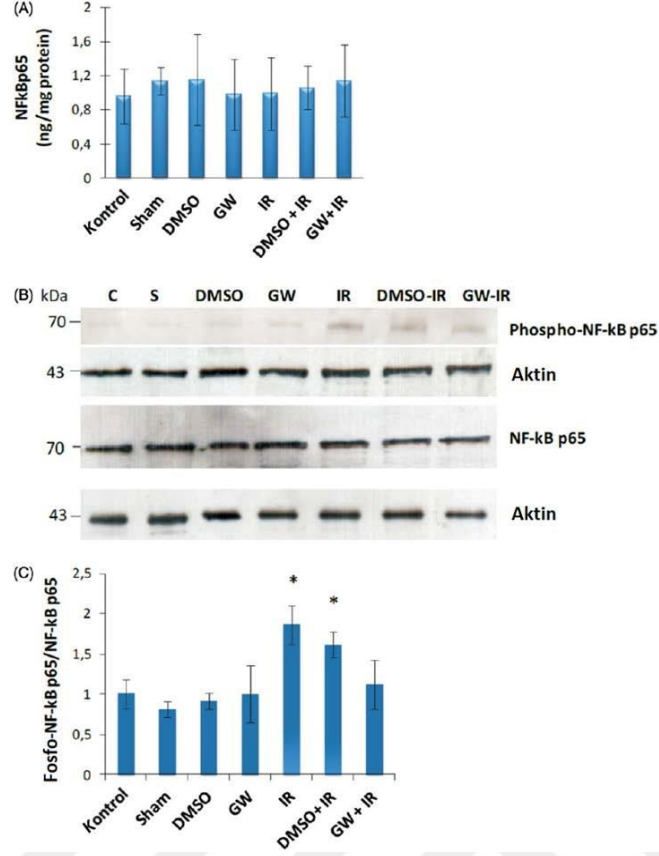
Şekil 4.3. Karaciğer dokusunda GRP78 immünoboyaması. A) Her deney grubundan temsili bir mikroskopik görüntü. Büyütme: 20×. CV, santral ven; IR, iskemi-reperfüzyon; GW, GW 4869 tedavisi verilen grup; DMSO, dimetil sulfoksit verilen grup. Bar, 200 µm. B) GRP78 immünoboyama skorları. Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. n=4-5. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dunn's testi ile belirlendi. *, p<0.05 kontrol, sham, GW ve DMSO grupları ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4.4. Endoplazmik retikulum stresi biyobelirteçleri. A) Her deney grubundan temsili karaciğer dokusu elektron mikroskopi görüntüleri. N, nukleus. Oklar altın nanopartikülleri ile işaretli GRP78 ve CHOP proteinlerini göstermekte. Beyaz bar 2 μm. B) GRP78 ve CHOP western blot analizi. C) GRP78 protein bantlarının ImageJ software ile dansitometrik analizi D) CHOP protein bantlarının ImageJ software ile dansitometrik analizi. Sunulan veriler 3 farklı deneyden elde edilmiştir. Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA analizi yapılmış, gruplar arasındaki farklılık Tukey testi ile değerlendirilmiştir. *, p<0.05 kontrol, sham, DMSO ve GW grupları ile karşılaştırıldığında. E) Karaciğer GRP78 ve CHOP mRNA düzeyleri. Değerler kat değişim ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) şeklinde hesaplanmış, ortalama ± SD olarak verilmiştir. n=3. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA analizi yapılmış, gruplar arasındaki farklılık Tukey testi ile değerlendirilmiştir. *, p<0.001 sham, DMSO ve GW grupları ile karşılaştırıldığında.

4.4. NF-kB p65 Protein Düzeyleri

Deney gruplarında ölçülen NF-kB protein düzeyleri anlamlı bir değişim göstermedi (şekil 4.5A). Ancak, IR ve DMSO+IR gruplarında fosforile NF-kB p65 düzeyleri anlamlı olarak artış gösterdi. Bu durum, IR hasarının KC dokusunda NFkB aktivasyonuna neden olduğunu gösterdi (şekil 4.5B ve şekil 4.5C). İskemireperfüzyon hasarında N-SMase inhibitörü ile tedavi fosforile NF-kB p65 düzeylerini IR ve DMSO+IR gruplarına göre anlamlı olarak azalttı.



Şekil 4.5. Karaciğer NF-kB p65. A) NF-kBp65 protein seviyeleri. Değerler ortalama \pm SD olarak verilmiştir. $n=8-10$. B) Fosforile NF-kB p65 (Ser536) western blot analizi. C, kontrol; S, sham; DMSO, dimetil sulfoksit verilen grup; GW, GW 4869 verilen grup; IR, iskemi-reperfüzyon grubu. C) Protein bantlarının dansimetrik analizi ImageJ software programı ile yapıldı. Sunulan veriler 3 farklı deneyden elde edilmiştir. Tüm değerler ortalama \pm SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA analizi ile yapılmış, gruplar arasındaki farklılık Tukey testi ile değerlendirilmiştir. *, $p<0.05$ kontrol, sham, DMSO, GW ve GW+IR grupları ile kıyaslandığında.

4.5. Apoptozis

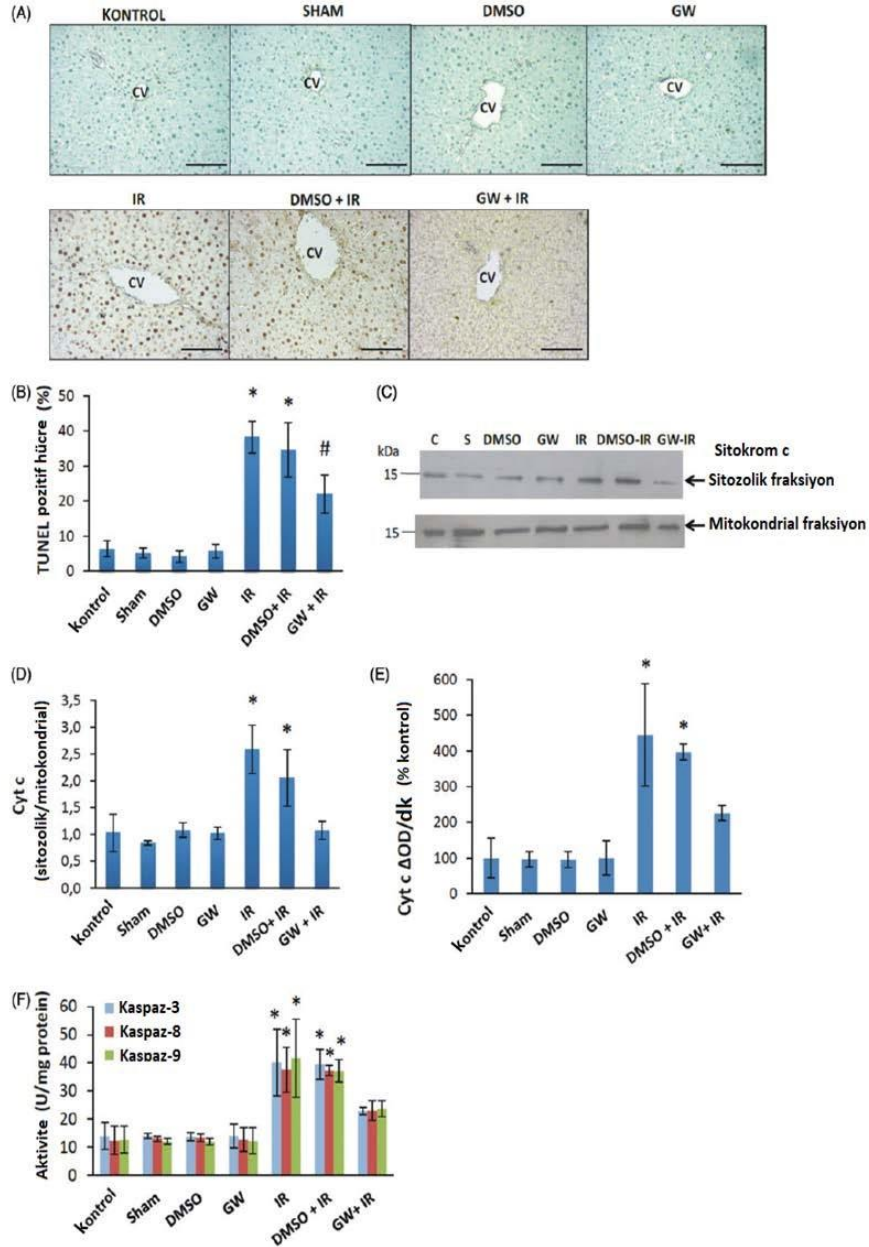
Şekil 4.6A her deney grubunda temsili bir KC TUNEL boyamasını göstermektedir. Koyu kahverengi hücreler ve piknotik nukleus apoptozis varlığını gösterir ve tüm IR gruplarında perisantral hepatositlerde gözlenmiştir. TUNELpozitif olan hücreler KC'de quantifiye edildi (Şekil 4.6B). Karaciğer TUNEL boyaması tüm IR gruplarında kontrol, DMSO, GW ve sham gruplarına göre anlamlı bir artış gösterdi. İskemi-reperfüzyon hasarında N-SMase inhibitörü ile tedavi IR ve DMSO+IR gruplarına göre anlamlı olarak apoptotik hücre yüzdesini azalttı.

4.6. Sitokrom c Protein Miktarı

Sitozolik sitokrom c (cyt c) protein miktarı IR ve DMSO+IR gruplarında kontrol, DMSO, GW ve sham gruplarına göre anlamlı bir artış gösterdi (Şekil 4.6C). İskemi-reperfüzyon hasarında N-SMase inhibitörü ile tedavi sitozolik sitokrom c miktarında azalma sağladı. GW +IR grubu ile kontrol, DMSO, GW ve sham grupları arasında sitokrom c miktarı farklılık göstermedi.

4.7. Kaspaz Aktivitesi

IR ve DMSO +IR gruplarında kaspaz-3, -8 ve -9 aktivitesi kontrol, DMSO, GW ve sham gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti. (Şekil 4.6D). İskemireperfüzyon hasarında N-SMase inhibitörü ile tedavi tüm ölçülen kaspaz aktivitelerinde azalma sağladı. GW +IR grubu ile kontrol, DMSO, GW ve sham grupları arasında tüm kaspaz aktiviteleri farklılık göstermedi.



Şekil 4.6. A) Karaciğer TUNEL boyaması. Her deney grubundan temsili karaciğer dokusu mikroskopi görüntüleri. CV, santral ven; IR, iskemi-reperfüzyon; GW, GW 4869 verilen grup; DMSO, dimetil sulfoksit verilen grup. Bar 200 µm. B) Karaciğerde apoptotik hücre yüzdesi. Hücreler her kesitte 5 büyütme alanında (HPF, 40X) sayıldı. Apoptotik hücre oranı sayılan total hücre sayısına göre belirlendi. Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. n= 5. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA analizi ile yapılmış, gruplar arasındaki farklılık Tukey testi ile değerlendirilmiştir. *, p<0,001 kontrol, sham, DMSO, GW ve GW+IR grupları ile kıyaslandığında. **, p<0,001 kontrol, sham, DMSO ve GW grupları ile kıyaslandığında. #, p<0,001 kontrol, sham, DMSO ve GW grupları ile kıyaslandığında. C) Sitokrom c protein miktarı. Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. n=8-10. Sitosolik fraksiyonda bulunan Cyt c, kontrol grubuna göre oranlanarak verilmiştir. 600 nm'deki aborbans değişimi ΔOD/dk olarak Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dunn's testi ile belirlendi. *, p<0,05 kontrol, sham, DMSO ve GW grupları ile kıyaslandığında. D) Blotların bant yoğunluğu, ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, MD) tarafından belirlendi. Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. n=8-10. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Gruplar arası farklılık Holm- Sidak yöntemi ile yapılmıştır. *, p<0,05 kontrol, sham, DMSO, GW ve GW+IR grupları ile kıyaslandığında. E) Sitokrom c protein miktarı. Tüm değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. n=8-10. Karaciğer dokusunun sitosolik fraksiyonlarındaki Cyt c, kontrol grubuna göre oranlanarak verilmiştir. 600 nm'de absorbanstaki değişimi ΔOD / min olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans

analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dunn's testi ile belirlendi. *, $p<0,05$ kontrol, sham, DMSO ve GW grupları ile kıyaslandığında. F) Kaspaz Aktivitesi. Tüm kaspaz ölçümleri için değerler ortalama \pm SD olarak verilmiştir. $n= 8-10$. Kaspaz değerleri için istatistiksel analiz Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Dunn's testi ile belirlendi *, $p<0,05$ kontrol, sham, DMSO ve GW grupları ile kıyaslandığında.



5.TARTIŞMA

Seramid, IR'ye bağlı oluşan mitokondrial hasarda önemli bir rol oynar (Novgorodov ve Gudz, 2009). Bu nedenle son yıllarda KC hastalık modellerinde sfingolipid sinyal iletisi üzerindeki çalışmalar artmıştır (Mari ve Fernandez, 2007). Tez çalışmamızda hepatik IR hasarında N-SMase inhibisyonunun apoptotik sinyalizasyon üzerindeki regülatuar etkisini gösterdik.

Yapılan araştırmanın sonuçları literatürde ilk kez rapor edilmiştir. Tezimizde, lobar ılık hepatik iskemi modelini kullanarak SMase inhibisyonunun ER stresi biyobelirteçleri, NF-kB p65 aktivasyonu, apoptozis, sitokrom c salınımı ve kaspaz aktivitesi üzerindeki etkilerini inceledik. Verilerimiz N-SMase inhibisyonunun ER stresi üzerinde etkili olmadığını ancak apoptozisi azalttığını gösterdi.

Ilık KC IR modelinde serum ALT aktivitesinde anlamlı bir artış görüldü. Serum ALT aktivitesinde görülen anlamlı artış KC hasarının varlığına işaret eder (Ozer ve ark, 2008) ve bu nedenle kullanılan sıçan modelindeki KC hasarı varlığını doğrular (şekil 4.1). Karaciğer kesitlerinin patolojik değerlendirmesi de KC IR hasarını göstermiştir (table 4.1) ve bu nedenle artmış serum ALT aktivitesi ile uyumludur. N-SMase inhibisyonu ALT aktivitesini ve histopatolojik KC hasarını anlamlı olarak değiştirmedir. ALT aktivitesi KC dokusunda çok yüksektir ve dokudan salınan az miktardaki enzim dolaşımdaki aktivitede anlamlı bir yükselişe neden olabilir.

İskemi-reperfüzyon hasarı kontrol gruplarına göre hepatik N-SMase aktivitesinde ve doku seramid düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. Bu veriler, ılık KC IR modelinde görülen N-SMase aktivite artışı ile uyumludur (Unal ve ark, 2016). Çalışmamızda kullanılan N-SMase dozu (1.25 mg/kg/gün) hepatik dokuda N-SMase aktivitesini inhibe etmek için yeterliydi (şekil 4.2A). Daha önceki çalışmaları doğrular şekilde (Tabatadze ve ark, 2010), verilen dozdaki selektif N-SMase inhibitörü (GW4869) sağlıklı KC dokusunda sfingomyelin ve seramid miktarında anlamlı bir değişiklik oluşturmadı (şekil 4.2B ve 4.2C). Selektif N-SMase inhibitörü olan GW4869 hücre geçirgenliğine sahiptir ve nötral sfingomyelinaz enzimini non-kompetitif olarak inhibe eder (IC₅₀=1µM). GW4869 asit sfingomyelinaz enzimini etkilemez (Luberto ve ark, 2002). Nötral sfingomyelinaz enzimi hücresel stres

durumunda aktive olabilir ve membran sfingomyelinlerinden seramid oluşumuna neden olur. Seramid, sinyali iletmesi oluşturabilir veya sfingosin-1-fosfata dönüşür.

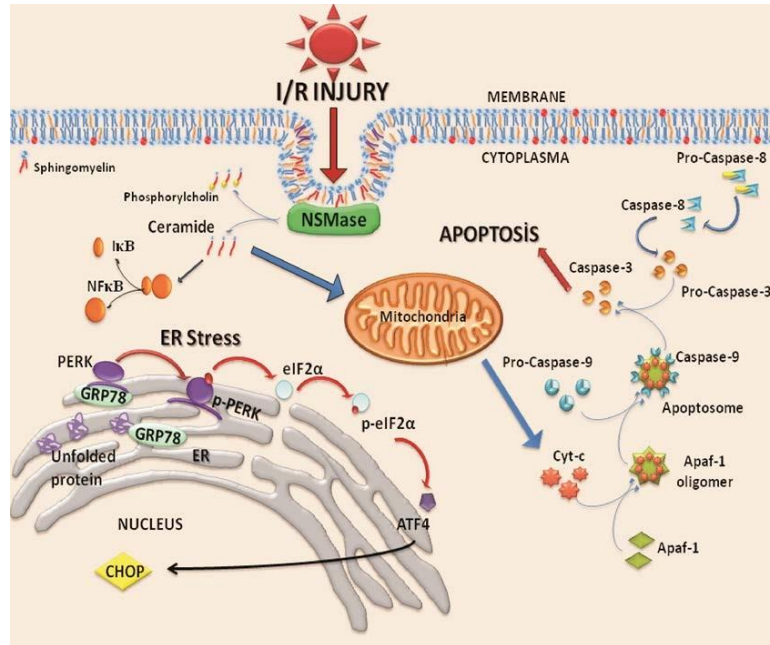
ER stresi ile ilişkili proteinler GRP78 ve CHOP IR hasarına uğramış tüm KC dokularında yükseldi. Bulgularımız, KC IR hasarında artmış ER stresi olduğunu rapor eden çalışmalarla uyumludur (Zhou ve ark, 2016) Artmış GRP78 protein seviyeleri ER stresi varlığını gösteren ve iyi bilinen bir biyobelirteçtir (Ni ve ark, 2011). Şekil 5.1'de gösterildiği gibi normal fizyolojik şartlarda GRP78 ER lümeninde şaperon gibi çalışır ve bir kısmı PKR-benzeri ER kinaz'a (PERK) bağlanır. Katlanmamış proteinlerin varlığında GRP-78 PERK'den ayrılır ve katlanmamış proteinlere bağlanarak ER homeostazisini sağlar (Ni ve ark, 2011). PERK'in GRP78'den ayrılması sonucunda PERK fosforile olarak ökaryotik başlama faktörü 2 alfa'yı (eIF2 α) fosforile eder (Pfaffenbach ve Lee, 2011). Fosforile eIF2 α mRNA translasyonunu baskılayarak total protein sentezini azaltır ve katlanmamış proteinlerin oluşturacağı hücre sitotoksitesini engeller (Zhu ve Lee, 2015). Ancak, fazla veya uzamış ER stresi varlığında fosforile eIF2 α , aktive edici transkripsiyon faktörü 4'ün (ATF4) mRNA'sının translasyonunu sağlar. ATF4 oluşumu CHOP genini aktive eder. CHOP bir transkripsiyon faktörü olarak proapoptotik genlerin aktivasyonunu ve antiapoptotik Bcl-2 geninin baskılanmasını sağlar (Li ve ark, 2012). Karaciğer IR hasarında N-SMase inhibisyonu GRP78 ve CHOP seviyelerini anlamlı olarak değiştirmedir. Bu durum, ER stresine bağlı hücre ölümünde N-SMase inhibisyonunun etkili olmadığını göstermiştir. (Şekil 4.3 ve 4.4).

Karaciğer IR hasarında ER stresinin varlığı NF-kB aktivasyonuna sebebiyet verebilir (Şekil 4.5) (Lin ve ark, 2012) Uzamış ER stresi adaptasyon, stres ve apoptozis aşamalarından geçer. Adaptasyon sağlanamaz ise, ER stresi NF-kB'yi aktive eder (Lin ve ark, 2012). Yakın zamanda retinal epitel hücrelerinde (RPE) yapılan çalışmalar ER stresinin NF-kB'nin aktivasyonuna ve hücre çekirdeğine geçmesine neden olduğunu göstermiştir (Kucuksayan ve ark, 2014). Çalışmamızda gözlemlediğimiz NF-kB'nin aktivasyonu, ER stresinin NF-kB aktivasyonuna neden olduğunu gösteren yayınlarla uyumludur (Pahl ve Baeuerle, 1995). İskemi-reperfüzyon hasarında N-SMase inhibisyonu fosforile NF-kB p65 seviyelerini düşürmüştür. RPE hücrelerinde de SMase aktivitesinin inhibisyonu benzer şekilde NF-kB aktivasyonunu baskılamıştır (Kucuksayan ve ark, 2014).

Karaciğer IR hasarında apoptozisin uyarılması (şekil 4.6) ER stresine bağlı hücre sinyalizasyonu ve seramide bağlı oksidatif/nitratif stresten kaynaklanabilir (Unal ve ark, 2016). Reaktif oksijen ve nitrojen türleri apoptozisi 2 ana yoldan regüle edebilir (Aslan ve ark, 2013). Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve Fas ligandının membran reseptörlerine bağlanması sonucunda kaspaz-8 aktivasyonu gerçekleşir ve ekstrinsik apoptotik yolak uyarılır.

Strese bağlı mitokondrial sitokrom-c salınımı ise intrinsik apoptotik yolağı uyarır.

Şekil 5.1'de gösterildiğı gibi, salınan sitokrom c apoptotik proteaz aktive edici faktör1 (Apaf-1) ve prokaspaz-9 ile bir kompleks teşkil eder. Bu kompleks kaspaz-9'u aktif hale getirir. Hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik sinyal iletisi kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olur. Karaciğer IR hasarında kaspaz -3, -8 ve -9 aktivasyonunda anlamlı bir artış saptandı. N-SMase inhibisyonu sonucunda kaspaz aktivitelerinde anlamlı bir düşüş görüldü. Elde edilen veriler fazla miktarda seramid salınımının intrinsik apoptotik yolağı uyardığını düşündürmektedir. Daha önce belirtildiğı gibi N-SMase inhibisyonu ER stresine bağlı hücre ölümü yolağı üzerinde bir etki sağlamadı. Bu nedenle N-SMase inhibisyonuna bağlı görülen apoptotik hücre ölümündeki azalma seramid düzeylerindeki düşüşten kaynaklanmaktadır.



Şekil 5.1. İskemi reperfüzyon hasarının nötral sfingomyelinaz aktivitesi, ER stresi ve apoptozis aktivitesi üzerindeki etkisi. Apaf-1, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1; ATF4, aktive edici transkripsiyon faktör 4; CHOP, C/EBP-homolog protein; Cyt-c, sitokrom c; eIF2 α , ökaryotik başlama faktörü 2 alfa; ER, endoplazmik retikulum; GRP78, 78 kDa glukoz-regüle protein; NSMase, nötral

sfingomyelinaz; p- eIF2 α , fosforile ökaryotik başlama faktörü 2 alfa; PERK, PKR-benzeri ER kinaz; p-PERK, fosforile PKR-benzeri ER kinaz.



6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamız, KC IR hasarında hepatik N-SMase aktivitesinin, seramid düzeylerinin ve apoptozisin anlamlı şekilde arttığını göstermiştir. N-SMase inhibisyonu postiskemik KC'de anlamlı olarak apoptotik stresi azaltmıştır. N-SMase inhibisyonu yapan diğer ajanların keşfi ve çalışılması KC IR hasarının tedavi açısından önem teşkil eder. Bu ajanlar KC IR hasarında görülen hücre ölümünü azaltabilirler.



KAYNAKLAR

Aslan M, Cort A, Yucel I. Oxidative and nitrate stress markers in glaucoma. *Free Radic Biol Med*. 2008 Aug 15;45(4):367-76.

Aslan M, Dogan S, Kucuksayan E. Oxidative stress and potential applications of free radical scavengers in glaucoma. *Redox Rep*. 2013;18: 76-87

Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *The Journal of physiology*.2004; 555:589-606

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology*. 2000;2(6):326-32.

Bond JM, Chacon E, Herman B, Lemasters JJ. 1993. Intracellular pH and Ca²⁺ homeostasis in the pH paradox of reperfusion injury to neonatal rat cardiac myocytes. *The American journal of physiology* 265:C129-37

Boslem E, MacIntosh G, Preston AM, Bartley C, Busch AK, Fuller M, et al. A lipidomic screen of palmitate-treated MIN6 β -cells links sphingolipid metabolites with endoplasmic reticulum (ER) stress and impaired protein trafficking. *Biochem J*. 2011;435:267-276.

Bui HH, Leohr JK, Kuo MS. Analysis of sphingolipids in extracted human plasma using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2012 Apr 15;423(2):18794.

Carden DL GD. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *The Journal of pathology* 190:255-266.

Chalfant CE, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci*. 2005 Oct 15;118(Pt 20):4605-12.

Colgan SM, Hashimi AA, Austin RC. Endoplasmic reticulum stress and lipid dysregulation. *Expert Rev Mol Med* 2011; 13:1-14.

Cory S, Adams JM: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Rev Cancer*2002; 2:647.

Delva E, Camus Y, Nordlinger B, Hannoun L, Parc R, et al. Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases. *Annals of surgery*.1989; 209:211-8

Dogan S, Aslan M. Hepatic ischemia-reperfusion injury and therapeutic strategies to alleviate cellular damage. *Hepatol Res*. 2011;4: 103-17.

Dogan S, Aslan M. Hepatic ischemia-reperfusion injury and therapeutic strategies to alleviate cellular damage. *Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology*.2011; 4: 103-17

Düzgün A. Hep2 hücre modelinde deksametazonun unfolded protein response genleri üzerine moleküler etkilerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2010.

Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*.2005; 11: 1031-47

Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *The British journal of surgery*. 1994; 81: 637-47

Gorlach A, Klappa P, Kietzmann T. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxidants & redox signaling*. 2006; 8(9-10):1391-418.

Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999; 397(6716):271-4.

Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free radical biology & medicine*.2002; 33: 774-97

Herzinger T, Kleuser B, Schäfer-Korting M, Korting HC. Sphingosine-1-phosphate signaling and the skin. *Am J Clin Dermatol*. 2007;8(6):329-36.

Hines IN, Harada H, Wolf R, Grisham MB. Superoxide and post-ischemic liver injury: potential therapeutic target for liver transplantation. *Current medicinal chemistry*. 2003; 10: 2661-7

Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010; 140(6):900-17.

Hussain SG, Ramaiah KVA. Endoplasmic reticulum: stress, signalling and apoptosis. *Current Sci* 2007; 93: 1684-96.

Jing G, Wang JJ, Zhang SX. ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death. *Experimental diabetes research*. 2012; 589.

Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002; 110:1389–98.

Kerr JF, et al: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implication in tissue kinetics. *Br J Canser* .1972; 26: 239.

Kucuksayan E, Konuk EK, Demir N, Mutus B, Aslan M. Neutral sphingomyelinase inhibition decreases ER stress-mediated apoptosis and inducible nitric oxide synthase in retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2014; 72: 113-23.

Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: Signaling the unfolded protein response. *Physiology* 2007; 22: 193–201.

Li X, Wang Y, Wang H, Huang C, Huang Y, Li J. Endoplasmic reticulum stress is the crossroads of autophagy, inflammation, and apoptosis signaling pathways and participates in liver fibrosis. *Inflamm Res*. 2015; 64: 1-7.

Lin WC, Chuang YC, Chang YS, Lai MD, Teng YN, Su IJ, et al. Endoplasmic reticulum stress stimulates p53 expression through NFκB activation. *PLoS One*. 2012; 7:e39120.

Llacuna L, Marí M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Morales A. Critical role of acidic sphingomyelinase in murine hepatic ischemiareperfusion injury. *Hepatology*. 2006; 44: 561-572.

Llorente IL, Burgin TC, Pérez-Rodríguez D, Martínez-Villayandre B, Pérez-García CC, Fernández-López A. Unfolded protein response to global ischemia following 48 h of reperfusion in the rat brain: the effect of age and meloxicam. *J Neurochem*. 2013; 127:701-710.

Luberto C, Hassler DF, Signorelli P, Okamoto Y, Sawai H, Boros E, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem*. 2002; 277:41128-41139.

Marciniak, SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signalling in disease. *Physiol Rev* 2006; 86: 1133-49

Marí M, Fernández-Checa JC. Sphingolipid signalling and liver diseases. *Liver Int*. 2007; 27: 440-450.

Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundamental & clinical pharmacology* 2001; 15: 293-306

Mortensen A, Skibsted LH, Truscott TG. The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives of biochemistry and biophysics* 2001; 385: 13-9

Mullen TD, Obeid LM. Ceramide and apoptosis: exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell death. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012; 12: 340-363

Myers SI, Hernandez R, Turnage RH, Bartula L, Taylor-Kalley B. Resuscitation of ischemia/reperfusion with hyperalimantation increases intestinal PGI₂ synthase (PS) content and PGI₂ release. *Shock* 1995; 3: 422-9

Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J*. 2011; 434:181-188.

Novgorodov SA, Gudz TI. Ceramide and mitochondria in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009; 53: 198-208.

Ohoka N, Yoshii, S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4– CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* 2005; 24: 1243–55.

Otani H. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in ischemic preconditioning. *Antioxid Redox Signal.* 2004; 6: 449-69.

Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004; 11: 381-9.

Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology.* 2008; 245:194-205.

Pahl HL, Baeuerle PA. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J.* 1995; 14: 2580-2588.

Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *The American journal of physiology* 1988; 254:G768-74

Peralta C, Brenner C. Endoplasmic reticulum stress inhibition enhances liver tolerance to ischemia/reperfusion. *Curr Med Chem.* 2011; 18: 2016-2024.

Pfaffenbach KT, Lee AS. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Curr Opin Cell Biol.* 2011; 23: 150-156.

Qu L, Liu Z, Zhang HM, Su Y, Ye X. Endoplasmic reticulum stress-induced cell survival and apoptosis. *Journal of Chinese Clinical Medicine* 2009; 8: 1-4

Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis.* 2009; 14: 996-1007.

Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 2009; 14: 996-1007

Reed JC: Cytochrome c: can't live with it-can't live without it. *Cell* 1997; 91: 559.

Riedemann NC, Ward PA. Complement in ischemia reperfusion injury. *The American journal of pathology* 2003; 162:363-7

Rodríguez A, Taurà P, García Domingo MI, Herrero E, Camps J, Forcada P, et al. Hepatic cytoprotective effect of ischemic and anesthetic preconditioning before liver resection when using intermittent vascular inflow occlusion: a randomized clinical trial. *Surgery*. 2015; 157:249-259.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007; 8(7):519-29

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

Rose S, Floyd RA, Eneff K, Buhren V, Massion W. Intestinal ischemia: reperfusion-mediated increase in hydroxyl free radical formation as reported by salicylate hydroxylation. *Shock* 1994; 1: 452-6

Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 401.

Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, et al. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock* 2002; 17: 114-9

Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; 7: 880-5.

Szocs K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys*. 2004; 23: 265-95.

Tabatadze N, Savonenko A, Song H, Bandaru VV, Chu M, Haughey NJ. Inhibition of neutral sphingomyelinase-2 perturbs brain sphingolipid balance and spatial memory in mice. *J Neurosci Res*. 2010; 88: 2940-2951.

Unal B, Ozcan F, Tuzcu H, Kirac E, Elpek GO, Aslan M. Inhibition of neutral sphingomyelinase decreases elevated levels of nitrative and oxidative stress markers in liver ischemia-reperfusion injury. *Redox Rep.* 2016; Redox Report, DOI: 10.1080/13510002.2016.1162431.

Wallach D, et al: Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 331.

Wu BX, Clarke CJ, Hannun YA. Mammalian neutral sphingomyelinases: regulation and roles in cell signaling responses. *Neuromolecular Med.* 2010; 12: 320-330.

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; 115:2656-64.

Yamaoka Y, Ozawa K, Kumada K, Shimahara Y, Tanaka K, et al. Total vascular exclusion for hepatic resection in cirrhotic patients. Application of venovenous bypass. *Archives of surgery* 1992; 127:276-80

Yapar M, Aydogan H, Pahsa A, Besirbellioglu BA, Bodur H, Basustaoglu AC, Guney C, Avci IY, Sener K, Sette MH, Kubar A. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse transcriptase-PCR. *Jpn J Infect Dis.* 2005; 58: 358-362.

Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *The Surgical clinics of North America* 1992; 72: 65-83

Zhou H, Zhu J, Yue S, Lu L, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, et al. The Dichotomy of Endoplasmic Reticulum Stress Response in Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation.* 2016; 100:365372.

Zhu G, Lee AS. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis. *J Cell Physiol.* 2015; 230:1413-1420.

Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* 2003; 162: 59–69.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	HAZAL	Uyruğu	TC
Soyadı	TUZCU BALABAN	Tel no	05059935436
Doğum tarihi	23.07.1985	e-posta	hzltzc23@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	75.yıl Cumhuriyet Lisesi	2003
Lisans	Afyon Kocatepe Üniversitesi	2008
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı	2012
Doktora	Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı	2018

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Uzman	Akdeniz Üniversitesi Patoloji Ana Bilim Dalı	2008-2018

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	ÜDS	65

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Karaciğer İskemi Reperfüzyonunda Nötral Sfingomyelinaz İnhibisyonunun Endoplazmik Retikulum Stresine Ve Apoptotik Hücre Ölümüne Etkisi	BAP	2016

Burslar-Ödüller:

Yayımlar

- 1.** Diclofenac induced gastrointestinal and renal toxicity is alleviated by thymoquinone treatment. Aycan İÖ, Elpek Ö, Akkaya B, Kırac E, Tuzcu H, Kaya S, Coşkunfirat N, Aslan M. *Food Chem Toxicol.* 2018 Aug;118:795-804.
- 2.** Neutral sphingomyelinase inhibition alleviates apoptosis, but not ER stress, in liver ischemia-reperfusion injury. Tuzcu H, Unal B, Kırac E, Konuk E, Ozcan F, Elpek GO, Demir N, Aslan M. *Free Radic Res.* 2017 Mar; 51(3):253-268.
- 3.** Inhibition of neutral sphingomyelinase decreases elevated levels of nitrative and oxidative stress markers in liver ischemia-reperfusion injury. Unal B, Ozcan F, Tuzcu H, Kırac E, Elpek GO, Aslan M *Redox Rep.* 2017 Jul; 22(4):147-159.
- 4.** Analysis of polyunsaturated fatty acids and the omega-6 inflammatory pathway in hepatic ischemia/re-perfusion injury. Kirac E, Özcan F, Tuzcu H, Elpek GO, Aslan M. *Mol Med Rep.* 2015 Sep; 12(3):4149-4156.
- 5.** Inhibition of neutral sphingomyelinase decreases arachidonic acid mediated inflammation in liver ischemia-reperfusion injury. Aslan M, Özcan F, Tuzcu H, Kırac E, Elpek GO. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Oct 15; 7(11):7814-23.
- 6.** The effect of high-dose insulin analog initiation therapy on lipid peroxidation products and oxidative stress markers in type 2 diabetic patients. Tuzcu H1, Aslan I, Aslan M. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013:513742.
- 7.** Effect of tauroursodeoxycholic acid on PUFA levels and inflammation in an animal and cell model of hepatic endoplasmic reticulum stress. Aslan M, Kırac E, Yılmaz Ö, Ünal B, Konuk EK, Özcan F, Tuzcu H. *Hum Exp Toxicol.* 2018 Aug;37(8):803-816.

