

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI



**OKSİDATİF STRESİN APOPTOZİS VE HÜCRE
PROLİFERASYONU ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ
Hasret ECEVİT

Danışman
Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

HATAY – 2018

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**OKSİDATİF STRESİN APOPTOZİS VE HÜCRE
PROLİFERASYONU ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ
Hasret ECEVİT

Danışman

Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 16745 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2018

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**OKSİDATİF STRESİN APOPTOZİS VE HÜCRE
PROLİFERASYONU ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

Doktora Tezi
Hasret ECEVİT

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 21.06.2018 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı : Prof. Dr. Abdullah ARPACI

Üye : Prof. Dr. Nizami DURAN

Üye : Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

Üye : Doç. Dr. Ayşegül BAYRAMOĞLU

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Ebru DERİCİ EKER

Bu tez, Enstitümüz Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

21.06.2018

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Kendisini tanımış olmaktan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, akademik bilgi ve deneyimleriyle yoluma ışık tutan danışman hocam Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın hayata geçirilmesinde engin bilgi ve tecrübeleriyle desteğini ve katkılarını esirgemeyen Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Anabilim Dalı başkanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Abdullah ARPACI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Akademik bilgi ve tecrübeleriyle yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Menderes Yusuf TERZİ'ye teşekkür ederim.

Çalışmamın istatistiksel analizinde yardımlarını esirgemeyen Tıp Bilişimi ve Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim elemanlarından Arş. Gör. Emre DİRİCAN'a, biyokimya analizlerinde emeği geçen Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Anabilim Dalı doktora öğrencilerinden Haluk ULUCA'ya ve deneyler aşamasında bana yardım eden yüksek lisans öğrencilerinden Duygu TAP' a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı 16745 nolu proje olarak destekleyen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne teşekkür ederim.

Eğitim sürecim ve hayatımın her döneminde destek, sevgi ve sabrını esirgemeyen canım annem, babam ve kardeşim Kısmet'e, sıcacık gülüşü ve hayat dolu gözleriyle hayatımıza renk katan sevgili yeğenim Ecren Tuana' ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ÖZET	XI
ABSTRACT	XII
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kronik Solunum Yolu Hastalıkları	4
2.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	5
2.3. Reaktif/Redükte Oksijen Türevleri	6
2.3.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)	7
2.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	8
2.3.3. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})	10
2.4. Serbest Radikallerin Etkileri	11
2.4.1. Lipid Peroksidasyonu	12
2.5. Mitokondriyal Oksidatif Stres	14
2.5.1. Elektron Transport Zinciri (ETZ)	16
2.5.2. Mitokondriyal Oksidatif Stres ve Apoptozis İlişkisi	17
2.6. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü)	19
2.6.1. İntrensik/Mitokondriyal Yolak	24
2.6.2. Ekstrinsik Yolak	25
2.7. p53 Proteini, Hücre Döngüsü ve Apoptozis Yolağıyla İlişkisi	26
3.GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1.Hücre Hattı	29

3.2.Ticari Kitler	29
3.3.Kimyasallar.....	30
3.4.Kullanılan Cihazlar.....	31
3.5.Hücre Kültürü	32
3.6.Hücre Sayımı	32
3.7.Hücre Canlılığı Analizi.....	33
3.8.Biyokimyasal Analizler	34
3.8.1.Malondialdehit (MDA) Analizi	34
3.8.2.MDA Standart Eğrisi	34
3.8.3.Katalaz Analizi	35
3.8.4.Total Protein Ölçümü	36
3.9.RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	38
3.9.1.RNA İzolasyonu	38
3.9.2.cDNA Sentezi	39
3.10.Real-Time PCR.....	40
3.11.İstatistiksel Analiz	41
4.BULGULAR.....	42
4.1.Hücre Canlılığı Analizi.....	42
4.2.Biyokimyasal Analizler	45
4.2.1.Malondialdehit (MDA) Analizi	45
4.2.2.Katalaz Analizi	47
4.2.Gen Ekspresyon Analizi	49
5.TARTIŞMA	53
6.SONUÇ.....	59
7.KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Oksidatif stres	6
Şekil 2.2. Moleküler oksijenin süperoksit radikaline indirgenmesi.....	7
Şekil 2.3. Elektron transport zincirinde CoQ aracılığıyla süperoksit üretimi.....	8
Şekil 2.4. Fenton reaksiyonu.....	9
Şekil 2.5. Haber-weiss reaksiyonu.....	10
Şekil 2.6. İyonize radyasyon etkisiyle hidroksil radikali oluşumu	10
Şekil 2.7. H ₂ O ₂ 'nin katalaz enzimi aracılığıyla suya indirgenmesi	11
Şekil 2.8. Apoptozis, nekroz ve otofaji mekanizmaları arasındaki morfolojik farklılıklar	20
Şekil 2.9. El ve ayak parmaklarının oluşumu sırasında parmaklar arasındaki dokunun apoptotik mekanizmayla ortadan kaldırılması	21
Şekil 2.10. Kurbağa larvasındaki kuyruk kısmının olgun kurbağaya dönüşüm aşamasında apoptotik mekanizma ile elimine edilmesi.....	22
Şekil 2.11. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar	28
Şekil 3.1. BEAS-2B hücre hattı	32
Şekil 3.2. Thoma lamı.....	33
Şekil 3.3. MDA standart eğrisi	35
Şekil 3.4. Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri	41
Şekil 4.1. 24 saatlik maruziyet süresi sonunda farklı dozlarda H ₂ O ₂ 'nin BEAS-2B hücre canlılığı üzerine olan etkisi	42
Şekil 4.2. 48 saatlik maruziyet süresi sonunda farklı dozlarda H ₂ O ₂ 'nin BEAS-2B hücre canlılığı üzerine olan etkisi	43
Şekil 4.3. 72 saatlik maruziyet süresi sonunda farklı dozlarda H ₂ O ₂ 'nin BEAS-2B hücre canlılığı üzerine olan etkisi	43
Şekil 4.4. 250 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA düzeyleri.....	45
Şekil 4.5. 300 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA düzeyleri	46

Şekil 4.6. 250 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde katalaz aktivitesi.....	47
Şekil 4.7. 300 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde katalaz aktivitesi	48
Şekil 4.8. 250 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 gen ekspresyon düzeyleri.....	49
Şekil 4.9. 300 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 gen ekspresyon düzeyleri.....	50
Şekil 4.10. 250 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde p53 ve p21 gen ekspresyon düzeyleri.....	51
Şekil 4.11. 300 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde p53 ve p21 gen ekspresyon düzeyleri.....	51
Şekil 4.12. 250 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde bax, bak, bik ve bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri.....	52
Şekil 4.13. 300 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde bax, bak, bik ve bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Oksidatif stres ile ilişkili hastalıklar	16
Çizelge 3.1. Ticari kitler	29
Çizelge 3.2. Kimyasallar.....	30
Çizelge 3.3. Kullanılan cihazlar.....	31
Çizelge 3.4. Real-Time PCR reaksiyon döngüleri.....	40
Çizelge 4.1. Farklı dozlarda (0-500 µM) ve sürelerde (24, 48 ve 72 saat) H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde % canlılık ve EC50 değerleri.....	44
Çizelge 4.2. 250 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA analizi tanımlayıcı verileri	45
Çizelge 4.3. 300 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA analizi tanımlayıcı verileri	46
Çizelge 4.4. 250 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde katalaz aktivitesi analizi tanımlayıcı verileri.....	47
Çizelge 4.5. 300 µM dozda H ₂ O ₂ 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde katalaz aktivitesi analizi tanımlayıcı verileri.....	48

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenozin difosfat
AIF	: Apoptosis inducing factor
Apaf-1	: Apoptotic protease activating factor
ATP	: Adenozin trifosfat
Bax	: Bcl-2- associated X protein
Bak	: Bcl-2 antagonist or killer
Bcl-2	: B-cell leukemia/lymphoma-2
BH	: Bcl-2 homology
BID	: Bcl-2 homology 3 (BH3)-interacting domain death agonist
Bik	: Bcl-2 interacting killer
C	: Karbon
CARD	: N-terminal caspase recruitment domains
-CH ₂ -	: Metil grubu
CL	: Cardiolipin (Kardiyolipin)
CL-OOH	: Okside kardiyolipin
CO ₂	: Karbondioksit
CoQ	: Koenzim Q
CoQH·	: İndirgenmiş CoQ
Cu	: Bakır
Cu/Zn-SOD	: Bakır/Çinko SOD
DISC	: Death-inducing signaling complex
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ETS	: Elektron taşıma sistemi
ETZ	: Elektron transport zinciri
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FADD	: Fas-associated death domain
Fe	: Demir
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSTK 1-1	: Glutasyon transferaz kapa

H	: Hidrojen atomu
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
IAP	: Inhibitor of apoptosis protein
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MDA	: Malondialdehit
Mn	: Manganez
Mn-SOD	: Manganez SOD
Mo	: Molibden
N	: Azot
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
NO	: Nitrik oksit
NRPs	: Non-radical products
O ₂	: Moleküler oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
OH [·]	: Hidroksil radikali
8-OHdG	: 8-Hydroxydeoxyguanosine
Pi	: İnorganik fosfat
PUFA	: Polyunsaturated fatty acids
ROS	: Reactive/reduced oxygen species
SMAC	: Second mitochondria-derived activator of caspase
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPR	: Surface plasmon resonance spectroscopy
TiO ₂	: Titanyum dioksit
TNF	: Tümör nekroz faktör
TNFR1	: Tümör nekroz faktör reseptörü
TP53	: Tumor protein 53
TRAIL	: TNF-related apoptosis-inducing ligand
XIAP	: X-linked inhibitor of apoptosis protein

ÖZET

Oksidatif Stresin Apoptozis ve Hücre Proliferasyonu Üzerine Olan Etkisi

Solunum yolu hastalıkları, dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen, sağlık sistemi ve ülke ekonomilerine ağır yük getiren önemli sağlık sorunlarından biridir. Hücrelerde artmış reaktif oksijen türevlerinin sebep olduğu oksidatif stres durumu, kronik solunum yolu hastalıklarının önemli bir patofizyolojik faktörü durumundadır. Solunum sisteminde, yabancı maddelerin istilasını önlemek üzere bir bariyer görevi gören bronşiyal epitelyum hücreleri için bu durumun önlenmesi, solunum yolu hastalıklarıyla mücadele konusunda oldukça önem arz etmektedir. Çalışmamızda, insan bronşiyal epitel hücre hattı BEAS-2B hücrelerinde, oksidatif stres koşulları altında, gen düzeyinde, oksidatif stres aracılı apoptozisin hangi yolak üzerinden gerçekleştiğinin aydınlatılması amaçlandı.

Bu doğrultuda, BEAS-2B hücreleri farklı doz (0-500 μM) ve sürelerde (24, 48 ve 72 saat) hidrojen peroksit (H_2O_2) maruz bırakılarak uygun dozlar ve süre belirlendikten sonra, oksidatif hasarlı hücre modeli oluşturuldu. Maruziyet (250 ve 300 μM) ve kontrol grupları apoptotik parametreler kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, Bcl-2, bax, bak ve bik ile hücre döngüsü ve apoptoziste kavşak rol alan p53 ve p21 gen ekspresyon seviyeleri açısından kıyaslanarak değerlendirildi.

Çalışmamızda, oksidatif hasarlı hücre modeli, malondialdehit (MDA) düzeyi ve katalaz enzim aktivitesinin spektrofotometrik ölçümüyle teyit edildi. 24 saat süresince 250 ve 300 μM dozlarında H_2O_2 ' ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde, MDA düzeyi ve katalaz enzim aktivitesi anlamlı olarak yüksek bulundu (MDA düzeyi için 250 μM dozda $p = 0,050$, 300 μM dozda $p = 0,021$; katalaz enzim aktivitesi için 250 μM ve 300 μM dozda $p = 0,021$). Apoptotik parametreler, kaspaz-3 (250 μM dozda 3,24-kat $p = 0,001$; 300 μM dozda 3,64 kat $p = 0,038$), kaspaz-9 (250 μM dozda 3,67-kat $p = 0,014$; 300 μM dozda 2,73-kat $p = 0,021$), bax (250 μM dozda 4,46-kat $p = 0,005$; 300 μM dozda 3,17-kat $p = 0,042$) ve bak (250 μM dozda 9,03-kat $p = 0,0001$; 300 μM dozda 9,85-kat $p = 0,046$) gen ekspresyon seviyelerinin, maruziyet grubunda kontrol gruba kıyasla anlamlı derecede arttığı gözlenirken, kaspaz-8, Bcl-2 ve bik parametreleri açısından gruplar arasında anlamlı herhangi bir fark bulunmadı ($p > 0,05$). p53 (250 μM dozda 3,56-kat $p = 0,046$; 300 μM dozda 3,15-kat $p = 0,002$) ve p21 (250 μM dozda 37,57-kat $p = 0,005$; 300 μM dozda 23,18 kat $p = 0,048$) gen ekspresyon seviyeleri ise maruziyet grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu.

Sonuç olarak, çalışmamızda, H_2O_2 aracılı oksidatif stres ortamının, gen düzeyinde, bronşiyal epitel BEAS-2B hücrelerinde, intrinsik yolak üzerinden apoptozisi indüklediği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif stres, BEAS-2B, Apoptozis, Hücre proliferasyonu

ABSTRACT

The Effect of Oxidative Stress on Apoptosis and Cell Proliferation

Airway diseases are one of the major health problems that affect millions of people worldwide and put a heavy burden on the health care system and country's economy. The oxidative stress state caused by increased reactive oxygen species in cells is an important pathophysiological factor of chronic airway diseases. For bronchial epithelial cells that act as a barrier to prevent the invasion of foreign substances into the respiratory system, prevention of this condition is very important in combating airway diseases. In our study, it was aimed to elucidate through which pathway oxidative stress-mediated apoptosis occurs at the gene level under oxidative stress conditions in human bronchial epithelial cell line BEAS-2B cells.

For this purpose, after suitable doses and periods were detected by exposing BEAS-2B cells to hydrogen peroxide (H₂O₂) at different doses (0-500 µM) and time periods (24, 48 and 72 hours), oxidative-damaged cell culture model was designed. The apoptotic parameters of the treatment (250 and 300 µM) and control groups were evaluated by comparing gene expression levels of; caspase-3, caspase-8, caspase-9, Bcl-2, bax, bak and bik together with p53 and p21 which involve in the cell cycle and apoptosis junction.

In our study, oxidative damaged cell model was confirmed by spectrophotometric measurement of malondialdehyde (MDA) level and catalase enzyme activity. MDA level and catalase enzyme activity were significantly higher in BEAS-2B cells exposed to H₂O₂ (250 and 300 µM) for 24 hours ($p = 0,050$ and $p = 0,021$ for MDA measurement; $p = 0,021$ for catalase enzyme activity measurement at 250 and 300 µM doses, respectively). Apoptotic parameters, caspase-3 (3,24-fold $p = 0,001$ and 3,64-fold $p = 0,038$ at 250 and 300 µM doses, respectively), caspase-9 (3,67-fold $p = 0,014$ and 2,73-fold $p = 0,021$ at 250 and 300 µM doses, respectively), bax (4,46-fold $p = 0,005$ and 3,17-fold $p = 0,042$ at 250 and 300 µM doses, respectively) and bak (9,03-fold $p = 0,0001$ and 9,85-fold $p = 0,046$ at 250 and 300 µM doses, respectively) gene expression levels increased significantly in the treatment group compared to the control group. There were no significant differences between the groups in terms of caspase-8, Bcl-2 and bik parameters ($p > 0,05$). Besides gene expression levels of p53 (3,56-fold $p = 0,046$ and 3,15-fold $p = 0,002$ at 250 and 300 µM doses, respectively) and p21 (37,57-fold $p = 0,005$ and 23,18-fold $p = 0,048$ at 250 and 300 µM doses, respectively) were found significantly higher in the treatment group.

In conclusion, in our study, it was observed that H₂O₂-mediated oxidative stress rate induced apoptosis through the intrinsic pathway at the gene level in the bronchial epithelial BEAS-2B cells.

Keywords: Oxidative stress, BEAS-2B, Apoptosis, Cell proliferation

1.GİRİŞ

Solunum yolu hastalıkları, dünya çapında milyonlarca insanı etkilemekte, sağlık sistemi ve ülke ekonomilerine ağır yük getirmektedir (Kocabaş 2010, Öner Erkeköl ve ark. 2017). Hücrelerde artmış reaktif/redükte oksijen türevlerinin (reactive oxygen species; ROS) sebep olduğu oksidatif stres durumu, astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi kronik solunum yolu hastalıklarının önemli bir patofizyolojik faktörü durumundadır (Tsao ve Yin 2015). Solunum sisteminde, yabancı maddelerin istilasını önlemek üzere bir bariyer görevi gören bronşiyal epitelyum hücreleri için bu durumun önlenmesi, solunum yolu hastalıklarıyla mücadele konusunda oldukça önem arz etmektedir.

Serbest radikaller; dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan (Karabulut ve Gülay 2016), yüksek derecede reaktif (Gupta ve ark. 2014), kararsız (Yarosoz ve Chang 2018) ve kısa ömürlü (Mercan 2004) yapılardır. Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerini kapsayan bu yapılar, birçok endojen sistem tarafından farklı fizyokimyasal ya da patolojik koşullara maruziyet neticesinde, normal metabolik sürecin bir parçası olarak üretilmektedirler (Lobo ve ark. 2010, Gupta ve ark. 2014). Yapılarındaki eşleşmemiş elektronların varlığı, kararsız ve yüksek derecede reaktif olmaları, serbest radikallere birtakım özellikler kazandırır. Başka moleküllere elektron vererek ya da elektron alarak oksidan ya da redükten gibi davranabilirler. Serbest radikallerin bu atakları lipid, protein ve nükleik asitler başta olmak üzere önemli makromolekülleri kapsamaktadır. Serbest radikaller bu etkileri sebebiyle hücre hasarı ve homeostatik bozulmalara sebep olmakta ve birçok patolojik sürece zemin hazırlamaktadır (Lobo ve ark. 2010). Normal koşullar altında, serbest radikal seviyeleri, hücre içinde bulunan antioksidan sistemler tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir (Yarosoz ve Chang 2018). Serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki bu denge, düzenli fizyolojik fonksiyonlar için önem arz etmektedir (Lobo ve ark. 2010). Ancak bazı durumlarda üretilen serbest radikal miktarı antioksidan kapasiteyi aşabilmektedir. Böyle durumlarda, antioksidan sistem tarafından karşı konulamayan serbest radikal türlerinin aşırı üretimi **oksidatif stres** olarak adlandırılmaktadır (Pisoschi ve Pop 2015).

İçerdiği çeşitli antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerine rağmen mitokondri, en güçlü intraselüler ROS kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır. Mitokondri iç zarında lokalize

olan elektron taşıma sistemi (ETS), elektronları moleküler oksijene sızdırabilen birçok redoks merkezi içermesi sebebiyle mitokondriyal ROS üretiminin primer kaynağıdır. Bu durum birçok dokuda, süperoksit radikali oluşmasına sebep olmaktadır. Oluşan süperoksit yüksek derecede reaktif hidroksil radikali üretimiyle sonuçlanabilen birçok reaksiyonun öncülüdür. Aerobik hücrelerde mitokondriler aynı zamanda oluşan oksijen radikallerinin zarar verici etkileri açısından önemli bir hedef durumundadır (Orrenius 2007). Bu hedeflerden biri, mitokondri membranında bulunan lipitler olup peroksidasyon ürünleri doğrudan membrandaki proteinlerle ya da dolaylı lipit parçalarıyla etkileşerek membranların bariyer fonksiyonlarını bozabilmektedir. Bu durum, apoptozis gibi hücre ölüm yollarında anahtar rol oynayan sitokrom c gibi pro-apoptotik faktörlerin zar geçişini kolaylaştırmaktadır (Chen ve ark. 1995, Orrenius 2007). Apoptozis; zararlı, gereksiz ya da hasarlı olan hücrelerin programlı olarak öldüğü fizyolojik bir süreçtir. Apoptotik süreç, başlangıcından sonuna kadar anahtar rol oynayan kaspazların dâhil olduğu intrinsik (mitokondriyal) ya da ekstrinsik (ölüm reseptörü) yolak aracılığı ile gerçekleşmektedir. Proliferasyon ve apoptozis arasındaki denge vücutta homeostazisi sağlayan önemli bir olaydır (Hengartner 2000, Reed 2000, Ghobrial ve ark. 2005, Fulda ve Debatin 2006).

Hücre döngüsünün kontrolü, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma, apoptozis, deoksiribonükleik asit (DNA) tamiri ve genomik kararlılığın sağlanması gibi birçok hücrel olayda rol alan p53 proteini (Harris 1996), hücrede gerçekleşen hasara bağlı olarak kararlı hale gelir ve hücre döngüsünü durdurur. Böylelikle hücrede hasarın onarımına imkân sağlar. Hasarın hücrenin tamir kapasitesini aştığı durumlarda ise hücreyi apoptozise yönlendirir (Koçak ve ark. 2011). Bir tümör supresör gen ürünü olan p53 proteini, DNA hasarı gibi hücrel stres koşulları mevcut olduğunda eksprese olur, bir transkripsiyon faktörü olarak DNA'ya bağlanır ve bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21 ekspresyonunu uyararak hücre döngüsünü G1 evresinde durdurur (Surget ve ark. 2013). Eğer hasar giderilemezse, p53 proteini bik (Bcl-2 interacting killer) proteinini indükleyerek hücreyi apoptozise yönlendirir (Mates ve ark. 2008).

Şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalarda, artmış ROS'un mitokondriyal disfonksiyona sebep olduğu ve bunun neticesinde apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (Tsao ve Yin 2015, Tseng ve ark. 2015). Ancak, artmış ROS'un apoptozisi hangi yolak aracılığıyla uyardığı ile ilgili, apoptozisin ekstrinsik ve intrinsik yollarına ait parametrelerinin BEAS-2B hücrelerinde gen düzeyinde bir arada değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Mevcut çalışmamızda, BEAS-2B hücreleri hidrojen perokside maruz bırakılarak oksidatif hasarlı hücre modeli oluşturuldu. Maruziyet ve kontrol grupları apoptotik parametreler olan kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, bax (Bcl-2- associated X protein), bak (Bcl-2 antagonist or killer), Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma-2) ve Bik gen ekspresyon düzeyleri açısından kıyaslandı. Böylelikle, BEAS-2B hücrelerinde oksidatif stres koşulları altında, gen düzeyinde, oksidatif stres aracılı apoptozisin hangi yolak üzerinden gerçekleştiğinin aydınlatılması amaçlandı. Ayrıca çalışmamızda, hem apoptozis hem de hücre döngüsüyle ilişkili olan p53 ve p21 gen ekspresyon seviyeleri de değerlendirilerek oksidatif stresin bu yolaklar üzerine olan etkisi bir arada değerlendirildi. Böylelikle, p53 proteininin p21 proteini üzerinden hücre döngüsünü durdurarak mı, yoksa bik proteini aracılığıyla apoptozisi uyararak mı hücrel strese yanıt oluşturduğu da değerlendirilmiş oldu.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Solunum Yolu Hastalıkları

Solunum yolu hastalıkları, dünya çapında milyonlarca insanı etkilemekte, sağlık sistemi ve ülke ekonomilerine ağır yük getirmektedir (Kocabaş 2010, Öner Erkeköl ve ark. 2017). Kronik solunum yolu hastalıklarının büyük bir oranını astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAİ) oluşturmaktadır (Öner Erkeköl ve ark. 2017). KOAİ, 2002 yılında dünya çapında ölüme sebebiyet veren patolojiler arasında 5. sırada yer almış, 2030 yılında ise 4. sırada yer alacağı tahmin edilmektedir (Mathers ve Loncar 2006). Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hijyen Merkezi Başkanlığı, Halk Sağlığı Okulu'nun hazırlamış olduğu rapora (2004) göre ülkemizde de benzer şekilde KOAİ, ölüme sebebiyet veren patolojiler arasında 3. sırada yer almaktadır (Sağlık Bakanlığı 2004). Hastalıkların küresel yükü çalışmasının (Global Burden of Disease Study) 2016 yılı verilerine göre, dünya çapında 251 milyon kişinin KOAİ ile mücadele ettiği (World Health Organisation 2016) ifade edilirken, Dünya Sağlık Örgütü Aralık 2016 dönemine ait verilerinde ise sadece 2015 yılında astım kaynaklı 383.000 ölüm vakası olduğu rapor edilmiştir (World Health Organisation 2016).

Solunum sisteminin sigara dumanı, partikül maddeler, ağır metaller ve hava kirliliği gibi çevresel kontaminasyon unsurlarına maruziyetinin, solunum yolu hastalıklarının bu denli çarpıcı istatistiksel sonuçlara sahip olmasında önemli bir etken olduğu tartışmasızdır (Tsao ve Yin 2015). Bu çevresel faktörler, solunum yolu hücrelerinde aşırı reaktif/redükte oksijen türevleri (reactive/reduced oxygen species; ROS) üretimine sebep olabilmektedir (Cho ve ark. 2014). Hücrelerde artmış ROS'un sebep olduğu oksidatif stres durumu, astım ve KOAİ gibi kronik solunum yolu hastalıklarının önemli bir patofizyolojik faktörü durumundadır (Tsao ve Yin 2015). Sigara kullanımı ya da partikül madde maruziyeti gibi çevresel kontaminasyon unsurlarının, solunum yolu epitel hücrelerinde hidrojen peroksit (H₂O₂) salınımını uyardığı bilinmektedir (Downs ve ark. 2011, Yi ve ark. 2014). Solunum yolu epitel hücrelerinde artan H₂O₂ seviyesi neticesinde oluşan oksidatif stres durumu, hücrelerde apoptozisin tetikleyici faktörlerinden biri durumunda olup, oksidan ve apoptotik belirteç seviyelerini arttırdığını, anti-oksidan ve anti-apoptotik belirteç seviyelerini ise

azalttığını rapor eden birçok çalışma bulunmaktadır (Antognelli ve ark. 2014, Hsia ve Yin 2015, Tsao ve Yin 2015). Solunum sisteminde yabancı maddelerin istilasını önlemek üzere bir bariyer görevi gören bronşiyal epitelyum hücreleri için bu durumun önlenmesi, solunum yolu hastalıklarıyla mücadele konusunda oldukça önem arz etmektedir (Tesfaigzi 2006, Tsao ve Yin 2015).

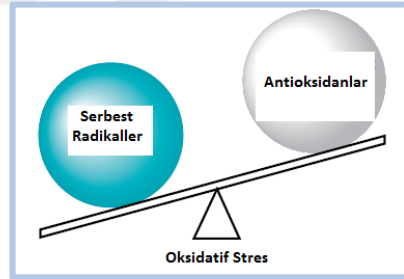
2.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller; dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan (Karabulut ve Gülay 2016), yüksek derecede reaktif (Gupta ve ark. 2014), kararsız (Yarosoz ve Chang 2018) ve kısa ömürlü (Mercan 2004) yapılardır. Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerini kapsayan bu yapılar, birçok endojen sistem tarafından farklı fizyokimyasal ya da patolojik koşullara maruziyet neticesinde, normal metabolik sürecin bir parçası olarak üretilmektedirler (Lobo ve ark. 2010, Gupta ve ark. 2014). Yapılarındaki eşleşmemiş elektronların varlığı, kararsız ve yüksek derecede reaktif olmaları, serbest radikallere birtakım özellikler kazandırır. Başka moleküllere elektron vererek ya da elektron alarak oksidan ya da redüktan gibi davranabilirler. Serbest radikallerin bu atakları lipid, protein ve nükleik asitler başta olmak üzere önemli makromolekülleri kapsamaktadır. Serbest radikaller bu etkileri sebebiyle hücre hasarı ve homeostatik bozulmalara sebep olmakta ve birçok patolojik sürece zemin hazırlamaktadır (Lobo ve ark. 2010). Normal koşullar altında, serbest radikal seviyeleri, hücre içinde bulunan antioksidan sistemler tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir (Yarosoz ve Chang 2018). Serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki bu denge, düzenli fizyolojik fonksiyonlar için önem arz etmektedir (Lobo ve ark. 2010). Ancak, bazı durumlarda üretilen serbest radikal miktarı antioksidan kapasiteyi aşabilmektedir. Böyle durumlarda, antioksidan sistem tarafından karşı konulamayan serbest radikal türlerinin aşırı üretimi *oksidatif stres* olarak adlandırılmaktadır (Pisoschi ve Pop 2015) [**Şekil 2.1; (Smith ve ark. 2005)**]. Yapılan çalışmalar, oksidatif stresin, kanser (Sander ve ark. 2003), nörodejeneratif hastalıklar (Uttara ve ark. 2009), diyabet (Maritim ve ark. 2003) ve solunum yolu hastalıkları (Cho ve Moon 2010) gibi pek çok hastalıkla ilişkili olduğunu göstermiştir.

Serbest radikal türlerinin vücuttaki üretimi, normal metabolik olaylar ve çevresel oksidan faktörlere maruz kalmamız sebebiyle kaçınılmazdır. Dolayısı ile endojen ya da

ekzojen kaynaklı oluşabilmektedirler (Poljsak ve ark. 2013). Serbest radikallerin en önemli endojen kaynağı, mitokondri organelinde bulunan elektron transport zinciridir (ETZ). Bunun dışında, nitrik oksit sentaz reaksiyonu, fenton reaksiyonu, mikrozomal sitokrom P450 ve peroksizomal beta oksidasyon metabolizmaları, endojen kaynaklı serbest radikal üretimine sebep olan biyolojik reaksiyonlara örnek olarak gösterilebilir (Gilca ve ark. 2007). Serbest radikal üretimine sebep olan ekzojen faktörler ise, sigara kullanımı, alkol, iyonize ve ultraviyole radyasyonları, pestisitler ve ozon gibi kirleticileri/toksinleri kapsamaktadır (Poljsak ve ark. 2013, Pisoschi ve Pop 2015).

Hücrelerde oluşan radikallerin büyük bir bölümü oksijen kaynaklıdır. Oksijen dışında azot (N), demir (Fe), bakır (Cu) ve sülfür kaynaklı radikaller de bulunmaktadır (Pisoschi ve Pop 2015). Fe, Cu, manganez (Mn) ve molibden (Mo) gibi geçiş metalleri orbitallerinde eşleşmemiş elektron taşımalarına rağmen serbest radikal olarak kabul edilmezler. Çünkü, bu yapılar nispeten daha stabil olup zincir reaksiyonlarını başlatmazlar ve hücrede proteinlere bağlı olarak bulunurlar. Ancak serbest radikal oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar (Smith ve ark. 2005).



Şekil 2.1. Oksidatif stres

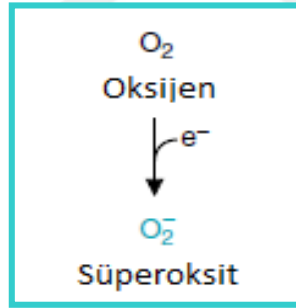
2.3. Reaktif/Redükte Oksijen Türevleri

Moleküler oksijen (O_2), farklı orbitallerde paralel spin durumlu iki eşleşmemiş elektrona sahip radikal karakterli bir yapıdadır. Bu yapı oksijenin en stabil formu olup termodinamik olarak güçlü bir oksitleyici ajandır (Halliwell 2006). Moleküler oksijen, biradikal doğası sebebiyle biyosferdeki en önemli elektron alıcısı olma özelliğini taşır. Eşleşmemiş elektronları hızlı bir şekilde yapısına katarak, kısaca ROS olarak bilinen redükte

türevlerini oluşturur (Riley 1994). Dolayısı ile ROS terimi, moleküler oksijenden türevlenen, moleküler oksijene kıyasla daha radikal karakterli ya da bu karakterde yapıların oluşmasında aracı olarak bilinen yapılar için kullanılmaktadır (Hancock ve ark. 2001). Başlıca reaktif oksijen türevleri, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$), hidroksil radikali ($OH\cdot$) ve hidrojen peroksittir (H_2O_2) (Riley 1994). Reaktif oksijen türevleri, hücre proliferasyonu, apoptozis ve nekroz gibi hücrel yolakların düzenlenmesinde sinyal molekülü olarak rol almaktadır. Ayrıca, birçok genin aktivasyon ya da baskılanmasını içeren hücre sinyalizasyon olaylarında görev yapmaktadır (Hancock ve ark. 2001, Poljsak ve ark. 2013).

2.3.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)

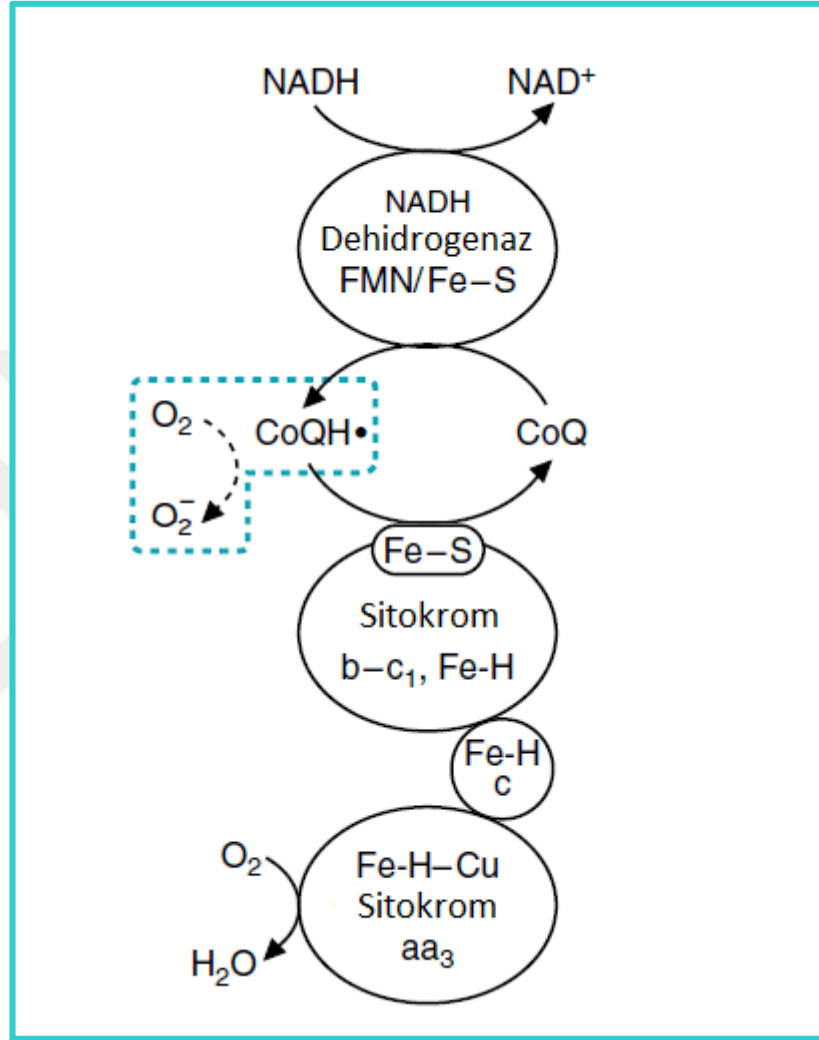
Aerobik hücrelerde, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$), moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alıp indirgenmesi sonucu oluşur (Smith ve ark. 2005) [Şekil 2.2; (Smith ve ark. 2005)].



Şekil 2.2. Moleküler oksijenin süperoksit radikaline indirgenmesi

Sahip olduğu tek eşleşmemiş elektronu sebebiyle radikal karakterlidir. Hücrelerde süperoksit üretiminin majör araçlarından biri mitokondriyal membranlar arası alanda lokalize olan elektron transport zinciri elemanlarından koenzim Q (CoQ)'dur. CoQ güçlü bir indirgeyici ajan olup reaksiyonda elektron vericisi olarak görev alır. CoQ'nun tek elektronla indirgenmiş formu ($CoQH\cdot$) mitokondriyal membranlar arası alanda serbest olarak bulunmaktadır. Bu yapı çözülmüş halde bulunan moleküler oksijene bir elektron transfer

ederek süperoksit radikali oluşturabilmektedir (Smith ve ark. 2005) [Şekil 2.3; (Smith ve ark. 2005)].

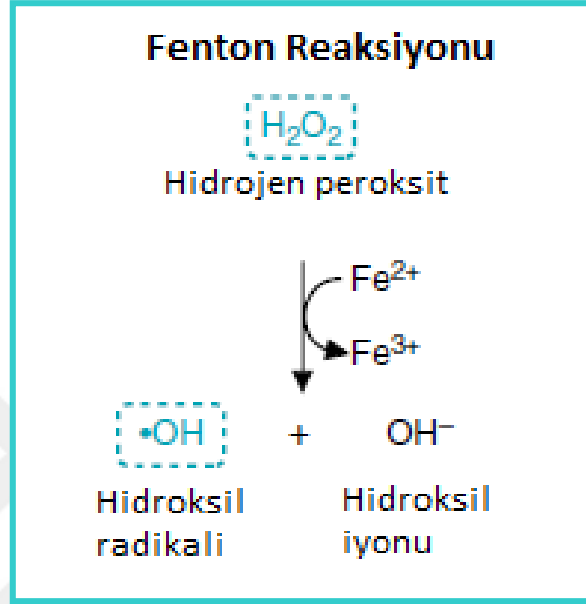


Şekil 2.3. Elektron transport zincirinde CoQ aracılığıyla süperoksit üretimi

2.3.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

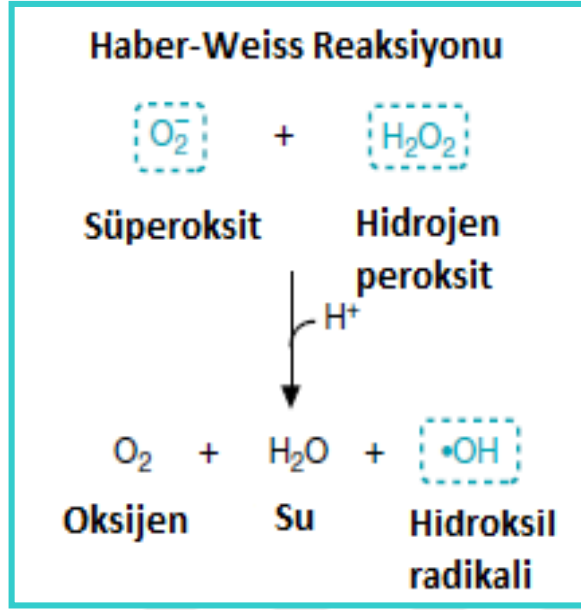
Serbest radikaller içerisinde en reaktif ve zarar verici olarak kabul gören hidroksil radikali (OH•) oluşumunda aracı olmasından dolayı hidrojen peroksit (H₂O₂), bir serbest radikal olmamasına rağmen reaktif oksijen türevleri sınıfında değerlendirilir.

H₂O₂, yağdaki çözünürlüğü sebebiyle membranlardan kolaylıkla difüze olur. Fe veya Cu gibi geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali (OH•) oluşturur (Smith ve ark. 2005) [Şekil 2.4; (Smith ve ark. 2005)].



Şekil 2.4. Fenton reaksiyonu

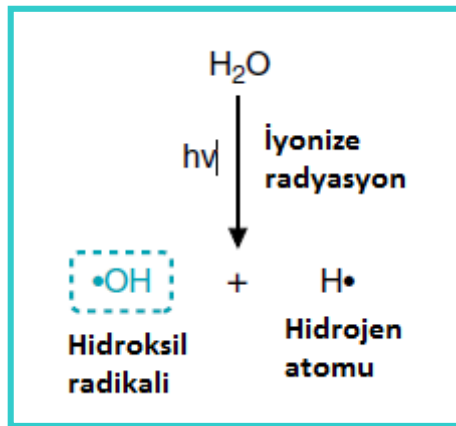
H₂O₂, yağdaki sınırlı çözünürlüğü sebebiyle, difüzyonu da sınırlı olan süperoksit anyonu varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılan non-enzimatik bir reaksiyon aracılığıyla hidroksil radikali (OH•) oluşturmaktadır (Smith ve ark. 2005) [Şekil 2.5; (Smith ve ark. 2005)].



Şekil 2.5. Haber-weiss reaksiyonu

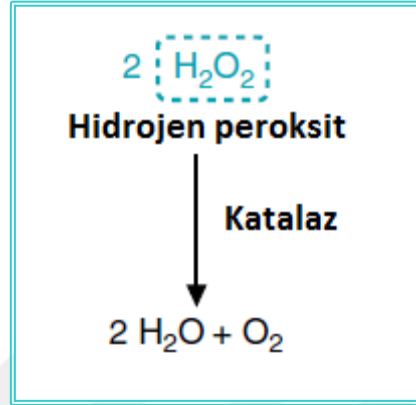
2.3.3. Hidroksil Radikali (OH•)

Hidroksil radikali (OH•) son derece reaktif olup yarılanma ömrü çok kısadır. Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu H_2O_2 'den oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur (Smith ve ark. 2005) [Şekil 2.6; (Smith ve ark. 2005)].



Şekil 2.6. İyonize radyasyon etkisiyle hidroksil radikali oluşumu

Katalaz enzimi, H_2O_2 'yi suya indirgeyerek, hücrelerde Fenton ve Haber-weiss reaksiyonları aracılığıyla hidroksil radikali oluşumuna aracılık etmesine engel olmaktadır (Smith ve ark. 2005) [Şekil 2.7; (Smith ve ark. 2005)].



Şekil 2.7. H_2O_2 'nin katalaz enzimi aracılığıyla suya indirgenmesi

2.4. Serbest Radikallerin Etkileri

Reaktif oksijen türevlerinin üretimi aerobik hücrel metabolizmanın kaçınılmaz bir sonudur. Bu yapılardan bazıları oldukça yüksek reaktiviteye sahip olup (hidroksil radikali), protein, nükleik asit ve lipid gibi birçok molekülü oksidatif olarak hasara uğratabilir (Rao ve Moller 2011).

Serbest radikallerin proteinler üzerindeki majör etkisi karbonilasyondur (Rao ve Moller 2011). Protein karbonil türevleri, proteinlerin α -amidasyon yolağı veya glutamil yan zincirlerinin oksidasyonu sonucunda, oksidatif olarak parçalanmasıyla oluşabilir. Bunun sonucunda, bir α -ketoasil türevi aracılığıyla N-terminal amino asidi bloke olmuş bir peptit oluşur (Dalle-Donne ve ark. 2003). Ayrıca sistein, histidin ve lizin rezidülerinin nükleofilik yan zincirlerinin, lipid peroksidasyonu sırasında üretilen aldehitler [4-hidroksi-2-nonenal, malondialdehit, 2-propenal (akrolein)], indirgeyici şekerlerin reaksiyonu neticesinde oluşan reaktif karbonil türevleri (ketoaminler, ketoaldehitler, deoksiosonlar) ve proteinlerin oksidasyon ürünleri ile sekonder reaksiyonuyla da proteinlerde karbonil gruplar oluşabilmektedir (Dalle-Donne ve ark. 2003, Özcan ve ark. 2015). Yüksek protein karbonil düzeyleri, alzheimer (Lyras ve ark. 1997), romatoid artrit (Mateen ve ark. 2016), diyabet

(Gelissen ve ark. 2011), sepsis ve kronik böbrek yetmezliği (Sell ve ark. 2007) gibi birçok patolojik süreçle ilişkilendirilmiştir.

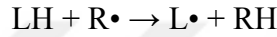
Reaktif oksijen türevlerinden, yüksek reaktiviteye sahip özellikteki hidroksil radikali deoksiribonükleik asit (DNA) ile, DNA yapısında bulunan çift bağlara eklenerek veya 2-deoksiribozun C-H (C; karbon, H; hidrojen) bağlarından ve timin yapısındaki metil gruplarından hidrojen atomu çıkararak reaksiyona girer. Primidinlerin C5-C6 çift bağlarına eklenerek, C5-OH ve C6-OH radikallerini, timinin yapısından hidrojen atomu çıkararak ise allil radikali oluşmasına sebep olur. Oluşan bu radikaller, redoks özellikleri, redoks çevreleri ve reaksiyon partnerlerine bağlı olarak, okside ya da redükte oldukları çeşitli mekanizmalarla sitozin glikol, timin glikol, 5-hidroksimetilurasil ve 5-formilurasil gibi çok sayıda radikal karakterli ürünlere dönüşürler. Hidroksil radikalleri ayrıca pürinlerin C4, C5 ve C8 pozisyonlarına eklenerek radikal karakterli yapılar oluştururlar. 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), bu mekanizmayla oluşan ve DNA hasar göstergesi olarak en çok çalışılan yapıdır (Cooke ve ark. 2003). Oksidatif DNA hasarı, kan hastalıkları (Senturker ve ark. 1997), nörodejeneratif hastalıklar (Alam ve ark. 1997, Lovell ve ark. 1999, Zhang ve ark. 1999, Bogdanov ve ark. 2000), kanser (Okamoto ve ark. 1994, Matsui ve ark. 2000, Schwarz ve ark. 2001), diyabet (Krapfenbauer ve ark. 1998, Rehman ve ark. 1999) ve hepatit (Shimoda ve ark. 1994, Kato ve ark. 2001) gibi pek çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir.

2.4.1. Lipid Peroksidasyonu

Hücrel homeostazın sürdürülmesinde, membran lipid çift tabakasının yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü önem arz etmektedir. Membran yapısının zarar görmesi, sinyal iletimi, moleküler tanıma ve taşıma, zar potansiyelinin korunması ve hücrel metabolizmaya engel olarak birçok patolojik sürecin başlamasına sebep olabilir (Dix ve Aikens 1993). Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin çoklu doymamış/poliansatüre yağ asitlerini (Polyunsaturated fatty acids; PUFA) okside etmesi lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir (Gutteridge 1995). Membran yapısında bulunan glikolipid ve kolesterol gibi diğer lipid türevleri de oksidan ajanların hedefleri arasındadır (Girotti 1998). Ancak, PUFA'ların yapısında bulunan çift bağ, ardından gelen C-H bağını zayıflatarak hidrojenin koparılmasını kolaylaştırmıştır. Bu sebeple, zar lipitlerinden doymamış yağ asidi zincirleri

peroksidasyona daha hassastır (Gutteridge 1995, Özcan ve ark. 2015). Lipid peroksidasyonu, sitopatolojik sonuçlara sebep olabilecek dejeneratif bir süreç olup aterogenezis, iskemi-reperfüzyon hasarı ve ultraviyole ile indüklenen karsinogenez gibi birçok patolojik süreçle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, oksidan tabanlı kemoterapötik ve fototerapötik ilaçların sitotoksik etkilerinde rol oynayabilmektedir (Girrotti 1998).

Membran yapısında bulunan PUFA'ların peroksidasyonuna neden olan reaksiyonlar zinciri, yeterli reaktiviteye sahip bir serbest radikalın (R•) PUFA'nın (LH) yapısında bulunan metil grubundan (-CH₂-) bir hidrojen atomu (H) koparmasıyla başlar (Gutteridge 1995). Bu aşama başlama evresi olarak adlandırılır (Catala 2006).

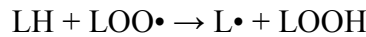


(L•: Radikal karakterli yağ asidi zinciri) (Catala 2006)

Hidrojen atomu tek elektron içerdiğinden metilen gruptan bir hidrojen atomu kopmasıyla karbon atomunda eşleşmemiş tek elektron kalır. Böylelikle yağ asidi zinciri radikal karakterli bir moleküle dönüşmüş olur (L•). Bu karbon merkezli radikal, konjuge dien oluşturmak üzere moleküler olarak yeniden düzenlenir. Oluşan yapı oksijenle birleşir ve lipid peroksil radikaline (LOO•) dönüşür (Gutteridge 1995).

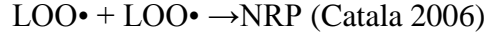


Lipid peroksil radikalleri, başka bir yağ asidinden hidrojen atomu koparabilme yeteneğinde olup yeni bir peroksidasyon zincirini başlatmaktadır (Gutteridge 1995).

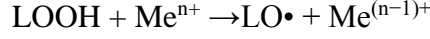


(LOOH: Lipid hidroperoksit) (Catala 2006)

Reaksiyon sonucunda oluşan LOOH reaksiyon zincirinin ilk nispeten stabil yapıdaki ürünüdür. Lipid peroksidasyonunun sürekli başlatıldığı koşullar altında, iki radikali ortadan kaldırarak radikal olmayan ürünleri (non-radical products; NRPs) oluşturan bir sonlandırma reaksiyonu bu sürecin kapsamını sınırlar (Catala 2006).



Geçiş metallerrinin (Me) varlığında ise, lipid hidroperoksitler, lipid peroksidasyonunu tekrar başlatabilen radikallerin üretilmesine sebep olabilirler (Catala 2006).



Oksidatif strese yanıt olarak gerçekleşen lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerin daha ileri reaksiyonlar geçirerek çok çeşitli aldehitlerin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu aldehitlerden bazıları son derece reaktif olup yeni serbest radikal etkilerinin başlamasına sebep olurlar. Bunlar arasında en çok çalışılanı, 4-hidroksiheksenal ve malondialdehit (MDA)'tir (Catala 2006).

Biyolojik membranlarda oluşan peroksidasyon olayları, membran akışkanlığını, potansiyelini ve iyonlara karşı geçirgenliğini negatif yönde etkileyerek organel içeriğinin sitoplazmaya salınmasına ve dolayısıyla hücre hasarı veya hücre ölümüne neden olur (Özcan ve ark. 2015).

Görüldüğü üzere reaktif oksijen türevlerinin hücrelerde birikmesi sonucu ortaya çıkan oksidatif stres durumu, son derece tehlikeli olup birçok patolojik sürecin tetikleyicisi durumundadır. Oksidatif stresin ilişkili olduğu bazı hastalıklar, ilişkili organ ve etiyolojileri **Çizelge 2.1**'de (Rahal ve ark. 2014) gösterilmiştir.

2.5. Mitokondriyal Oksidatif Stres

İçerdiği çeşitli antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerine rağmen mitokondri, en güçlü intraselüler ROS kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır. Mitokondri iç zarında lokalize olan elektron transport zinciri (ETZ), elektronları moleküler oksijene sızdırabilen birçok redoks merkezi içermesi sebebiyle mitokondriyal ROS üretiminin primer kaynağıdır. Bu durum birçok dokuda, süperoksit radikali oluşmasına sebep olmaktadır. Oluşan süperoksit yüksek derecede reaktif hidroksil radikali üretimiyle sonuçlanabilen birçok reaksiyonun öncülüdür (Orrenius 2007).

Çizelge 2.1. Oksidatif stres ile ilişkili hastalıklar

Hastalık	İlişkili organ(lar)	Etiyoloji	Referans
Astım	Akciğer	ROS, özellikle hidrojen peroksit	(Cho ve ark. 2010)
Nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer ve Parkinson hastalığı)	Beyin	Reaktif oksijen türleri (ROS)	(Uttara ve ark. 2009)
Ateroskleroz	Kan damarları	NADPH oksidaz sistemi	(Singh ve Jialal 2006)
Miyokard infarktüsü	Kalp	ROS	(Di Filippo ve ark. 2006)
Dişabet	Çoklu organ	Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz	(Maritim ve ark. 2003)
Melanoma	Deri	DNA hasarı ve lipid peroksidasyonunu kapsayan patofizyolojik süreçler	(Sander ve ark. 2003)
Romatoid ve Osteoartrit	Eklemler	Radikal oksijen türleri	(Ziskoven ve ark. 2010)
Nefrit	Böbrek	Glutatyon transferaz kapa (GSTK 1-1)	(Blackburn ve ark. 2011)
Otoimmün bozukluklar (Sistemik lupus eritematosus)	Bağıışıklık sistemi	Ribonükleoprotein	(Scofield ve ark. 2005)
Maküler dejenerasyon	Göz	Reaktif oksijen ara ürünleri	(Beatty ve ark. 2000)
Kronik yorgunluk	Çoklu organ	C-reaktif protein	(Fulle ve ark. 2007)

2.5.1. Elektron Transport Zinciri (ETZ)

Aerobik hücreler enerji ihtiyaçlarını karşılamak için yakıt olarak karbonhidrat, yağ asitleri ve amino asitleri kullanırlar. Bu yapılar hücrelerde birtakım kimyasal reaksiyonlar geçirerek karbondioksit (CO₂) ve su'ya (H₂O) okside olur. Bu oksidasyon zincirinde oluşan ara ürünler elektronlarını özelleşmiş koenzimler olan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) ve flavin adenin dinükleotid'e (FAD)'a aktararak mitokondri matriksinde enerjiden zengin indirgenmiş koenzimler NADH+H ve FADH₂'yi oluştururlar. Bu koenzimler taşımış oldukları elektronları, mitokondri iç membranında lokalize olan bir grup özelleşmiş elektron taşıyıcılarına aktarır. Sisteme giren elektronlar yüksek enerjiye sahiptir. Ancak sistem üzerinde akarken her basamakta enerjilerinin bir kısmını kaybederler. Bu aktarım sırasında serbest kalan enerjinin bir bölümü adenosin difosfat (ADP) ve inorganik fosfattan (Pi) adenosin trifosfat (ATP) sentezlenerek tutulabilir (Demirel 2014). ATP olarak yakalanamayan serbest enerjinin kalan bölümü ise ısı olarak salınır. Burada redoks reaksiyonları ile ATP sentezi birlikte olduğundan olaya **oksidatif fosforilasyon** adı verilir. Elektron transportu ve oksidatif fosforilasyon ile ATP sentezi, vücudun mitokondri taşıyan tüm hücrelerinde sürekli meydana gelmektedir. Bu olayın meydana geldiği biyolojik sistem ise **elektron transport zinciri (ETZ)** ya da **solunum zinciri** olarak adlandırılmaktadır. ETZ, vücutta farklı yakıtlardan elde edilen elektronların oksijene iletilmelerindeki son ortak yoldur (Champe ve ark. 2007).

Elektron transport zinciri beş ayrı kompleks yapıdan oluşmaktadır. Bunlar;

Kompleks I: NADH-Ubikinon Oksidoredüktaz/ NADH dehidrogenaz kompleksi

Kompleks II: Süksinat dehidrogenaz kompleksi/Süksinat-Q Redüktaz Sistemi

Kompleks III: Ubikinon-sitokrom c oksidoredüktaz/ Sitokrom *bc₁* kompleksi

Kompleks IV: Sitokrom oksidaz/ Sitokrom a+a₃

Kompleks V: ATP sentaz

olarak adlandırılmaktadır. Bu yapılar mitokondri iç membranında lokalize olup, elektronegatiften (düşük elektron ilgili) elektropozitif (yüksek elektron ilgili) doğru

sıralanmışlardır (Demirel 2014). Kompleks I-IV, elektronların oksijenle birleşerek suya dönüşmesini, kompleks V ise ATP sentezini kataliz etmektedir. Elektron transport zincirinin her elemanı bir elektron vericisinden elektronlarını alır ve zincirdeki bir sonraki taşıyıcıya verir. Protonlar ise mitokondriyal membranlar arası aralığa pompalanır. Böylece mitokondri iç membranı yüzeyleri arasında ortaya çıkan elektriksel potansiyel fark ATP sentezinde kullanılır. Elektronlar sonunda oksijen ve protonlarla birleşerek su oluştururlar. Elektron transport işlemini solunum zinciri yapan bu oksijen gereksinimidir ve vücudun oksijen tüketiminin en büyük bölümü burada gerçekleşir (Champe ve ark. 2007). Elektron transport sistemi ile gerçekleşen ATP üretimi kuşkusuz mitokondri organelinde gerçekleşen en önemli olaydır. Bu aşamada elektronlar, redükte substratlardan solunum zinciri elemanları kompleks I ve II'ye aktarılırken, kompleks III ve IV aracılığıyla oksijene iletilerek su oluştururlar. İntermembraner alana pompalanan protonlar ise ADP ve inorganik fosfattan ATP oluşturmak üzere matrikse gelirler. Ancak bu olaylar zinciri esnasında, elektronlar solunum zincirinden sızarak oksijenle reaksiyona girebilir ve süperoksit oluşturabilir. Ayrıca protonlar da mitokondriyal membranlar arası alandan matrikse sızarak enerjinin ATP olarak tutulmasına engel olabilir. Mitokondriyal süperoksit üretimi, hücrel oksidatif hasarın majör sebebi ve birçok hastalığın patolojisinde altta yatan sebep olarak değerlendirilmektedir. Süperoksit, kendisi radikal karakterli olmanın yanı sıra süperoksit dismutaz (SOD) (mitokondri matriksinde manganez-süperoksit dismutaz; Mn-SOD, sitoplazma da bakır/çinko-süperoksit dismutaz; Cu/Zn-SOD aracılığıyla) enzimi aracılığıyla hidrojen peroksit'e dönüşebilir. Oluşan hidrojen peroksit radikal karakterli değildir. Ancak, Fe ve Cu gibi geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu ile süperoksit varlığında ise Haber-weiss reaksiyonu aracılığıyla son derece radikal karakterli hidroksile dönüşebilir. Hidroksil radikali son derece tehlikeli olup, membranlarda lipid peroksidasyon kaskadını başlatabilir, protein ve DNA gibi diğer hücrel yapılara zarar verebilir (Brand ve ark. 2004).

2.5.2. Mitokondriyal Oksidatif Stres ve Apoptozis İlişkisi

Sitokrom c, apoptozis ve solunumda hayati role sahip bir proteindir. Sağlıklı hücrelerde lokalizasyonu mitokondriyal membranlar arası alanda olan sitokrom c, nükleusta kodlanmakta olup ilk etapta apositokrom c olarak sentezlenmektedir. Daha sonra sitozolden

mitokondriyal membranlar arası alana transloke olarak kendi sentetazı tarafından olgun formu olan holositokrom c'ye dönüştürülmektedir. Çoğunlukla mitokondriyal membranlar arası alanda hareketli eleman olarak bulunan sitokrom c, elektron transport zinciri elemanlarından kompleks III ve IV arasında hayati fonksiyona sahiptir. Geriye kalan kısmı ise sıkı bir şekilde iç mitokondriyal membrana bağlıdır. Membrana bağlı sitokrom c oranı iyi tanımlanmış olmasa da total sitokrom c'nin %15'inden fazlası olduğunu düşündüren kanıtlar bulunmaktadır (Kulikov ve ark. 2012). Bu bağlantıda sitokrom c'nin partneri, elektrostatik ve hidrofobik bağlantılarla etkileştiği iç mitokondriyal membran bileşenlerinden, anyonik fosfolipid, kardiyolipindir (O'Brien ve ark. 2015). Bu etkileşimde, kardiyolipinin sitokrom c'nin iç membrana bağlanmasında bir çapa olarak görev gördüğü ve solunum zincirinde proteini fonksiyonel olarak tuttuğu düşünülmektedir (Gallet ve ark. 1997, Shidoji ve ark. 1999). Sitokrom c'nin mitokondri membranı ve kardiyolipin arasındaki moleküler etkileşimi infrared spektroskopisi (infrared spectroscopy) (Choi ve Swanson 1995), floresans rezonans enerji transferi (fluorescence resonance energy transfer method) (Rytomaa ve Kinnunen 1994), proteaz sindirimi (protease digestion) (de Jongh ve ark. 1995), siklik voltametri (cyclic voltammetry) (Salamon ve Tollin 1997), nükleer manyetik rezonans (nuclear magnetic resonance; NMR) ölçümleri (Spooner ve ark. 1993) ve yüzey plazmon rezonans spektroskopisi (surface plasmon resonance spectroscopy; SPR) gibi birçok yöntemle gösterilmiştir (Salamon ve Tollin 1996).

Kardiyolipin, mitokondri iç zar yapısında bulunan bir gliserofosfolipid formudur (Ademowo ve ark. 2017). Endoplazmik retikulum'da sentezlenen diğer mitokondriyal membran lipitlerinin aksine, sentezi iç mitokondri membranda, mayadan ökaryotlara yüksek derecede korunmuş basamaklarla meydana gelir (Shen ve ark. 2015). Kardiyolipin, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport sistemi elemanlarını stabilize ederek mitokondriyal ATP üretiminin sürdürülmesine büyük katkı sağlar (Tian ve ark. 2012). Bu yapının oksidasyonunun, mitokondriyal membran geçirgenliğindeki artışın ve sitokrom c salınımıyla uyarılan mitokondriyal apoptozis yolağının primer sebebi olduğu düşünülmektedir. Çünkü sitokrom c'nin kardiyolipinle olan etkileşimi, kardiyolipinin okside forma dönüşmesiyle (CL-OOH) bozulmaktadır (Nomura ve ark. 2000).

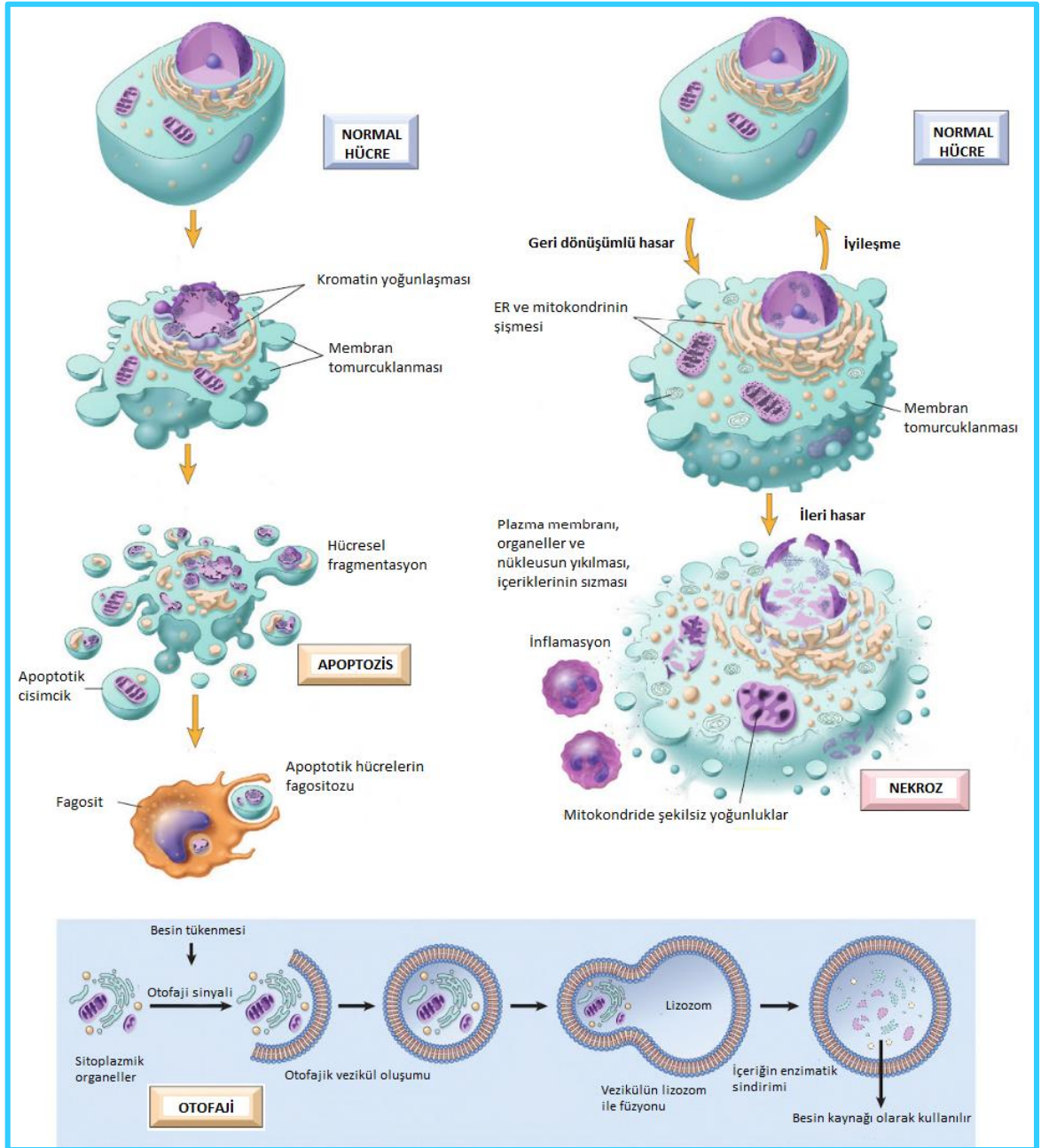
2.6. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü)

Hücre ölümü, apoptozis, nekroz ve otofaji olarak adlandırılan üç temel mekanizma aracılığıyla gerçekleşmektedir (Nikoletopoulou ve ark. 2013).

Apoptozis, Yunancada *apo* (ayrı) ve *ptozis* (düşen) kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşmuş, sonbaharda yaprak dökümü anlamına gelen bir kelimedir. İlk kez Kerr ve ark. (1972) tarafından yapılan deneysel bir çalışma ile gösterilmiş olup, '*fizyolojik hücre ölümü*' ifadesi ile tanımlanmıştır (Kerr ve ark. 1972).

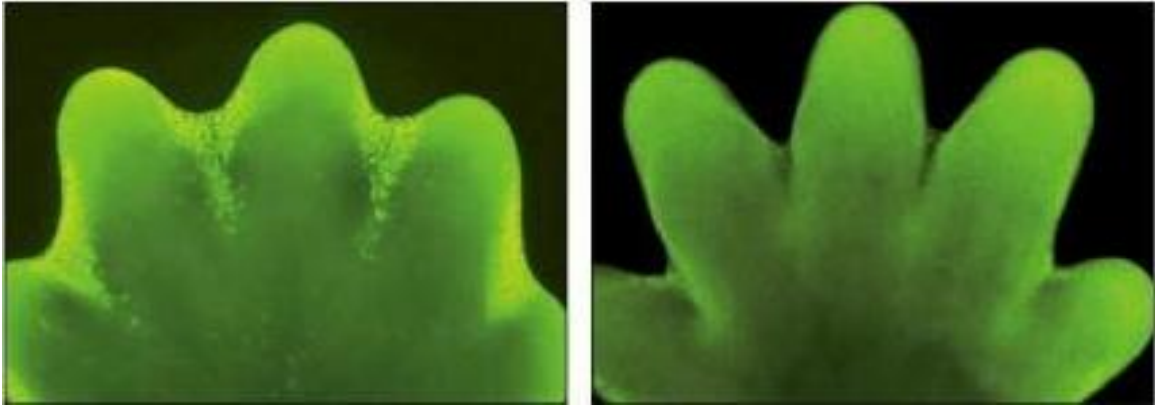
Apoptozis ya da *programlı hücre ölümü*, yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, düzensiz gelişmiş, enfekte veya hasarlı hücreler gibi organizmada artık gereksinim duyulmayan hücrelerin özel mekanizmaların kontrolü altında programlı olarak ölümüdür. Bu genetik program, normal gelişim, doku homeostazının sürdürülmesi ve etkili bir immün sistem için hayati önem taşımaktadır. Bozulmuş apoptotik mekanizma, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklardan kansere kadar birçok patolojik süreçle ilişkilendirilmiştir (Cory ve Adams 2002, Adams 2003, Cory ve ark. 2003, Tait ve Green 2010).

Bir diğer hücre ölüm şekli olan *nekroz*, akut bir hasar sonucu hücrenin şişmesi, patlaması ve içeriğini komşu hücreler üzerine boşaltarak güçlü bir hasarlayıcı yangısal yanıt oluşturması ile karakterizedir. Apoptotik mekanizmayla ölüme giden hücre, nekrozdaki farklı olarak, komşularına zarar vermeden zarif bir şekilde ölür. Hücre büzülür, yoğunlaşır, hücre iskeleti yıkılır, çekirdek zarfı dağılır ve çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır. Ayrıca, ölmekte olan hücrenin içeriğinden herhangi bir sızıntı oluşmadan komşuları veya makrofajlar tarafından hızla fagosite edilebileceği *apoptotik cisim* olarak adlandırılan, hücrenin zarlı küçük yapılara bölündüğü fenotipik özelliklere ulaşır. Dolayısı ile apoptozis, nekrozun zarar verici etkilerini engellemekte ve ölen hücreye ait organik bileşenlerin sindiren hücre tarafından yeniden kullanımını sağlamaktadır (Alberts ve ark. 2008). Otofajik mekanizmada ise apoptozis ve nekrozdaki farklı olarak *otofagozom* ya da *otofajik vezikül* olarak adlandırılan yapının de novo sentezi söz konusudur. Sindirilecek hücresel yapıları çevreleyen otofagozom lizozom organeliyle birleşir ve içerik monomerlerine ayrıştır (Shintani ve Klionsky 2004). Sitolitik protein ve organellerin hücrenin kendisi tarafında fagosite edildiği katabolik bir süreçtir (Wang ve ark. 2018) [**Şekil 2.8; (Kumar ve ark. 2013)**].

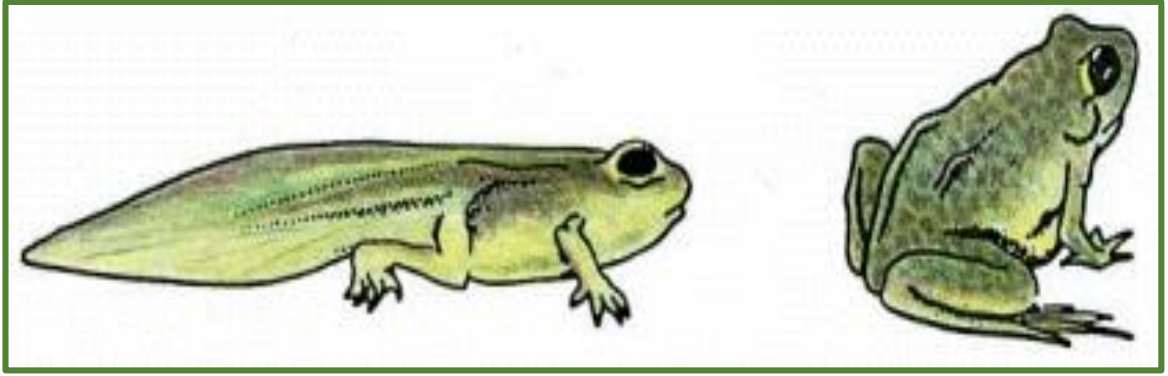


Şekil 2.8. Apoptozis, nekroz ve otofaji mekanizmaları arasındaki morfolojik farklılıklar

Programlı hücre ölümü, gelişim ve farklılaşmayı şekillendirir. Örneğin, el ve ayak parmaklarının oluşumu sırasında, parmaklar arasındaki dokunun ortadan kaldırılması apoptotik mekanizma sayesinde gerçekleşir [Şekil 2.9; (Alberts ve ark. 2008)]. Programlı hücre ölümünün bir diğer iyi tanımlanmış örneği memeli sinir sisteminin gelişimi sırasında gözlenir. Gereğinden fazla üretilen nöronların %50 kadarı programlı hücre ölümü ile elimine edilir. Hayatta kalan nöronlar, hücre yaşam sinyali olan büyüme faktörleri salgılayarak ve nöronal hücre ölüm programını engelleyerek kendi hedef hücreleri ile doğru bağlantılar yapılması için seçilmiş olurlar (Cooper ve Hausman 2016). Sağlıklı erişkin bir insanda her saatte milyarlarca hücre, kemik iliği ya da bağırsakta apoptotik mekanizma ile elimine edilir. Ayrıca gereksinim duyulmayan yapıların ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır. Örneğin, bir kurbağa larvasının, olgun kurbağaya dönüşürken kuyruk kısmındaki hücreler bu mekanizma ile yok edilir [Şekil 2.10; (Alberts ve ark. 2008)]. Erişkin dokularda, hücre ölümü hücre bölünmesini tam olarak dengeler. Eğer öyle olmasaydı doku ya büyüyecek ya da küçülecekti (Alberts ve ark. 2008).



Şekil 2.9. El ve ayak parmaklarının oluşumu sırasında parmaklar arasındaki dokunun apoptotik mekanizmayla ortadan kaldırılması



Şekil 2.10. Kurbağa larvasındaki kuyruk kısmının olgun kurbağaya dönüşüm aşamasında apoptotik mekanizma ile elimine edilmesi

Apoptozisten sorumlu hücre içi mekanizmaların tüm hayvan hücrelerinde benzer olduğu görülmektedir. Omurgalılarda apoptotik yolakta primer etkili olan proteinler **kaspazlardır (caspase)**. Bu proteinler katalitik bölgelerinde önemli görev yapan bir sistein rezidü taşıdıkları (cysteine), seçici olarak hedef proteinleri C-uçlarında bulunan bir **aspartattan** kestikleri ve enzim (-ase) görevi yaptıkları için **caspase** olarak adlandırılmıştır. Prokaspaz olarak sentezlenirler, belirli kısımlarının kesilip uzaklaştırılması sonucunda aktif kaspaz halini alırlar. Kaspazlar bir kez etkinleştikten sonra diğer ön kaspazları etkinleştirerek proteoliz silsilesinin şiddetlenmesine neden olurlar. Etkinleşen kaspazların bazıları hücredeki diğer kilit proteinleri keser. Örneğin bazıları çekirdek laminlerini keserek çekirdek laminasının dönüşümsüz yıkımına neden olur. Bazıları ise DNA yıkıcı bir enzimi etkisiz konumda tutan bir proteini keserek DNAaz'ın serbest kalmasına ve çekirdek içinde DNA'yı kesmesine neden olurlar. Böylece hücre kendini programlı bir şekilde yıkar ve ölü hücre başka hücre tarafından hızla alınıp sindirilir. Bahsi geçen proteaz silsilesi dönüşümsüzdür, apoptotik yolakta hücre bir kez kritik bir noktaya ulaştığı zaman bundan geri dönüş yapamaz. Dolayısıyla programlı hücre ölüm yoluğı ya hep ya hiç prensibine göre çalışmaktadır (Alberts ve ark. 2008).

Apoptotik süreçteki kaspaz aktivasyonunda başlatıcı sinyale bağlı olarak iki temel yolak tanımlanmıştır (Strasser ve ark. 1995, Adams 2003). Bu yollardan ilki **ekstrinsik yolak** olarak adlandırılmakta olup, hücre zarındaki ölüm reseptörlerine (Tümör nekroz faktör; TNF ve FAS) ölüm ligandının (TNF ve FAS) bağlanmasıyla tetiklenir (Strasser ve ark. 2000). Diğer yolak ise yetersiz sitokin desteğı, DNA hasarı ya da oksidatif hasar gibi

hücre içi bir stres durumu ile tetiklenen *intrinsik* ya da *mitokondriyal yolaktır* (Adams 2003).

Dış mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulması ökaryotik hücrelerdeki apoptotik sürecin kritik aşamalarındandır (Wang 2001, Adams 2003). Dış mitokondriyal membran aynı zamanda intrinsik ve ekstrinsik yolakların kavşağı olup, B-cell leukemia/lymphoma-2 (Bcl-2) ailesi proteinlerin protein-protein ya da protein-membran etkileşimleriyle apoptozisin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı kritik bir noktadır (Leber ve ark. 2010, Shamas-Din ve ark. 2013). Bcl-2 protein ailesi apoptotik sürecin merkezinde yer almakta, pro-apoptotik ve anti-apoptotik etkiye sahip (Lovell ve ark. 2008) 30 üyeden oluşmaktadır (Kalkavan ve Green 2018). Kaspaz aktivasyonunun ana düzenleyicileri olan Bcl-2 protein ailesi, hücrenin yaşamasına ya da ölmesine karar veren hakemler gibidir (Cory ve Adams 2002). Fonksiyonları ve yapılarında korunmuş Bcl-2 homoloji bölgesi (Bcl-2 homology (BH) regions) bulundurmalarına göre genel olarak üç gruba ayrılmaktadırlar (Kvansakul ve ark. 2008, Hardwick ve Youle 2009, Shamas-Din ve ark. 2013). Bu bölge(ler), proteinin fonksiyonunun belirlenmesinde kritik olan Bcl-2 aile üyeleri arasındaki etkileşime aracılık eder (Lovell ve ark. 2008). Pro-apoptotik fonksiyona sahip olanlar, homoloji bölgelerden 4'ünü (BH1, BH2, BH3 ve BH4) içerenler (Bax; Bcl-2- associated X protein ve Bak; Bcl-2 antagonist or killer gibi) ve sadece birini (BH3) içerenler (Bid, Bad, Noxa, Puma ve Bim gibi) olmak üzere grupların ilk ikisini oluşturmaktadır (Kvansakul ve ark. 2008, Hardwick ve Youle 2009, Shamas-Din ve ark. 2013).

Multi homoloji bölge bulunduran aile üyelerinden olan Bax ve Bak, dış mitokondriyal membranda oligomerleşmelerine ve nihayetinde dış mitokondriyal membran geçirgenliğine aracılık eden kompleks yapısal değişimler geçirirler. Bu olay neticesinde, mitokondride membranlar arası alanda bulunan sitokrom-c ve smac/diablo (Smac; second mitochondria-derived activator of caspase) gibi apoptotik faktörlerin sitoplâzmaya salınmasına aracılık ederler (Wei ve ark. 2001, Annis ve ark. 2005, Shamas-Din ve ark. 2013). Bahsi geçen yapısal değişimler, Bax ve Bak proteinlerinin pro-apoptotik aktivitelerini indükleyen ve bu nedenle aktivatörler olarak adlandırılan BH3 proteinlerinden tBid, Bim ve Puma tarafından başlatılır (Wei ve ark. 2000, Kim ve ark. 2009, Shamas-Din ve ark. 2013). Üçüncü grup ise, yapısında homoloji bölgelerinden 4'ünü içeren Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik fonksiyona sahip proteinleri içermektedir. Bu proteinler etkilerini pro-apoptotik etkiye sahip proteinlere bağlanarak gösterirler. Bad ve Noxa ise duyarlaştırıcı BH3 proteini

(sensitizer BH3 proteins) olarak bilinmektedir. Bu proteinler Bcl-2 ve Bcl-xL'a bağlanmak için yarışır. Böylece anti-apoptotik proteinlerin tBid ve Bim gibi aktivatör proteinlere bağlanmasına engel olarak Bax/Bak aktivasyonuna katkıda bulunurlar (Lovell ve ark. 2008, Shamas-Din ve ark. 2013).

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik özelliğe sahip Bcl-2 aile üyelerinin membrana bağlanmaları yapısal olarak yeniden düzenlenmelerini tetiklemektedir. Bu yapısal değişiklikler, partnerlerine olan bağlanma affinitelerini ve dolayısıyla apoptozisteki rollerini değiştirmektedir (Yethon ve ark. 2003, Kim ve ark. 2004, Annis ve ark. 2005, Dlugosz ve ark. 2006, Peng ve ark. 2006).

2.6.1. İnterinsik/Mitokondriyal Yolak

İnterinsik ya da mitokondriyal apoptotik yolak omurgalılarıdaki en yaygın apoptotik mekanizmadır. DNA hasarı, büyüme faktör yoksunluğu, endoplazmik retikulum stresi ve ROS birikimi gibi hücrel stres faktörlerine cevap olarak aktifleşmektedir (Green ve Llambi 2015).

Mitokondri aracılı apoptoziste kritik aşama mitokondriyal membranlar arası alanda bulunan sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasıdır (Ow ve ark. 2008). Bu süreç, dış mitokondriyal membranda oligomerleşerek geçirgenliğe katkı sunan pro-apoptotik proteinlerin (Bcl-2-associated X protein; Bax ve Bcl-2 antagonist or killer; Bak) oluşturmuş olduğu porlar aracılığıyla gerçekleşir. Salınan sitokrom c sitoplazmada bulunan apoptozis proteaz aktive edici faktör (apoptotic protease activating factor; Apaf-1) monomerlerine bağlanarak bu monomerlerin oligomerleşmesine ve tekerlek benzeri heptamerik dATP bağımlı bir sinyal platformu haline dönüşmesine neden olur (Li ve ark. 1997, Tait ve Green 2010). Ayrıca, Apaf-1 N-terminal kaspaz bağlayıcı domainleri (N-terminal caspase recruitment domains; CARD) ortaya çıkacak şekilde yapısal olarak değişime uğrar. **Apoptozom (ölüm tekerleği)** olarak adlandırılan bu aktif kompleks yapıya daha sonra pro formdaki başlatıcı kaspazlardan kaspaz-9 dahil olur. Yapıya katılarak dimerize olan kaspaz-9 artık aktiftir (Li ve ark. 2017). Aktif kaspaz-9'un hedefi, sonlandırıcı kaspazlardan, kaspaz-3 ve kaspaz-7'dir. Pro formdaki bu kaspazlar, aktif kaspaz-9 tarafından kesilerek aktif forma dönüştürülmektedir (Green ve Llambi 2015) [**Şekil 2.11; (Tait ve Green 2010)**].

2.6.2. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik yolak, hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerine [TNF reseptör süper ailesinden (Tumor necrosis factor receptor superfamily) Tümör nekroz faktör reseptörü 1 (Tumor necrosis factor receptor 1; TNFR1), TNF-ilişkili apoptozis uyarıcı ligand (TNF-related apoptosis-inducing ligand; TRAIL) ve Fas (Apo-1 ya da CD95 olarak da bilinir) reseptörleri] kendi ligandlarının (TNF ligand, FASL/CD95L ve TRAIL) bağlanmasıyla başlatılmaktadır (Dickens ve ark. 2012). Bu bağlantı sitoplazmada bulunan inaktif formdaki başlatıcı kaspazlardan kaspaz-8 ya da kaspaz-10'un adaptör bir protein aracılığıyla (Fas-associated death domain; FADD) reseptör-ligand kompleksine dahil olmasına neden olur. Oluşan bu kompleks **ölüm uyarıcı sinyal kompleksi** (death-inducing signaling complex; DISC) olarak adlandırılır. Bu yapıya dahil olan kaspaz-8 ya da 10 dimerizasyon ve otoaktivasyon neticesinde aktif forma ulaşır. Aktifleşen başlatıcı kaspaz, kaspaz-8/10, sonlandırıcı kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi keserek aktifleştirir. Bu şekilde ekstrinsik yolak üzerinden direkt kaspaz kaskadının aktifleştirilmesiyle apoptozise giden hücreler Tip 1 hücreler (T lenfositler gibi) olarak adlandırılır. Ancak, dış mitokondriyal membran geçirgenliğinden bağımsız olarak gerçekleşen bu ekstrinsik yolak, her zaman hücre ölümünü tetiklemek için yeterli olmaz (Jost ve ark. 2009, Kalkavan ve Green 2018). Bazı durumlarda, aktifleşen kaspaz-8, pro-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üyelerinden kısaca Bid olarak bilinen, Bcl-2 homoloji 3 (BH3) ile etkileşen domaine sahip ölüm antagonistini [BCL-2 homology 3 (BH3)-interacting domain death agonist; BID, a BH3 domain-only protein)] (Tait ve Green 2010), keserek onu tBid (truncated) formuna dönüştürür. tBid, Bax ve Bak'ı aktifleştirerek dış mitokondriyal membran geçirgenliğini uyarılmış olur. Bu aşamadan sonraki olaylar zinciri intrinsik yolakta olduğu şekilde devam eder ve hücre ölümü gerçekleşir [**Şekil 2.11; (Tait ve Green 2010)**]. Bu ekstrinsik yolak üzerinden apoptozise giden hücreler ise Tip 2 hücreler (hepatositler ve pankreatik hücreler gibi) olarak adlandırılmaktadır (Jost ve ark. 2009, Kalkavan ve Green 2018). Nitekim Yin ve ark (1999) yapmış oldukları çalışmada yabancı tip farelerde Fas ligandı enjeksiyonu neticesinde apoptozisin uyarıldığını, Bid eksikliği oluşturulan grupta ise apoptozise direnç oluştuğunu rapor ettiler (Yin ve ark. 1999).

Dış mitokondriyal membran geçirgenliğini mitokondriyal membranlar arası alan proteinlerinden sitokrom c ve SMAC'ın eş zamanlı olarak sitoplazmaya salınmasına neden olur. SMAC, kaspaz-3 ve kaspaz-7 inhibitörü sitozolik X-bağlı apoptozis protein inhibitörü (X-linked inhibitor of apoptosis protein; XIAP) proteini ve diğer IAP (inhibitor of apoptosis

protein) proteinlerini nötralize etmektedir. SMAC'ın IAP'lar üzerindeki inhibitör etkisi, yapısındaki N-terminal AVPI motifinin BIR2 ve BIR3 domainleriyle etkileşime girmesiyle gerçekleşir. OMI/HtrA2 (48KdA) SMAC'a benzer şekilde IAP'ların nötralizasyonu ile ilişkili bir diğer mitokondriyal membranlar arası alan proteindir. Ancak ne SMAC ne de OMI'nin eksiklikleri apoptozisi engellememektedir. Endonükleaz G ve apoptozis indükleyici faktör (AIF) gibi diğer mitokondriyal membranlar arası alan proteinleri de dış mitokondriyal membran geçirgenliği neticesinde sitoplazmaya salınırlar. Ancak bunların kaspaz bağımsız hücre ölümüyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Kalkavan ve Green 2018).

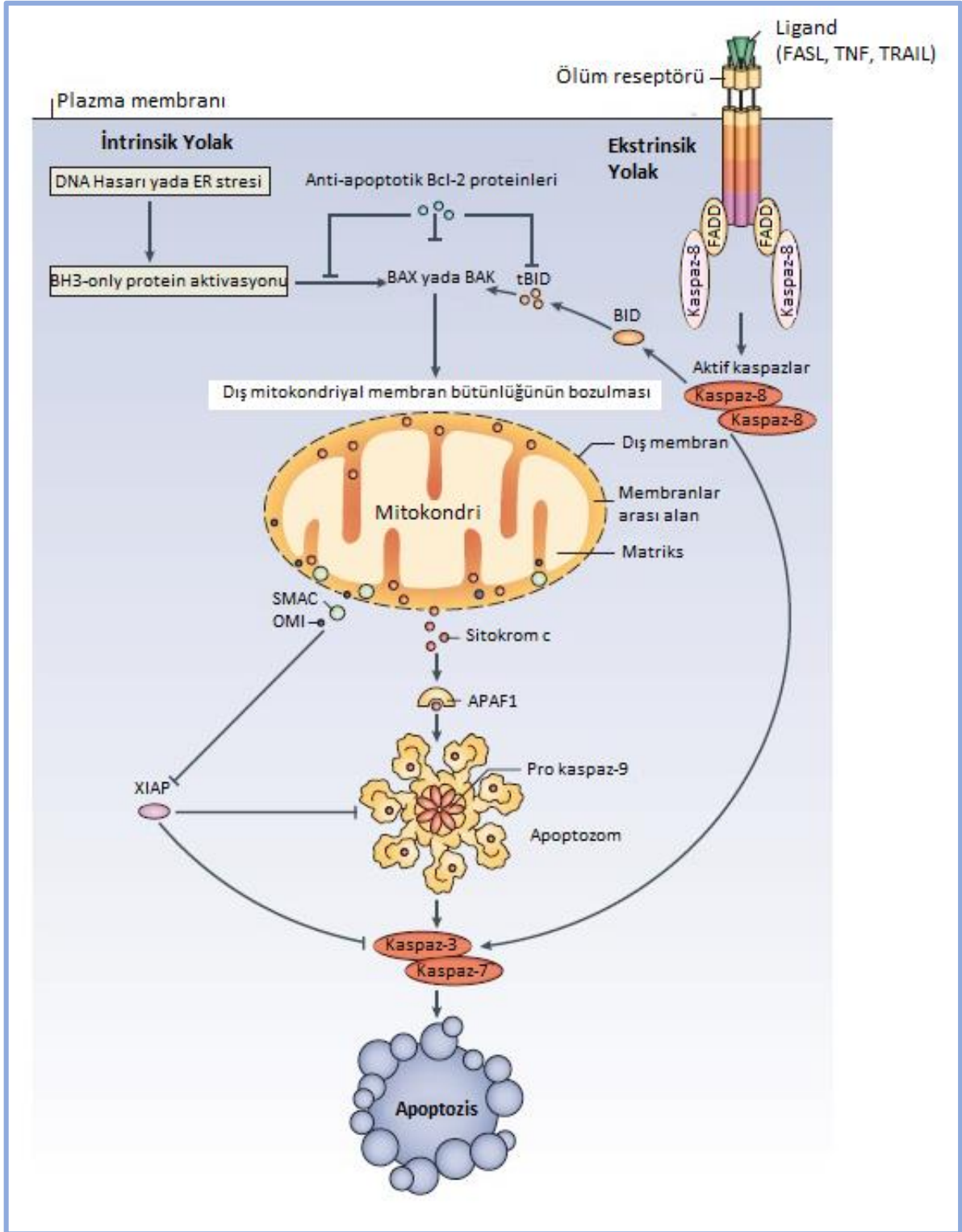
2.7. p53 Proteini, Hücre Döngüsü ve Apoptozis Yolağıyla İlişkisi

p53, 393 aminoasitten oluşan bir proteindir (Koçak ve ark. 2011). 17. kromozomun kısa kolu üzerinde yaklaşık 20 kilobaz'lık bir alana yayılmış 11 ekzondan oluşan bir gen tarafından kodlanır. Bu gen *Tumor protein 53 (TP53)* olarak isimlendirilmektedir (Varley ve ark. 1997, Koçak ve ark. 2011). p53 proteini, hücre döngüsünün kontrol edilmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma, programlı hücre ölümü, DNA tamiri ve genomik kararlılığın sağlanması gibi birçok hücreyel olayda rol almaktadır (Harris 1996). p53 bu işlevlerini ya transkripsiyon faktörü olarak ilgili genlerin transkripsiyonlarını düzenleyerek, ya da diğer proteinler ile veya doğrudan DNA ile fiziksel olarak etkileşerek gerçekleştirmektedir (Koçak ve ark. 2011). p53 proteini, hücrenin yaşaması ya da ölmesi ile ilişkili yollarda merkezi konumda bulunmakta olup, hücrenin mevcut durumuna göre yaşamasına ya da ölmesine karar vermektedir (Velculescu ve El-Deiry 1996). Hücrede gerçekleşen hasara bağlı olarak p53 proteini kararlı hale gelir, hücre döngüsünü durdurur. Böylelikle hücrede hasarın tamirine imkân sağlar. Hasarın hücrenin tamir kapasitesini aştığı durumlarda ise hücreyi apoptozise yönlendirir (Koçak ve ark. 2011).

p53 proteini hücreyel hasar durumunda bir transkripsiyon faktörü olarak DNA'ya bağlanır ve p21 (WAF2/Cip1) protein gen ekspresyon seviyesini uyarır. p21 proteini, hücre döngüsünün G0/G1 evresinde görev alan siklin bağımlı kinazların işlevini engelleyerek hücre döngüsünü G1 aşamasında durdurur (Harris 1996). Eğer hasar giderilemezse, p53 proteini BCL-2 interacting killer (Bik) proteinini indükleyerek hücreyi apoptozise yönlendirir (Mates ve ark. 2008).

Bik proteini, Bcl-2 protein ailesinin, pro-apoptotik etkiye sahip, sadece BH-3 homoloji bölgesini içeren üyelerinden biridir (Willis ve Adams 2005, Chinnadurai ve ark. 2008). Hücrelerde genotoksik stres ve p53 overekspresyonu gibi stres durumlarına cevaben uyarılır (Mathai ve ark. 2005). Bik proteininin p53 aracılığıyla indüklenmesi, mitokondriyal apoptotik yolağın ileri aşamaları için önem arz etmektedir. Aktifleşen bik, sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasına ve nihayetinde kaspaz-3 aktivasyonu ile sonuçlanan intrinsik yolağın aktifleşmesine aracılık etmektedir (Mates ve ark. 2008).





Şekil 2.11. İntrensik ve ekstrinsik apoptotik yollar

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Hücre Hattı

Çalışmada, insan bronşiyal epitel hücre hattı (BEAS-2B) kullanıldı. Hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edildi.

3.2.Ticari Kitler

Çalışmada protein ölçümü, RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real-Time PCR aşamaları ticari kit aracılığıyla gerçekleştirildi. Çalışmamızda kullanılan ticari kitler **Çizelge 3.1.**'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Ticari kitler

Ticari Kitin Adı	Markası
Pierce BCA (Bicinchoninic acid) Protein Assay Kit	Thermo
miRNeasy Mini Kit	Qiagen
RT ² HT First Strand Kit	Qiagen
RT ² SYBR Green qPCR Mastermix	Qiagen

3.3.Kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler **Çizelge 3.2.**'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kimyasallar

Kimyasal Adı	Markası
Hydrogen peroxide solution (H ₂ O ₂)	Sigma
Hydrochloric acid (HCL)	Sigma
Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O)	Merck
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma
Acetic Acid	Merck
2-Thiobarbituric acid	Merck
1-Butanol	Merck
Pyridine	Merck
1, 1, 3, 3 - Tetraethoxypropane	Sigma
Trypan blue solution	Sigma
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, (MTT)]	Sigma
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
RPMI Medium 1640 (1X)	Gibco
Dulbecco Modified Eagle Medium (1X) (DMEM)	Gibco
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
Penicillin/Streptomycin (10.000 Units/ml penicillin) (10.000 µg/ml streptomycin)	Gibco
Keratinocyte-SFM (1X)	Gibco
Supplements for Keratinocyte-SFM EGF Human Recombinant Bovine Pituitary Extract	Gibco
Hank's Balanced Salt Solution (1X) (HBSS)	Gibco
Trypsin-EDTA (1X) (%0.25)	Gibco

3.4.Kullanılan Cihazlar

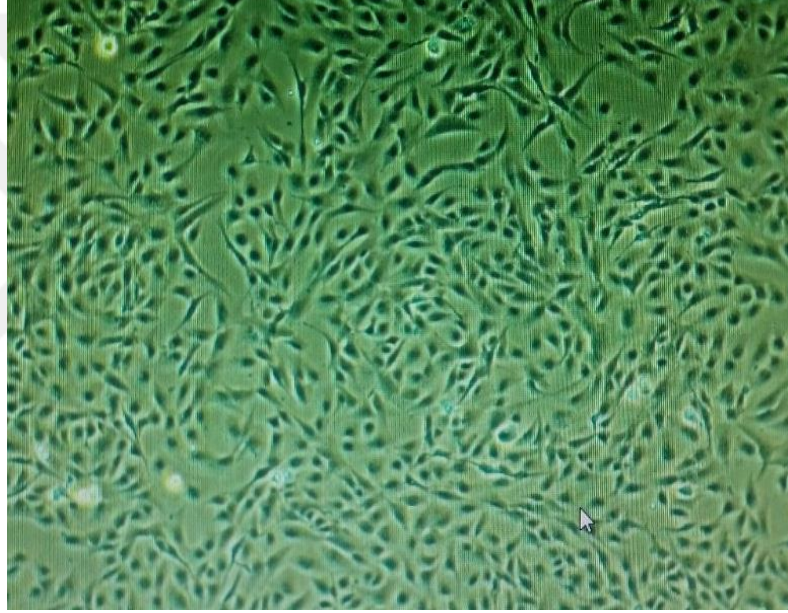
Çalışmamızda kullanılan cihazlar **Çizelge 3.3.**'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Marka&Model
Karbondioksit İnkübatör	Thermo, HeraCell 150i
Sınıf II Biyogüvenlik Kabini	Thermo, HeraSafe KS Class II
Işık Mikroskobu	Novel, N-120
Inverted Mikroskop	Nikon, Eclipse TS100
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Universal 320R
Ultrasonik Homojenizatör	Elma, Elmasonic S 40
Su Banyosu	Stuart, SWBD
-20°C Derin Dondurucu	Bosh
+4°C Derin Dondurucu	Bosh
Hassas Terazi	OHAUS, Pioneer PA214C
Spektrofotometre	Thermo, Multiskan Go
Boncuklu Homojenizatör	Qiagen, TissueLyser LT
Soğutmalı Santrifüj	Sigma, 3-30K
Manyetik Isıtıcı	Heidolph, MR Hei-Standard
-80°C Derin Dondurucu	DAIHAN, SimpleFreez U500
Vorteks	VELP Scientifica, Classic
pH Metre	HANNA Instruments, HI 2211 pH/ORP Meter
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter, Microfuge 20R
Thermal cycler	Bio-Rad, T100
Mikrosantrifüj	DAIHAN, Centrifuge CF-5
Real-time PCR cycler	Qiagen, Rotor Gene Q
Otoklav	DAIHAN, MaXterile 47
Saf su cihazı	Merck, Millipore Direct-Q® 3UV

3.5.Hücre Kültürü

BEAS-2B hücreleri (**Şekil 3.1**), EGF Human Recombinant ve Bovine Pituitary Extract içeren vasatta (Keratinocyte-SFM) %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C koşulları sağlayan inkübatörde (Thermo, HeraCell 150i) üretildi. Kültür vasatı haftada iki kez değiştirildi ve hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında deneylerde kullanıldı. Hücre pasajlarının devam ettirilmesi işleminde %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco Modified Eagle Medium (1X) (DMEM) kullanıldı.



Şekil 3.1. BEAS-2B hücre hattı

3.6.Hücre Sayımı

Uygun koşullarda kültüre edilen hücrelerin sayımında Tripan mavisi boyası testi uygulandı. Buna göre, 50 mikrolitre (μ l) hücre ile 50 μ l boya karıştırılarak, ışık mikroskobu (Novel, N-120) altında hücrelerin canlılıkları ve sayıları Thoma lamı (**Şekil 3.2**) kullanılarak değerlendirildi. Thoma lamında bulunan 4x4'lük karelerden oluşmuş iki alandaki hücreler sayıldı. Tripan mavisi boyası testi gereğince boyayı içine alıp mavi renkte boyanan hücreler ölü, boyayı içine almayanlar ise canlı olarak değerlendirildi. İki farklı alanda sayılan canlı

hücre toplamının ortalaması alındı. Çıkan sayı dilüsyon faktörü ile çarpılarak Thoma lamı'nın hacmine (1mm × 1mm × 0,1mm) bölündü. Böylelikle 1 ml başına düşen canlı hücre sayısı hesaplandı. Bu sayı 1 ml'de ekilmek istenen hücre sayısına bölünerek yeni dilüsyon faktörü elde edildi. İstenen total solüsyon hacmi yeni dilüsyon faktörüne bölünerek ana stoktan alınması gereken hücre miktarı hesaplandı.



Şekil 3.2. Thoma lamı

3.7.Hücre Canlılığı Analizi

BEAS-2B hücreleri, 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına (Thermo) 50.000 hücre/ml olacak şekilde ve hücre tipine uygun besiyeri (Keratinocyte-SFM 1X) içerisinde ekildi. Hücreler kuyucukların tabanını %70-80 oranında kapladıktan sonra serumsuz vasatta 24 saat inkübe edildi. Daha sonra aynı vasatla hazırlanan farklı dozlarda (0-500 µM) H₂O₂'ye farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) maruz bırakıldı. İnkübasyon sonunda, hücrelerin canlılığı, sarı renkli tetrazol boya 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide'in (MTT) metabolik aktivitenin bir göstergesi olan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) bağımlı oksidoredüktazlar aracılığıyla mor renkli formazana indirgenmesi esasına dayanan ve bu şekilde canlı hücre sayısını yansıtan yöntem ile değerlendirildi. Kültür kaplarının tabanına yapışık olarak kalan hücreler 1 mg/ml MTT (RPMI Medium 1640 (1X) içinde çözdürülmüş) ile 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda MTT uzaklaştırıldı ve oluşan formazan'ın çözünebilmesi için hücreler dimethyl sulfoxide (DMSO) ile muamele edildi. Renk değişimi spektrofotometre (Thermo, Multiskan GO) aracılığıyla, 595 ve 670 nanometre (nm) dalga boylarında ölçülerek, iki dalga boyu arasındaki absorbans farkı alındı (Mosmann 1983).

3.8.Biyokimyasal Analizler

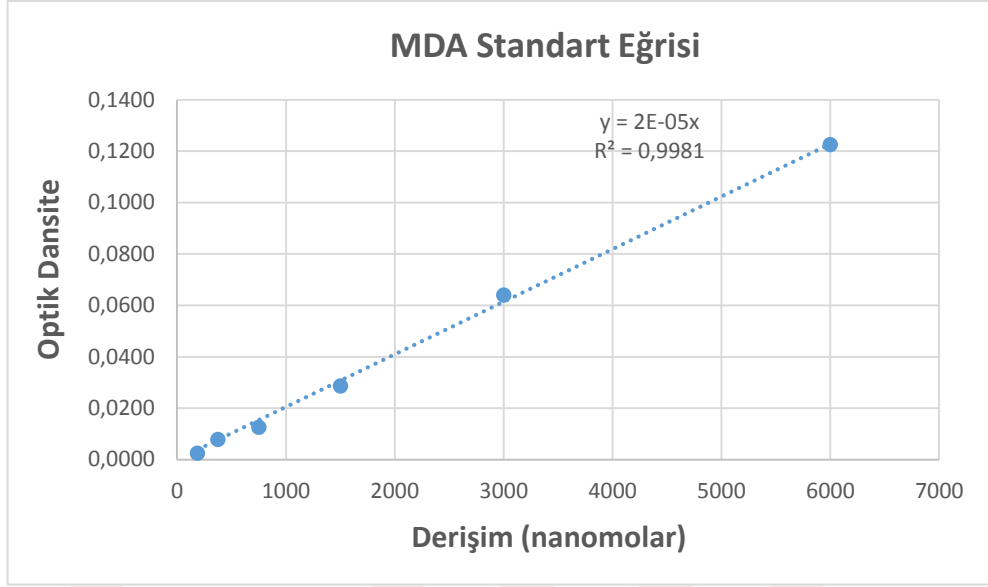
3.8.1.Malondialdehit (MDA) Analizi

Malondialdehit (MDA) analizi için BEAS-2B hücre lizatı kullanıldı. Hücreler flask tabanından hücre kazıyıcı ile kazandıktan sonra Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) içerisinde deneyler yapılincaya kadar -80°C 'de saklandı. Homojenizasyon işlemi mekanik olarak homojenizatör (Qiagen, TissueLyser LT) aracılığıyla gerçekleştirildi. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, aerobik şartlarda pH: 3.5'ta tiyobarbitürik asit ile 95°C 'de inkübasyonu sonucunda pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile MDA miktarı saptanır. Yöntemde %8,1 sodyum dodesil sülfat, %20 asetik asit (AcH) ve %0,8 tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltileri ile muamele edilen örnek numuneleri 95°C 'de inkübe edilip soğumaya bırakıldı. Daha sonra, n-bütanol/pridin çözeltisi eklenen örnek tüpleri, 4000 rpm'de santrifüj edilerek üst fazın absorbansı spektrofotometre aracılığıyla (Thermo, Multiskan Go) 532 nm'de ölçüldü.

Standart grafiği çizilerek MDA miktarı önce nanomol (nmol) cinsinden belirlendi. Daha sonra her bir örnekteki protein miktarı ölçülerek MDA miktarı nmol/mg protein cinsinden hesaplandı (Jain 1986).

3.8.2.MDA Standart Eğrisi

MDA standart eğrisi oluşturmak için 1, 1, 3, 3 - Tetraethoxypropane uygun miktarda dilüe edilerek 6000, 3000, 1500, 750, 375 ve 187,5 nanomolar konsantrasyonlarındaki standart çözeltileri hazırlandı. Her bir standart çözeltilinin absorbans değeri 532 nm'de ölçülerek standart eğrisi oluşturuldu (**Şekil 3.3**).



Şekil 3.3. MDA standart eğrisi

3.8.3.Katalaz Analizi

Katalaz analizi için BEAS-2B hücre lizatı kullanıldı. Hücreler flask tabanından hücre kazıyıcı ile kazandıktan sonra HBSS içerisinde deneyler yapılmaya kadar -80°C 'de saklandı. Homojenizasyon işlemi mekanik olarak homojenizatör (Qiagen, TissueLyser LT) aracılığıyla gerçekleştirildi. Enzimatik aktivite tayini, H_2O_2 'nin 240 nm'deki absorbansının, enzim ile etkileşmesi sonucu zamanla azalmasına bağlı olarak spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanan yöntem ile değerlendirildi. Yöntemde, uygun derişim ve pH'deki tampon içinde (50 mmol/lit fosfat tamponu, pH: 7,5) 10 mM H_2O_2 olacak şekilde substrat çözeltisi hazırlandı. Test edilecek 0,1 ml enzim çözeltisi üzerine 2,5 ml substrat çözeltisi eklendi. Reaksiyonu durdurmak için iki dakika sonunda ortama 0,5 ml 1 M HCl çözeltisi ilave edildi. Kör olarak 2,5 ml fosfat tamponu (50 mmol/lit, pH: 7,5) ve 0,5 ml 1 M HCl içeren çözelti kullanıldı. H_2O_2 'nin başlangıçtaki absorbansını belirlemek için; 2,5 ml substrat ve 0,5 ml 1 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçüldü. Proteinin neden olacağı absorbansı belirlemek için ise 0,1 ml enzim çözeltisi, 2,5 ml fosfat tamponu ve 0,5 ml 1 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçüldü. Bütün absorbans ölçümleri 240 nm'de gerçekleştirildi (Thermo, Multiskan Go) (Aebi ve ark. 1974, Aebi 1984, Lartillot ve ark. 1988).

Enzimin net absorbansı (A) aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$A = (A_s + A_t) - A_r$$

A_s: H₂O₂'nin başlangıçtaki absorbansı

A_t: Proteinin neden olacağı absorbans

A_r: Reaksiyon tüpünün absorbansı

Enzim aktivitesinin IU/ml cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$Akt = A \times V_t / \epsilon \times t \times V_e$$

Akt: Enzim aktivitesi (IU/ml)

V_t: Toplam reaksiyon hacmi (ml)

V_e: Kullanılan enzim çözeltisinin hacmi (ml)

ε: H₂O₂'nin molar ekstinksiyon katsayısı (0,0396 cm²/μmol)

t: Reaksiyon süresi (dakika)

Her bir örnekteki protein miktarı ölçülerek enzim aktivitesi IU/mg protein olarak hesaplandı.

3.8.4.Total Protein Ölçümü

Biyokimyasal analizlerde (Katalaz enzim aktivitesi ve MDA düzeyi) normalizasyon hesaplamaları için total protein ölçümü ticari kit (Thermo; Pierce BCA (*Bicinchoninic acid*) Protein Assay Kit, Catalog number:23225) kullanılarak yapıldı.

Kit içeriği

BCA Reagent A, 2×500 ml

BCA Reagent B, 25 ml

Albumin Standard Ampules, 2 mg/ml, 10×1 ml

Protokol

- 1- İlk olarak BCA Reagent A/BCA Reagent B 50/1 oranında olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanarak karıştırıldı ve BCA Working Reagent solüsyonu hazırlandı.
- 2- Aşağıdaki tabloda verilen hacimlere uygun olarak standart solüsyonları hazırlandı.

Standart tüpleri	Dilüent hacmi (µl)	BSA (Bovine serum albumin) kaynağı ve hacmi (µl)	Final BSA konsantrasyonu (µg/ml)
A	0	Stoktan 300	2000
B	125	Stoktan 375	1500
C	325	Stoktan 325	1000
D	175	B tüpünden 175	750
E	325	C tüpünden 325	500
F	325	E tüpünden 325	250
G	325	F tüpünden 325	125
H	400	G tüpünden 100	25
I	400	0=Blank	0=Blank

- 3- Hazırlanan standart solüsyonları duplike olarak her mikrolaka (mikroplate) kuyusuna 25 µl olacak şekilde pipetlendi.
- 4- Daha sonra protein konsantrasyonu bilinmeyen örnekler her kuyuya 25 µl olacak şekilde pipetlendi.
- 5- Her kuyuya 200 µl BCA Working Reagent solüsyonu pipetlendi ve mikrolaka 30 saniye boyunca yavaşça çalkalandı.
- 6- Mikrolaka'nın üzeri kapatıldı ve 30 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi (Thermo, HeraCell 150i).
- 7- Mikrolaka'nın ısı oda ısısına ulaştığında 562 nm'de spektrofotometrik ölçüm (Thermo, Multiskan Go) yapıldı.

3.9.RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

RNA izolasyonu için hücreler flask tabanından Tripsin-EDTA (1X) (% 0,25) ile kaldırılarak toplandı. RNA izolasyonu (Qiagen; miRNeasy Mini Kit, Catalog number: 217004) ve cDNA sentez (Qiagen; RT2 HT First Strand Kit, Catalog number: 330411) aşamaları ticari kit aracılığıyla yapıldı.

3.9.1.RNA İzolasyonu

Kit içeriği

RNeasy® Mini Spin Columns
Collection Tubes (1,5 ml)
Collection Tubes (2 ml)
QIAzol ® Lysis Reagent* 50 ml
Buffer RWT*† 15 ml
Buffer RPE‡ 11 ml
RNase-Free Water 10 ml

Protokol

- 1- Hasat edilen hücrelerin üzerine 700 µl QIAzol Lysis Reagent pipetlendi ve iyice pipetaj yapıldı.
- 2- Homojenat 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 3- 140 µl kloroform eklenerek tüpün ağzı kapatıldı ve 15 saniye boyunca hızlıca çalkalandı.
- 4- Tüpler 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 5- Tüpler 15 dakika boyunca 12.000*g'de santrifüj edildi.
- 6- Üst fazlar yeni collection tüplere alındı, tüpteki sıvı hacminin 1,5 katı kadar %100 etil alkol pipetlenerek pipetaj yapıldı.

- 7- 700 µl hacimde örnek solüsyonu 2 ml'lik collection tüpler içindeki yeni RNeasy® Mini Spin Column tüplere aktarıldı. Tüplerin ağzı kapatılarak oda sıcaklığında $\geq 8000 \times g$ 'de 15 saniye boyunca santrifüj edildi.
- 8- RNeasy® Mini Spin Column tüplerinin içine 700 µl Buffer RWT pipetlendi. Tüplerin kapakları kapatıldı ve $\geq 8000 \times g$ 'de 15 saniye boyunca santrifüj edildi.
- 9- RNeasy® Mini Spin Column tüplerinin içine 500 µl Buffer RPE pipetlendi. Tüplerin kapakları kapatıldı ve $\geq 8000 \times g$ 'de 15 saniye boyunca santrifüj edildi.
- 10- RNeasy® Mini Spin Column tüplerinin içine 500 µl Buffer RPE pipetlendi. Tüplerin kapakları kapatıldı ve $\geq 8000 \times g$ 'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi.
- 11- RNeasy® Mini Spin Column tüpleri yeni 2 ml'lik collection tüplere transfer edildi. Tüpler 1 dakika boyunca yüksek devirde santrifüj edildi.
- 12- RNeasy® Mini Spin Column tüpleri yeni 1,5 ml'lik collection tüplere transfer edildi. Tüplerin doğrudan membranları üzerine 30-50 µl RNase-Free Water pipetlendi. Tüpler kapatıldı, $\geq 8000 \times g$ 'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.

3.9.2.cDNA Sentezi

Kit içeriği

Buffer GE2 (gDNA elimination buffer), 80 µl

BC5 Reverse Transcriptase Mix, 80 µl

Protokol

- 1- 6 µl BC5 Reverse Transcriptase Mix solüsyonu konan tüplerin her birine 10 µl kendi RNA örneği pipetlendi.
- 2- Her tüpe 4 µl RNase-Free Water pipetlendi.
- 3- Tüpler kapatıldı, aşağıda verilen koşullarda inkübe edildi (Bio-Rad, T100).

42°C	15 dakika
95°C	5 dakika
4°C	∞

- 4- İnkübasyon sonrası her tüpe 90 µl RNase-Free Water pipetlendi. Örnekler kullanılmaya kadar uygun koşullarda saklandı.

3.10.Real-Time PCR

Bu aşamada ticari kit ile elde edilen cDNA örnekleri kullanıldı. Real-Time PCR deneyleri ticari kit (Qiagen; RT2 SYBR Green qPCR Mastermix, Catalog Number: 330501) ve ticari olarak satın alınan primer'ler (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirildi. Deney sonuçları kat değişimi (Fold-change) olarak verildi.

Kit içeriği

HotStart DNA Taq Polymerase
PCR Buffer
dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
SYBR Green dye

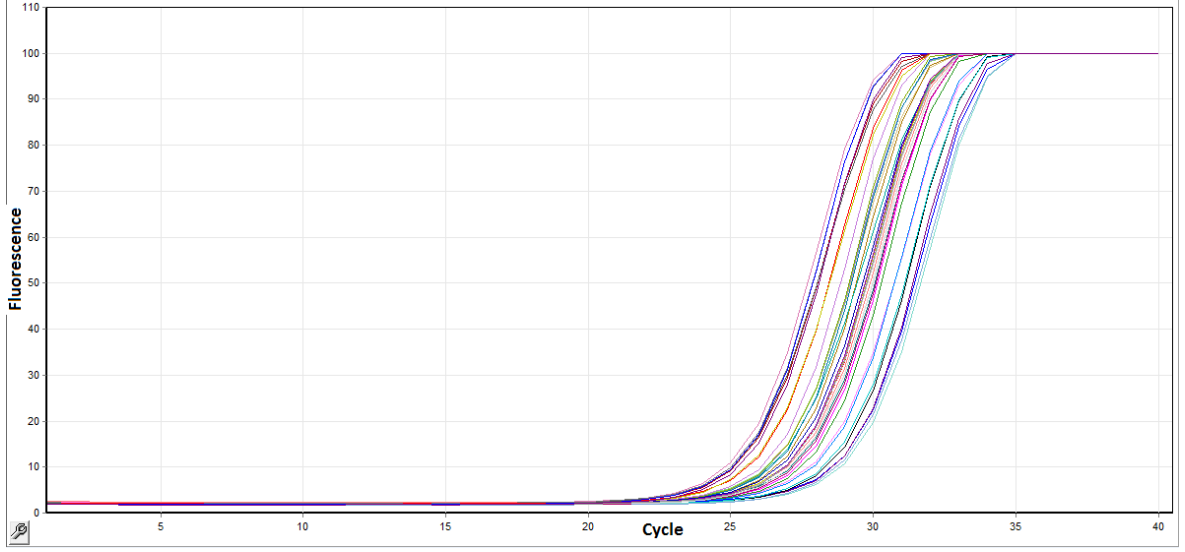
Protokol

- 1- Her örnek için, 7,5 µl SYBR Green qPCR Mastermix, 0,6 µl primer, 3,9 µl RNase-Free Water ve 3 µl cDNA konan tüplerin ağzı kapatıldı.
- 2- Tüpler cihaza yerleştirilerek (Qiagen, Rotor Gene Q) uygun protokol başlatıldı.

Real-Time PCR reaksiyon döngüleri **Çizelge 3.4**'te, reaksiyon sonucu elde edilen amplifikasyon eğrileri **Şekil 3.4**'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Real-Time PCR reaksiyon döngüleri

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Urasil DNA Glikozilaz (UDG) ön muamelesi	50	2 dakika	1
İlk Denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	40
Bağlanma ve Uzama	60	1 dakika	40



Şekil 3.4. Real-Time PCR amplifikasyon eğrileri

3.11. İstatistiksel Analiz

Hücre canlılığı ve biyokimyasal analizler ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS Statistics 23 programı kullanıldı. Gruplar içindeki verilerin normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro-Wilk testiyle analiz edildi. Gruplar arasında farklılığın olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğunun belirlenmesinde Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar Ortalama \pm Standart sapma olarak verildi.

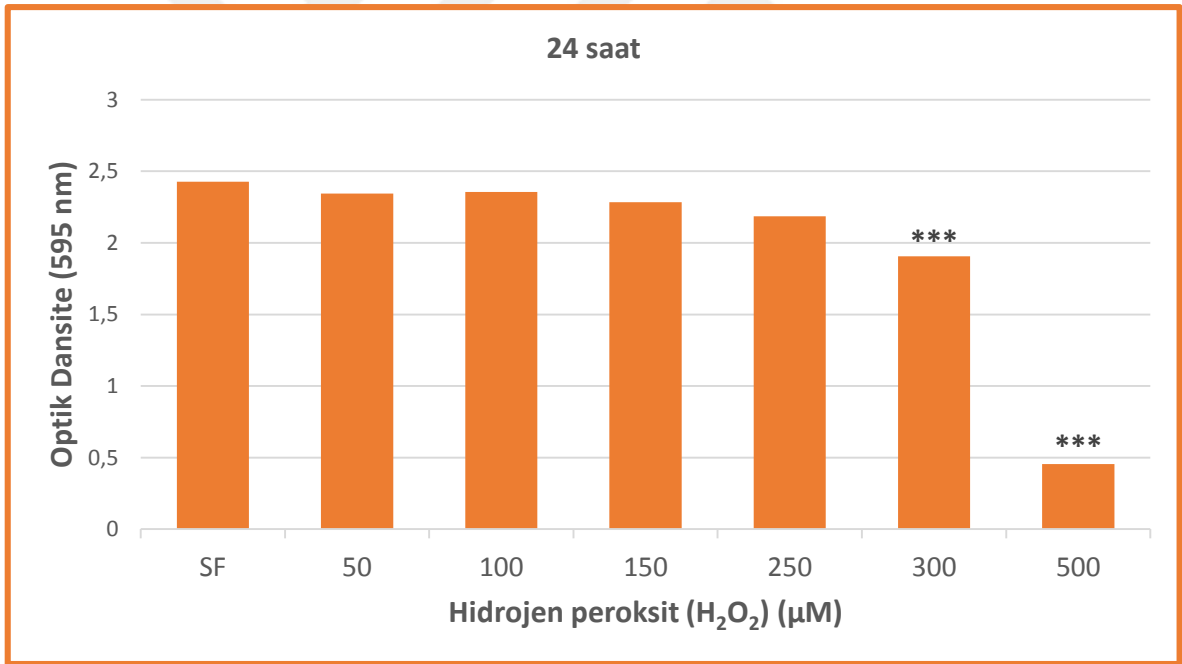
Real-Time PCR verilerinin istatistiksel analizi RT² profiler PCR Array Data Analysis version 3,5 ile yapıldı. Sonuçlar kat değişimi (Fold-change) olarak verildi.

4.BULGULAR

4.1.Hücre Canlılığı Analizi

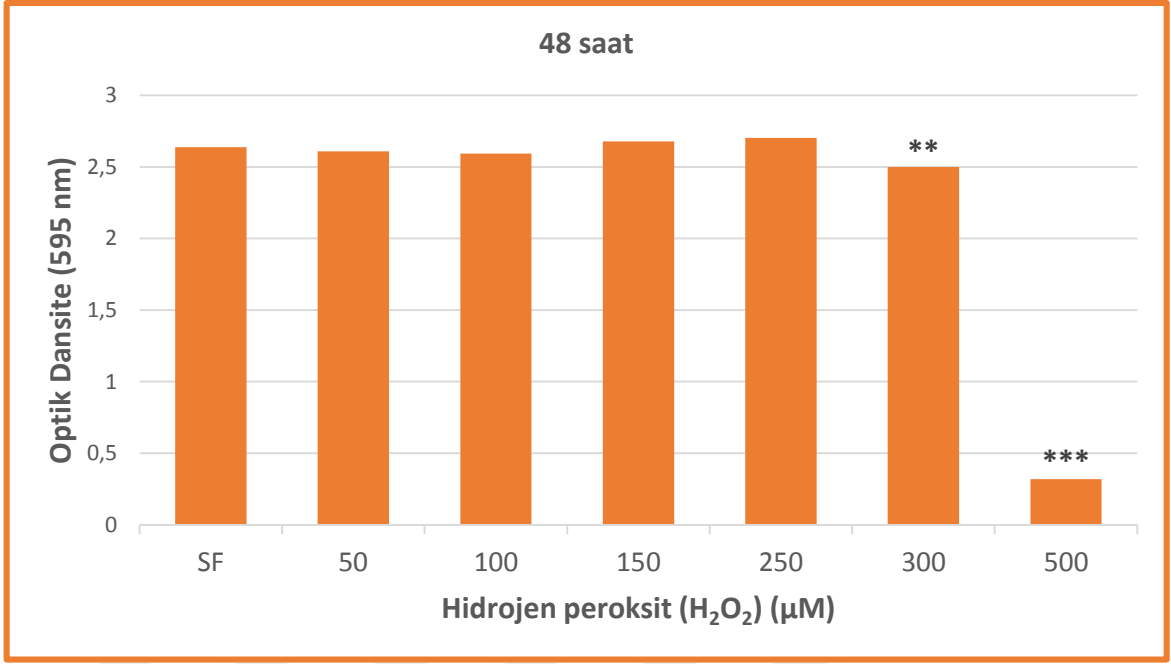
Bu aşamada, farklı dozlarda [0-500 mikromolar (μM)] hidrojen peroksitin (H_2O_2) farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) BEAS-2B hücre canlılığı üzerine olan etkisi değerlendirilerek maruziyet dozları belirlendi.

BEAS-2B hücrelerinin farklı dozlarda (0-500 μM) H_2O_2 'ye 24 saat süresince maruz bırakılması neticesinde 300 ve 500 μM dozlarda hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p = 0,001$) (Şekil 4.1).



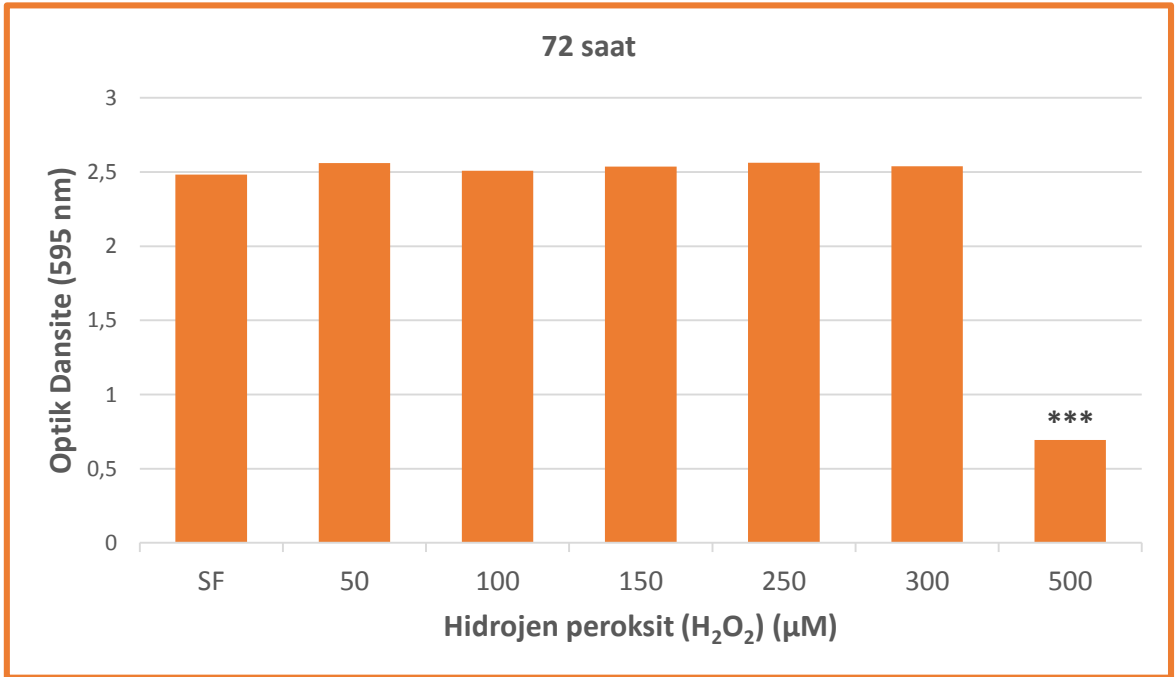
Şekil 4.1. 24 saatlik maruziyet süresi sonunda farklı dozlarda H_2O_2 'nin BEAS-2B hücre canlılığı üzerine olan etkisi (***) $p = 0,001$)

BEAS-2B hücrelerinin farklı dozlarda (0-500 μM) H_2O_2 'ye 48 saat süresince maruz bırakılması neticesinde 300 ve 500 μM dozlarda hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p = 0,005$ ve $p = 0,001$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. 48 saatlik maruziyet süresi sonunda farklı dozlarda H₂O₂'nin BEAS-2B hücre canlılığı üzerine olan etkisi (** $p = 0,005$ ve *** $p = 0,001$)

BEAS-2B hücrelerinin farklı dozlarda (0-500 µM) H₂O₂'ye 72 saat süresince maruz bırakılması neticesinde 500 µM dozda hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p = 0,001$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. 72 saatlik maruziyet süresi sonunda farklı dozlarda H₂O₂'nin BEAS-2B hücre canlılığı üzerine olan etkisi (*** $p = 0,001$)

Farklı dozlarda (0-500 µM) ve sürelerde (24, 48 ve 72 saat) H₂O₂'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde, maruziyet süreleri sonunda elde edilen veriler doğrultusunda % canlılık ve etkili konsantrasyon (Effective concentration; EC50) değerleri hesaplandı (**Çizelge 4.1**). Elde edilen bütün veriler değerlendirilerek deneyler için 250 ve 300 µM maruziyet dozları, 24 saat ise maruziyet süresi olarak belirlendi.

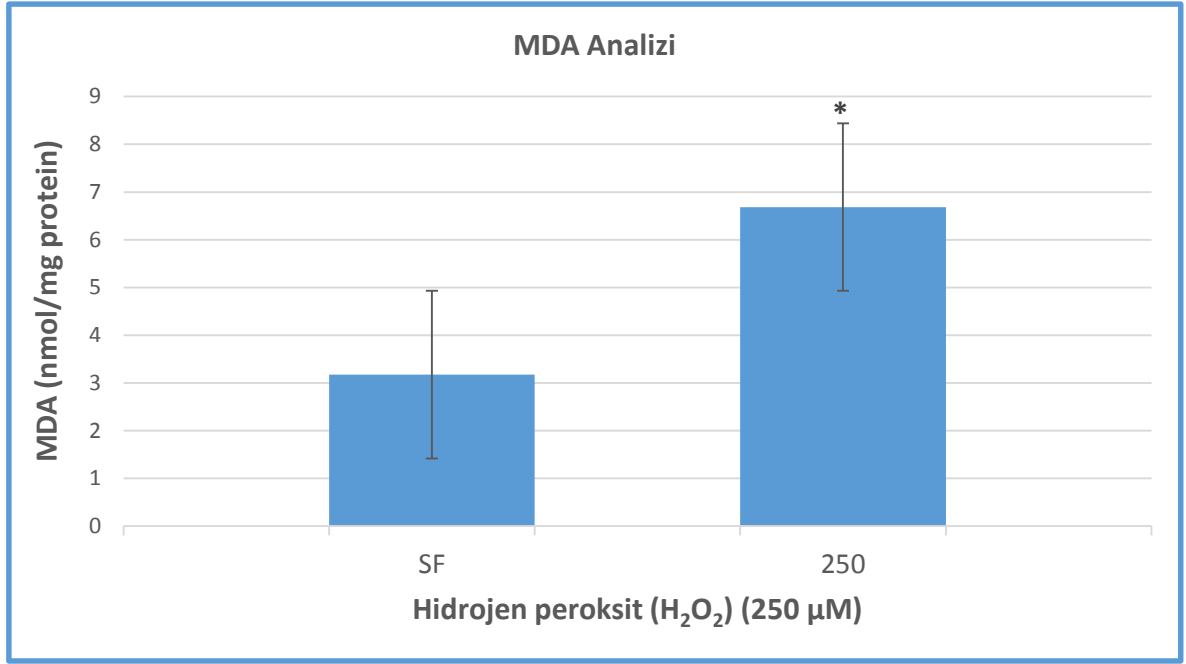
Çizelge 4.1. Farklı dozlarda (0-500 µM) ve sürelerde (24, 48 ve 72 saat) H₂O₂'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde % canlılık ve EC50 değerleri

	%Canlılık Kontrol	%Canlılık 50 µM	%Canlılık 100 µM	%Canlılık 150 µM	%Canlılık 250 µM	%Canlılık 300 µM	%Canlılık 500 µM	EC50
24 saat	100	96,5541	97,0176	94,0542	89,9798	78,4605	18,7047	364,0
48 saat	100	98,9101	98,2959	101,5567	102,4534	94,7735	12,0646	390,7
72 saat	100	103,1842	101,0888	102,2163	103,2312	102,2704	27,9698	398,7
%Canlılık = Örneğin Ortalama Absorbansı*100/Kontrolün Ortalama Absorbansı								

4.2.Biyokimyasal Analizler

4.2.1.Malondialdehit (MDA) Analizi

24 saat süresince 250 ve 300 μM dozlarında H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücre lizatı örneklerinde MDA ölçümü yapıldı. 250 μM maruziyet dozunda MDA düzeyi kontrol gruba kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ($p = 0,050$) (Şekil 4.4).



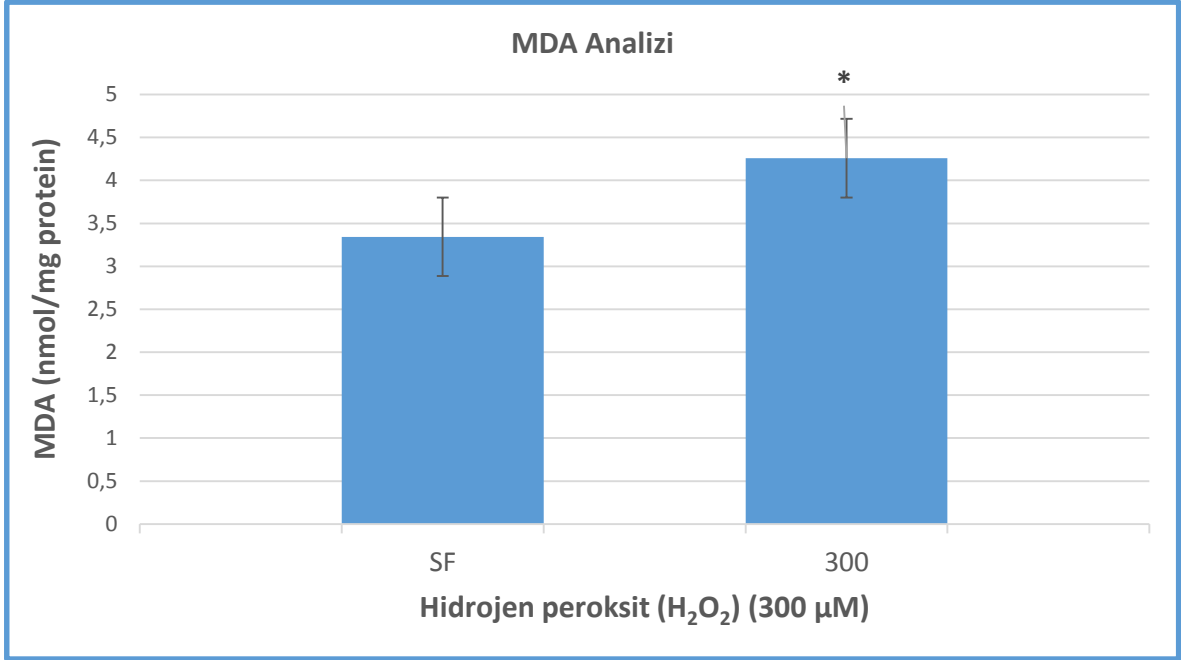
Şekil 4.4. 250 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA düzeyleri (* $p = 0,050$)

24 saat süresince, 250 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA analizi istatistiksel tanımlayıcı verileri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. 250 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA analizi tanımlayıcı verileri

MDA (250 μM)			
Maruziyet	Ortalama \pm Standart sapma	Ortanca	p
SF	3,1734 \pm 0,56587	3,0288	0,050
250 μM	6,6844 \pm 2,46586	7,8577	

24 saat süresince, 300 μM maruziyet dozunda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde, MDA düzeyinin kontrol gruba kıyasla anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p = 0,021$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. 300 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA düzeyleri (* $p = 0,021$)

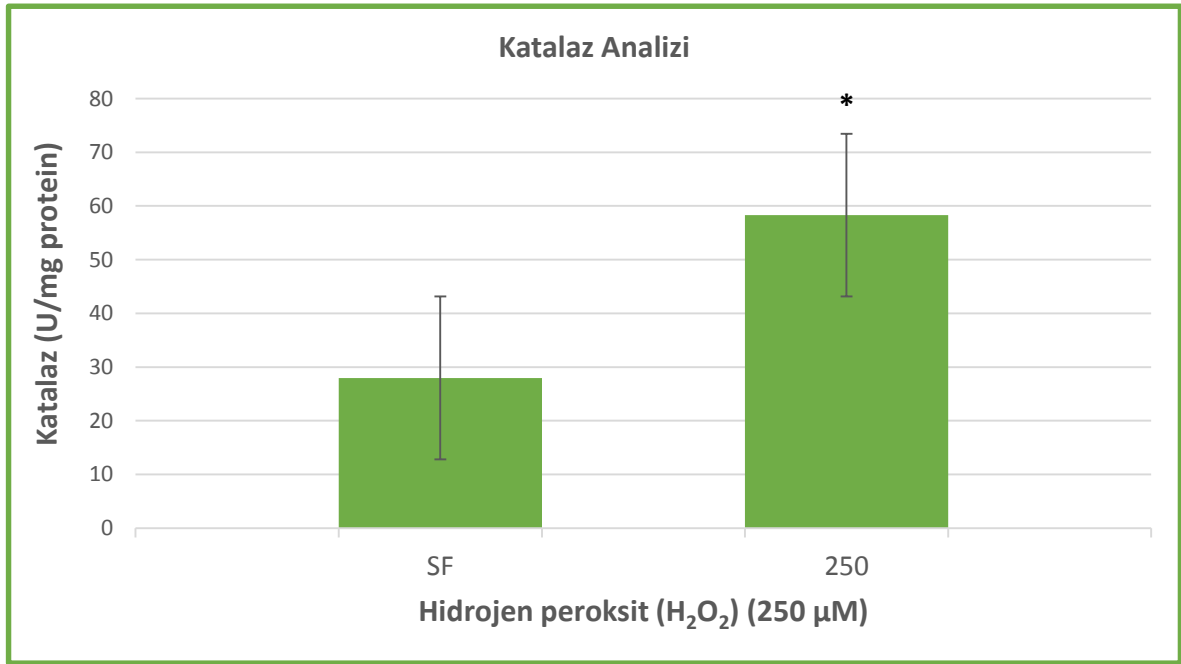
24 saat süresince, 300 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA analizi istatistiksel tanımlayıcı verileri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. 300 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde MDA analizi tanımlayıcı verileri

MDA (300 μM)			
Maruziyet	Ortalama \pm Standart sapma	Ortanca	p
SF	3,3436 \pm 0,57380	3,4132	0,021
300 μM	4,2596 \pm 0,44712	4,1146	

4.2.2.Katalaz Analizi

24 saat süresince 250 ve 300 μM dozlarında H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücre lizatı örneklerinde katalaz enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. 250 μM maruziyet dozunda katalaz düzeyi kontrol gruba kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ($p = 0,021$) (Şekil 4.6).



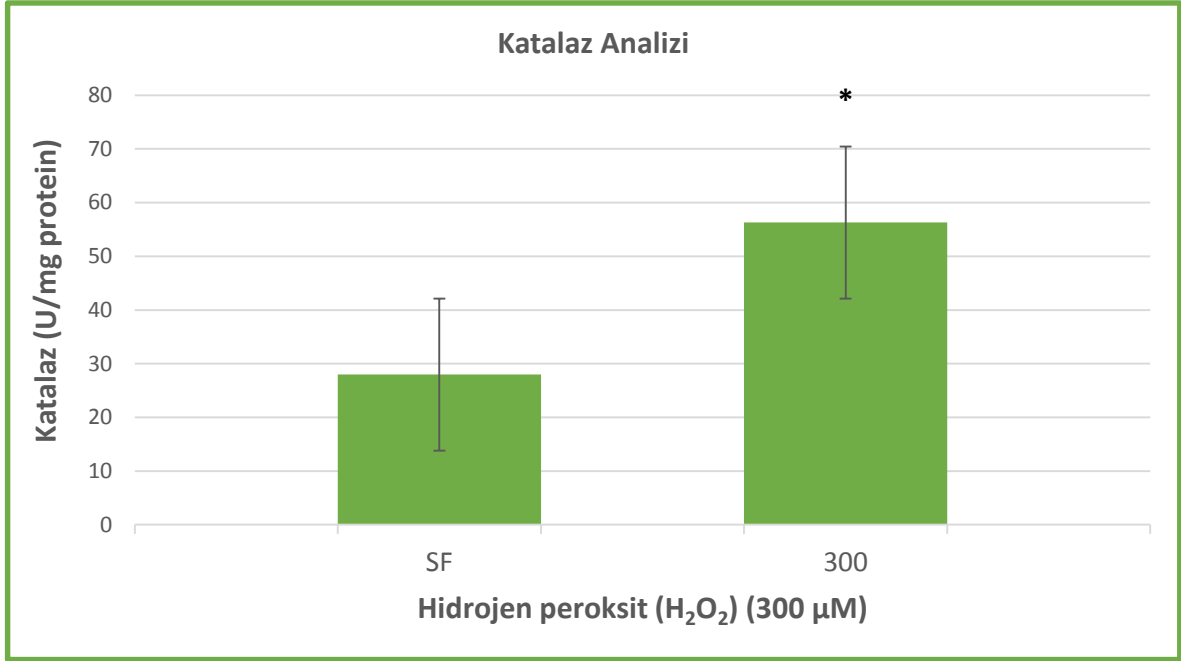
Şekil 4.6. 250 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde katalaz aktivitesi (* $p = 0,021$)

24 saat süresince, 250 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde katalaz analizi istatistiksel tanımlayıcı verileri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. 250 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde katalaz aktivitesi analizi tanımlayıcı verileri

KATALAZ (250 μM)			
Maruziyet	Ortalama \pm Standart sapma	Ortanca	p
SF	27,9652 \pm 9,7847	31,5427	0,021
250 μM	58,2858 \pm 21,7925	55,4646	

24 saat süresince, 300 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde, katalaz enzim aktivitesi kontrol gruba kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ($p = 0,021$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. 300 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde katalaz aktivitesi (* $p = 0,021$)

300 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde katalaz analizi istatistiksel tanımlayıcı verileri Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

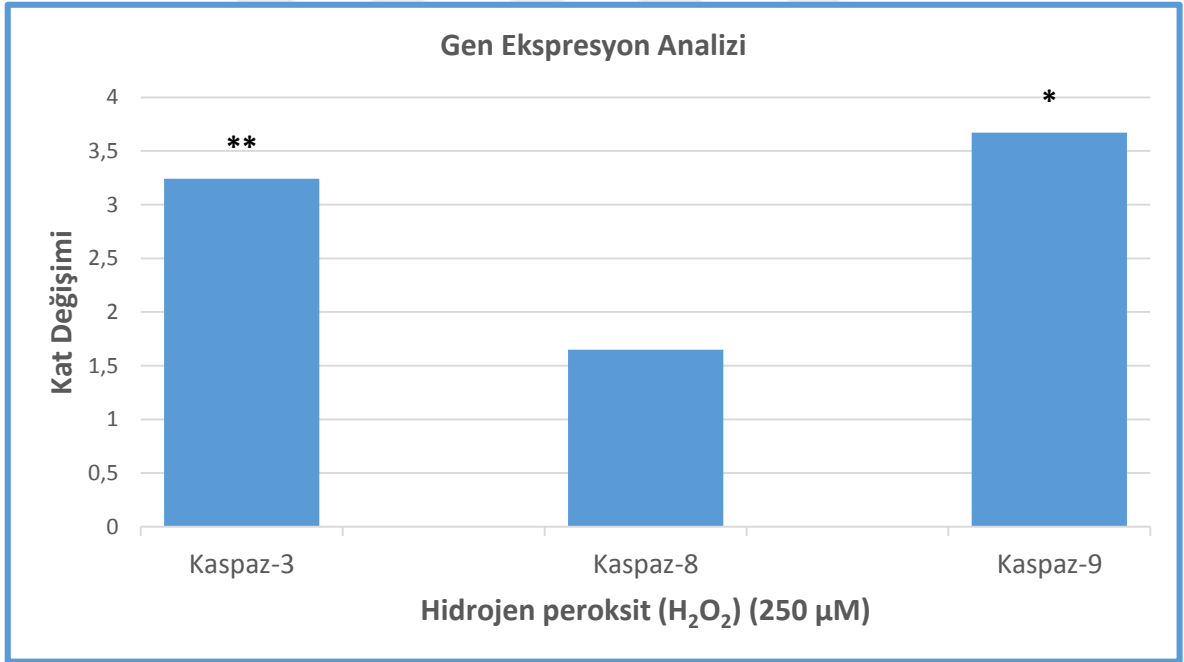
Çizelge 4.5. 300 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde katalaz aktivitesi analizi tanımlayıcı verileri

KATALAZ (300 μM)			
Maruziyet	Ortalama \pm Standart sapma	Ortanca	p
SF	27,9652 \pm 9,7847	31,5427	0,021
300 μM	56,2969 \pm 9,2218	55,8200	

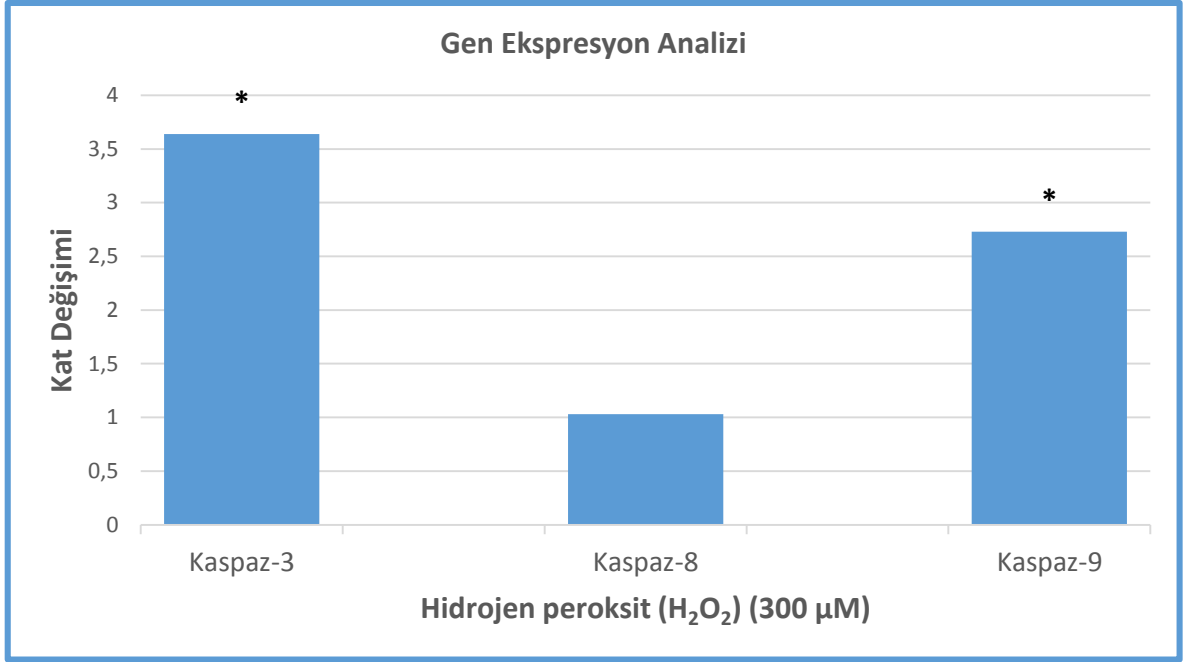
4.2.Gen Ekspresyon Analizi

24 saat süresince 250 ve 300 μM dozlarında H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinden elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, Bcl-2, bik, bax, bak, p53 ve p21 gen ekspresyon analizleri yapıldı. Housekeeping gen olarak Beta-aktin kullanıldı. Sonuçlar kat değişimi (Fold-change) olarak verildi.

Kaspaz-3 ve kaspaz-9 gen ekspresyon seviyeleri, her iki dozda, maruziyet grubunda kontrol gruba kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu (**Şekil 4.8 ve Şekil 4.9**). 250 μM dozda kaspaz-3 genindeki kat değişimi değeri 3,24 ($p = 0,001$); 300 μM dozda ise 3,64 kat ($p = 0,038$) artış olarak gözlemlendi. Kaspaz-9 geninde ise 250 μM dozda 3,67 ($p = 0,014$) 300 μM dozda ise 2,73 kat ($p = 0,021$) artış olarak bulundu. Kaspaz-8 gen ekspresyon seviyesinde ise her iki dozda anlamlı herhangi bir fark gözlenmedi (250 μM dozda $p = 0,068$; 300 μM dozda $p = 0,518$) (**Şekil 4.8 ve Şekil 4.9**).

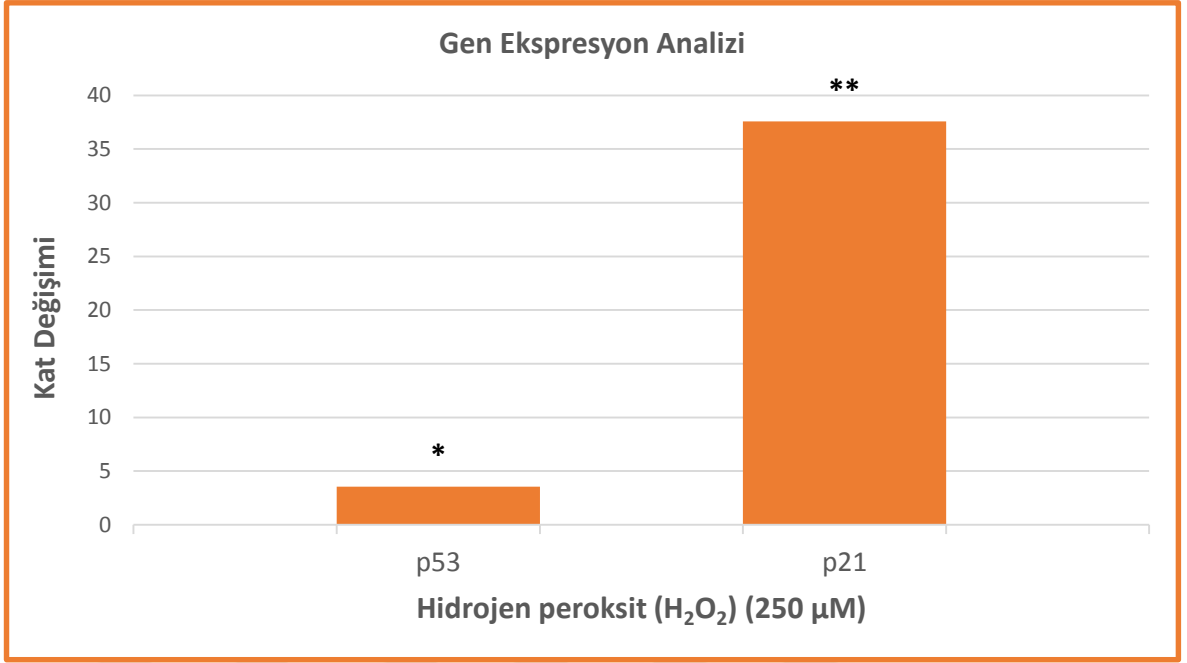


Şekil 4.8. 250 μM dozda H_2O_2 'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 gen ekspresyon düzeyleri (* $p = 0,014$ ve ** $p = 0,001$)

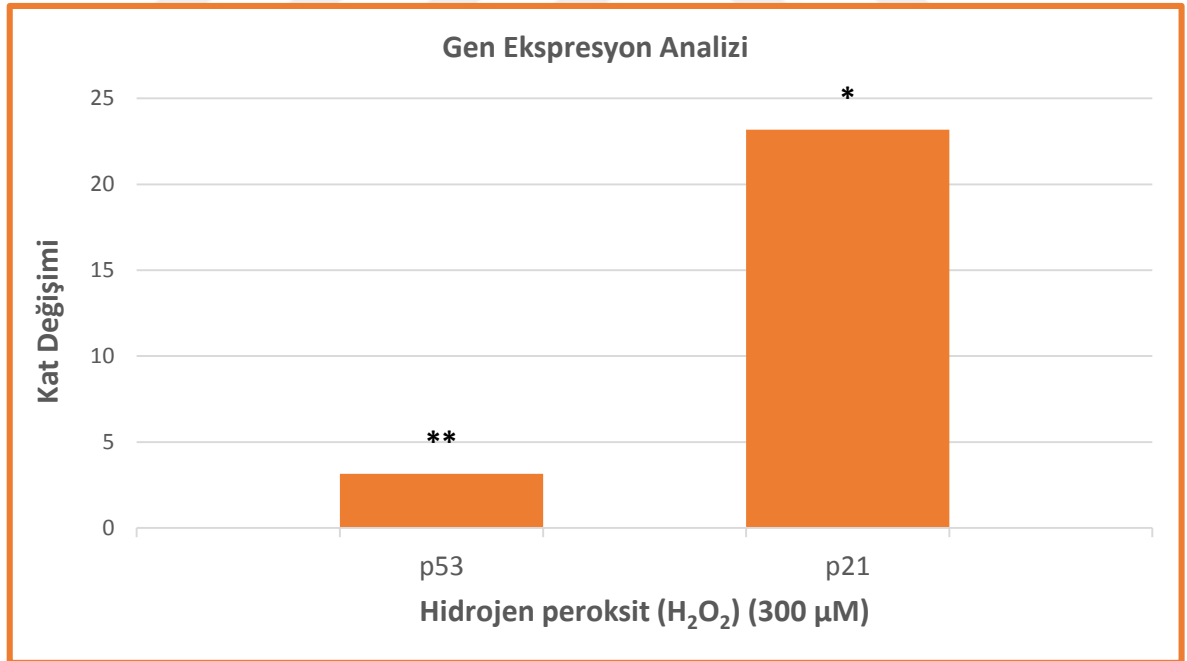


Şekil 4.9. 300 µM dozda H₂O₂'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 gen ekspresyon düzeyleri (Kaspaz 3 için **p* = 0,038; kaspaz-9 için **p* = 0,021)

P53 ve p21 gen ekspresyon seviyeleri, her iki dozda, maruziyet grubunda kontrol gruba kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). 250 µM dozda p53 genindeki kat değişim değeri 3,56 (*p* = 0,046); 300 µM dozda ise 3,15 kat (*p* = 0,002) artış olarak gözlemlendi. p21 geninde ise 250 µM dozda 37,57 (*p* = 0,005), 300 µM dozda ise 23,18 kat (*p* = 0,048) artış olarak bulundu.

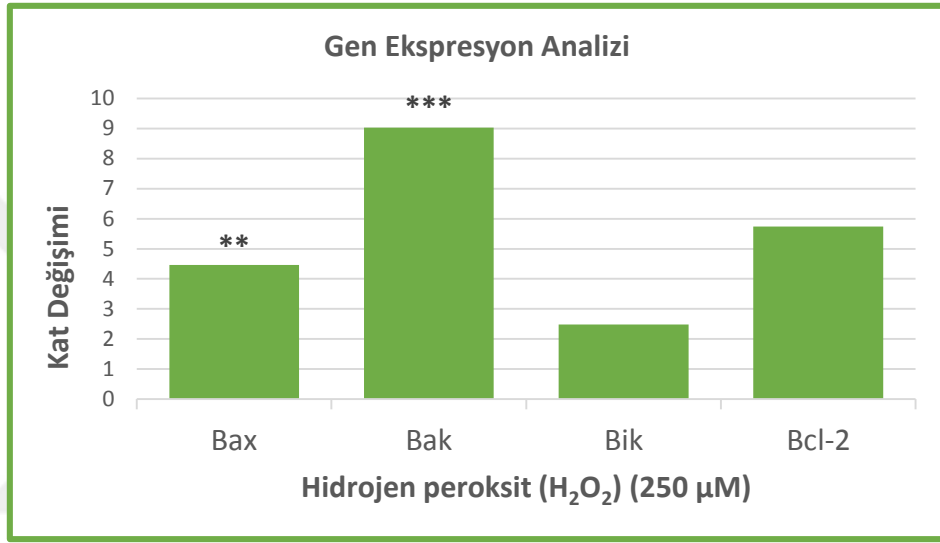


Şekil 4.10. 250 µM dozda H₂O₂'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde p53 ve p21 gen ekspresyon düzeyleri (**p* = 0,046 ve ***p* = 0,005)

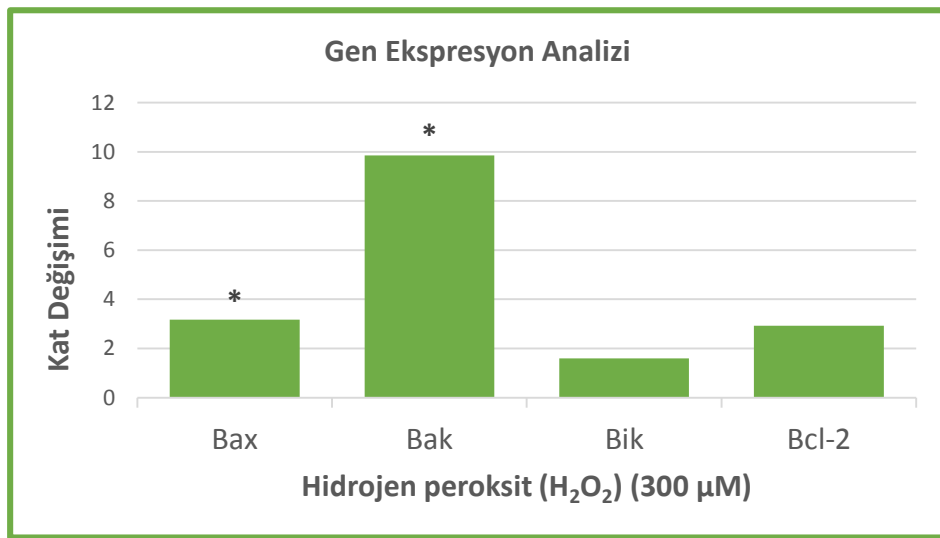


Şekil 4.11. 300 µM dozda H₂O₂'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde p53 ve p21 gen ekspresyon düzeyleri (**p* = 0,048 ve ***p* = 0,002)

Bax ve bak gen ekspresyon seviyeleri, her iki dozda, maruziyet grubunda kontrol gruba kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). 250 µM dozda bax genindeki kat değişim değeri 4,46 ($p = 0,005$); 300 µM dozda ise 3,17 kat ($p = 0,042$) artış olarak gözlemlendi. Bak geninde ise 250 µM dozda 9,03 ($p = 0,0001$), 300 µM dozda ise 9,85 kat ($p = 0,046$) artış olarak bulundu. Bcl-2 ve bik gen ekspresyon seviyelerinde ise herhangi bir anlamlılık gözlenmedi (Bcl-2 geni için, 250 µM dozda $p = 0,126$; 300 µM dozda $p = 0,294$; bik geni için, 250 µM dozda $p = 0,948$; 300 µM dozda $p = 0,441$) (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).



Şekil 4.12. 250 µM dozda H₂O₂'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde bax, bak, bik ve bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri (** $p = 0,005$ ve *** $p = 0,0001$)



Şekil 4.13. 300 µM dozda H₂O₂'ye maruz bırakılan BEAS-2B hücrelerinde bax, bak, bik ve bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri (Bax geni için * $p = 0,042$ ve bak geni için * $p = 0,046$)

5.TARTIŞMA

Hücrelerde artmış reaktif oksijen türevleri (Reactive/reduced oxygen species; ROS) seviyesinin, mitokondriyal disfonksiyona sebep olduğu ve hücreyi apoptozise yönlendirdiği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Tsao ve Yin 2015, Tseng ve ark. 2015). Ancak, apoptotik yolağın intrinsik olarak mı yoksa farklı bir sebeple ekstrinsik olarak mı uyarıldığı konusunda, apoptozisin farklı yollarına ait parametreleri ile hücre proliferasyon belirteçlerinin, BEAS-2B hücrelerinde gen düzeyinde bir arada değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Mevcut çalışmamızda, BEAS-2B hücreleri hidrojen perokside (H_2O_2) maruz bırakılarak oksidatif hasarlı hücre modeli oluşturuldu. Böylelikle, BEAS-2B hücrelerinde oksidatif stres koşulları altında, oksidatif stres aracılı apoptozisin hangi yolak üzerinden gerçekleştiğinin aydınlatılması amaçlandı.

Dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan (Karabulut ve Gülay 2016), yüksek derecede reaktif (Gupta ve ark. 2014), kararsız (Yarosz ve Chang 2018) ve kısa ömürlü (Mercan 2004) yapılar olan serbest radikaller, normal koşullar altında hücrelerde bulunan antioksidan sistemler tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (Yarosz ve Chang 2018). Serbest radikaller ile antioksidanlar arasında fizyolojik fonksiyonlar açısından oldukça önemli olan bu dengenin, serbest radikallerin lehine bozulması durumunda (*oksidatif stres*), bu yapılar hücrelerde DNA, protein ve lipid gibi makro moleküllerin yapılarını ve fonksiyonlarını bozmaktadır. Serbest radikaller bu etkileri sebebiyle hücre hasarı ve homeostatik bozulmalara sebep olmakta ve birçok patolojik sürece zemin hazırlayabilmektedir (Lobo ve ark. 2010). Nitekim yapılan çalışmalar, oksidatif stresin, kanser (Sander ve ark. 2003), nörodejeneratif hastalıklar (Uttara ve ark. 2009), diyabet (Maritim ve ark. 2003) ve solunum yolu hastalıkları (Cho ve Moon 2010) gibi pek çok hastalıkla ilişkili olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızın ilk aşamasında, BEAS-2B hücreleri farklı doz (0-500 μ M) ve sürelerde (24, 48 ve 72 saat) H_2O_2 'yle muamele edilerek maruziyet dozları belirlendi. 24 ve 48 saatlik maruziyet süresi sonunda 300 ve 500 μ M dozlarda hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (24 saatlik maruziyet süresi sonunda $p = 0,001$; 48 saatlik maruziyet süresi sonunda 300 μ M dozda $p = 0,005$, 500 μ M dozda $p = 0,001$). 72 saatlik maruziyet süresi sonunda ise

sadece 500 µM dozda hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu ($p = 0,001$). Elde edilen veriler doğrultusunda % canlılık ve etkili konsantrasyon (Effective concentration; EC50) değerleri hesaplanarak, deneyler için 250 ve 300 µM maruziyet dozları, 24 saat ise maruziyet süresi olarak belirlendi. Nitekim bu süre ve dozlarda oksidatif hasar göstergesi malondialdehit (MDA) düzeyi ve anti-oksidan enzim katalaz aktivitesinin, maruziyet grubunda kontrol gruba kıyasla anlamlı olarak artış gösterdiği oksidatif hasarlı hücre modeli oluşturuldu (MDA düzeyi için 250 µM dozda $p = 0,050$, 300 µM dozda $p = 0,021$; katalaz enzim aktivitesi için 250 µM ve 300 µM dozda $p = 0,021$).

Mitokondri, iç zarında bulunan elektron transport zinciri (ETZ) nedeniyle, hücrelerde üretilen ROS'un primer merkezi olmasının yanı sıra bu yapıların zarar verici etkileri açısından aynı zamanda önemli bir hedef durumundadır (Orrenius 2007). Oksidatif reaksiyonlara en duyarlı yapılar, membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asitleridir (Polyunsaturated fatty acids; PUFA) (Chen ve ark. 1995). Reaktif oksijen türevlerinin bir diğer önemli hedefi, mitokondri iç zar bileşenlerinden bir gliserofosfolipid formu olan kardiyolipin olup normal koşullarda, sitokrom c'nin iç membrana bağlanmasında bir çapa olarak görev görürken (Gallet ve ark. 1997, Shidoji ve ark. 1999), okside formu bu görevini yerine getirememektedir. Dolayısı ile kardiyolipin oksidasyonunun, intrinsik apoptotik yolağın aktifleşmesinde kilit rol oynayan sitokrom c salınımının primer sebebi olabileceği düşünülmektedir (Nomura ve ark. 2000). Çünkü yapılan çalışmalar apoptozis indüklü hücrelerde kardiyolipin miktarının azaldığını (Ushmorov ve ark. 1999) ve okside kardiyolipin miktarı inhibe edildiğinde, sitokrom c salınımının baskılandığını göstermiştir (Nomura ve ark. 2000). Buna göre, artmış ROS hücrelerde apoptotik yolağı mitokondri üzerinden uyarıyor gibi görünmektedir.

Gurr ve ark. (2005) BEAS-2B hücrelerinde titanyum dioksitin (titanium dioxide; TiO₂) kristal formları anataz (anatase) ve rutil (rutile) maruziyeti ile indükledikleri oksidatif stres sonucunda, nitrik oksit (NO) ve H₂O₂ miktarı ile oksidatif DNA hasarının anlamlı derecede arttığını gösterdiler ($p < 0,001$). Çalışmada, NO ve H₂O₂'nin anlamlı artışının gözlemlendiği anataz dozlarında, çalışmamızla uyumlu olarak MDA seviyesi anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,001$) (Gurr ve ark. 2005). Partikül madde PM_{2.5}'in, BEAS-2B hücreleri üzerine etkisini değerlendiren Wu ve ark. (2017), 50 ve 100 µg/ml dozlarda ve 24 saatlik maruziyet süresi sonunda, bu maddenin ROS miktarı ($p < 0,01$) ile oksidatif hasar göstergeleri MDA düzeyi ve laktat dehidrogenaz (LDH) enzim aktivitesini anlamlı olarak

arttırdığı, anti-oksidan enzim glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesini ise anlamlı olarak azalttığı yönünde bulgular elde ettiler ($p < 0,05$) (Wu ve ark. 2017). Wu ve ark.'nın (2018) Paeoniflorin'in PM2.5'e karşı koruyucu etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, PM2.5'in BEAS-2B hücrelerinde anlamlı olarak hücre canlılığını azalttığını, ROS miktarını ve oksidatif hasar göstergesi MDA düzeyini anlamlı olarak arttığını destekleyen sonuçlar elde ettiler ($p < 0,05$) (Wu ve ark. 2018). Artmış ROS'un oksidan ve anti-oksidan belirteçler üzerine olan etkisi farklı akciğer hücre hatlarında da benzer sonuçlar vermiştir. H₂O₂'ye maruz bırakılan çeşitli akciğer hücre hatlarında, maruziyet gruplarındaki anlamlı ROS artışına MDA düzeyinin de eşlik ettiği, anti-oksidan enzimler katalaz (Sun ve ark. 2017, Luo ve ark. 2018), GSH-Px (Luo ve ark. 2018) ve süperoksit dismutaz (SOD) (Sun ve ark. 2017) enzim aktivitelerinin ise anlamlı olarak azaldığı çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir.

Yabani tip YPH250 ve BY4741 hücrelerinde farklı dozlarda H₂O₂'nin (0,2-2 mM) katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisini değerlendiren çalışmada, H₂O₂'nin düşük dozlarda (0,2 ve 0,4 mM) katalaz aktivitesini arttırırken, yüksek dozlarda enzim aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Çalışmada enzim aktivitesini arttıran H₂O₂ dozları, mevcut çalışmamızdaki deneylerde kullandığımız dozlara yakın olup (250 ve 300 µM) sonuçlarda çalışmamızla uyumluluk göstermektedir (Martins ve English 2014).

Çalışmamızda, H₂O₂ maruziyeti ile ROS oluşumu indüklenen BEAS-2B hücrelerinde, maruziyet ve kontrol grupları, apoptotik parametreler kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, bax, bak, Bcl-2 ve bik ile hem apoptozis hem de hücre döngüsüyle ilişkili olan p53 ve p21 gen ekspresyon düzeyleri açısından kıyaslandı. Böylelikle, BEAS-2B hücrelerinde oksidatif stres koşulları altında gerçekleşen hücre canlılığı azalmasının altında yatan sebebin, oksidatif stres uyarılı apoptozisle mi yoksa hücre döngüsünün durmasıyla mı ilişkili olduğu değerlendirildi.

Mevcut çalışmamızda, pro-apoptotik parametrelerden kaspaz-3 ve kaspaz-9 gen ekspresyon seviyelerinin, maruziyet grubunda kontrol gruba kıyasla anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. 250 µM dozda kaspaz-3 genindeki kat değişimi 3,24 ($p = 0,001$), 300 µM dozda ise 3,64 ($p = 0,038$) olarak bulunurken, kaspaz-9 geninde ise 250 µM dozda 3,67 ($p = 0,014$), 300 µM dozda 2,73 kat ($p = 0,021$) anlamlı artış olduğu gösterildi. Ekstrinsik yolak ilişkili pro-apoptotik kaspaz-8 gen ekspresyon seviyesinde ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$).

Pro-apoptotik parametrelerden kaspaz-8'in gruplar arasında anlamsız, kaspaz-3 ve kaspaz-9 parametrelerinin ise gruplar arasında anlamlı farklılık göstermesi, H₂O₂ ile oksidatif stres uyarılı BEAS-2B hücrelerinde apoptozisin intrinsik yolak üzerinden tetiklendiğini düşündürmektedir. Ancak, kaspaz-9 ve kaspaz-3 yolağı aynı zamanda ekstrinsik yolakla birleşim kavşağı olduğundan, intrinsik yolak ile ilgili değerlendirmeler için yetersiz kalmaktadır. Bu sonucu desteklemek için mevcut sonuçların sadece intrinsik yolağa spesifik parametreler ile desteklenmesi gerekmektedir. Nitekim çalışmamızda bu değerlendirme aşamasında sadece intrinsik yolağa ait pro-apoptotik bax ve bak, anti-apoptotik Bcl-2 parametrelerinin gen ekspresyon seviyeleri de değerlendirildi. Bax ve bak gen ekspresyon seviyeleri, maruziyet grubunda kontrol gruba kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. 250 µM dozda bax genindeki kat değişimi değeri 4,46 ($p = 0,005$), 300 µM dozda ise 3,17 kat ($p = 0,042$) olarak gözlemlendi. Bak geninde ise 250 µM dozda 9,03 ($p = 0,0001$), 300 µM dozda ise 9,85 kat ($p = 0,046$) olarak bulundu. Bcl-2 ve bik gen ekspresyon seviyeleri açısından gruplar arasında herhangi bir anlamlılık gözlenmedi ($p > 0,05$).

Dolayısı ile çalışmamızın apoptozis ayağında, intrinsik ve ekstrinsik yolağın kavşak parametreleri olan pro-apoptotik kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün gruplar arasında artış yönündeki anlamlı farklılığı, sadece intrinsik yolak ilişkili pro-apoptotik bax ve bak parametrelerinin anlamlı artışıyla desteklenmiştir. Ekstrinsik yolak ilişkili pro-apoptotik parametre kaspaz-8 ile ilgili olarak gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Sonuçlarımız H₂O₂ ile oksidatif stresin uyarıldığı BEAS-2B hücrelerinde apoptotik yolağın mitokondri (intrinsik) üzerinden uyarıldığını göstermektedir.

Literatürde H₂O₂ ile oksidatif stres uyarılı BEAS-2B hücrelerinde, oksidan ve anti-oksidan profili ile intrinsik ve ekstrinsik yolak ilişkili apoptotik parametrelerin bir arada değerlendirildiği çalışmalar oldukça sınırlı olup, büyük oranda sonuçlarımız ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu çalışmalarda H₂O₂ seviyesinin artışı, BEAS-2B hücre canlılığını anlamlı olarak azaltırken (Hsia ve Yin 2015), oksidatif stres ilişkili ROS (Hsia ve Yin 2015) ve okside glutasyon seviyelerini anlamlı olarak arttırmıştır (Antognelli ve ark. 2014, Hsia ve Yin 2015). Redükte glutasyon seviyesi ile anti-oksidan enzimler glutasyon peroksidaz (Antognelli ve ark. 2014, Hsia ve Yin 2015), glutasyon redüktaz (Hsia ve Yin 2015), glutasyon sentetaz, glutasyon-s-transferaz ve katalaz aktiviteleri ise anlamlı olarak azalmıştır (Antognelli ve ark. 2014). Ayrıca, mevcut çalışmalarda H₂O₂ maruziyeti neticesinde BEAS-2B apoptotik hücre yüzdesi (Antognelli ve ark. 2014) ile pro-apoptotik parametreler kaspaz-

3, bax (Antognelli ve ark. 2014, Hsia ve Yin 2015) ve kaspaz-8 (Hsia ve Yin 2015) seviyelerinin anlamlı olarak arttığı, anti-oksidan parametreler Bcl-2 (Antognelli ve ark. 2014, Hsia ve Yin 2015) ve Bcl-xL seviyelerinin ise anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Antognelli ve ark. 2014).

BEAS-2B ve farklı bronşiyal epitel hücre hatları, H₂O₂ maruziyeti ile indüklenmiş, oksidatif, anti-oksidatif ve apoptotik profilleri açısından kıyaslandığında, benzer sonuçlar elde edilmiştir. Triterpenik asitlerin, iki ayrı insan bronşiyal epitel hücre hattı (16HBE ve BEAS-2B) üzerine koruyucu etkisini değerlendiren çalışmada, 100 µM H₂O₂ maruziyeti neticesinde her iki hücre hattında hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı, DNA fragmantasyonunun ise anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir ($p < 0,05$). Ayrıca ROS ve DNA oksidatif hasar göstergesi 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) seviyeleri her iki hücre hattında anlamlı olarak yüksek bulunurken, glutatyon seviyesi ve Na⁺-K⁺-ATPaz aktivitesi (mitokondriyal membran potansiyeli) her iki hücre hattında anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p < 0,05$). Aynı çalışmada her iki hücre hattında Bcl-2 seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı, bax ve aktif kaspaz-3 seviyesinin ise çalışmamızda olduğu gibi anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir ($p < 0,05$). Ayrıca kaspaz-3 ve kaspaz-8 enzim aktiviteleri anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0,05$) (Tsao ve Yin 2015). Birçok kanser tipinde anti-oksidan ve anti-proliferatif etkisi gösterilen resveratrolün akciğer kanseri hücre hattı H460 ve BEAS-2B hücre hattı üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, H460 hücrelerinin BEAS-2B hücrelerine kıyasla resveratrol tedavisine daha duyarlı olduğu gösterildi. Çalışmada, resveratrolün H460 hücrelerinde, hücre canlılığı ve proliferasyonunu azaltıcı etki gösterdiği gözlenirken, apoptozisi uyardığı gözlendi. Ayrıca çalışmamızla uyumlu olarak apoptoze, artmış H₂O₂ üretimi eşlik ederken, çalışmamızdan farklı olarak Bid ve kaspaz-8 aktivasyonunun eşlik ettiği gösterildi (Wright ve ark. 2017).

Çalışmamızda, hücre proliferasyonu ile ilişkili p53 ve p21 gen ekspresyon seviyeleri, maruziyet grubunda kontrol gruba kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. 250 µM dozda p53 genindeki kat değişim değeri 3,56 ($p = 0,046$), 300 µM dozda ise 3,15 kat ($p = 0,002$) olarak gözlendi. p21 geninde ise kat değişim değerleri, 250 µM dozda 37,57 ($p = 0,005$), 300 µM dozda ise 23,18 kat ($p = 0,048$) olarak bulundu.

Çalışmamızda, hücre döngüsü ve apoptozis yollarında kavşak konumunda bulunan p53 ve p21 protein gen ekspresyon seviyelerinin maruziyet grubunda anlamlı olarak yüksek çıkması, H₂O₂'nin, p53 protein aktivasyonuna aracılık ederek p21 proteini üzerinden hücre

döngüsünü durdurucu etkiye sebep olduğunu göstermektedir. Dolayısı ile H₂O₂ maruziyetinin BEAS-2B hücrelerindeki hücre canlılığını azaltıcı yöndeki etkisi, p53 proteini üzerinden hücre döngüsünü durdurucu ve mitokondriyal yolak üzerinden apoptozisi uyarıcı etkiye sebep olması nedeniyle gerçekleşmektedir.

Literatürde, H₂O₂ maruziyetinin BEAS-2B hücrelerindeki p53 profilini değerlendiren çalışmalar oldukça sınırlıdır. Lu ve ark.'ın (2013) uyarılmış pluripotent kök hücre (Induced pluripotent stem (iPS) cells), Tera-1 ve BEAS-2B hücre hattında H₂O₂'nin genotoksik etkisini araştırdıkları çalışmalarında, total p53 ekspresyon seviyesi değerlendirildi. H₂O₂ maruziyeti (100 µM) neticesinde, total p53 seviyesi iPS hücrelerinde akut süreçte çok az artış gösterirken, kronik süreçte bu seviyenin giderek azaldığı gözlemlendi. Tera-1 hücrelerinde ise total p53 zamana bağımlı bir şekilde kademeli olarak artış gösterdi. Çalışmamızdan farklı olarak BEAS-2B hücrelerinde total p53 miktarında önemli bir artış bulunmadı (Lu ve ark. 2013).

Solunum sisteminin sigara dumanı, partikül maddeler, ağır metaller ve hava kirliliği gibi çevresel kontaminasyon unsurlarına maruziyetinin (Tsao ve Yin 2015), solunum yolu epitel hücrelerinde H₂O₂ salınımını uyardığı (Downs ve ark. 2011, Yi ve ark. 2014) ve artan H₂O₂ seviyesi neticesinde oluşan oksidatif stres durumunun, hücrelerde apoptotik yolağı tetiklediği bilinmektedir (Antognelli ve ark. 2014, Hsia ve Yin 2015, Tsao ve Yin 2015).

Çalışmamızda H₂O₂ aracılı oksidatif stres ortamının, gen düzeyinde bronş epitel hücrelerinde BEAS-2B hücrelerinde intrinsik yolak üzerinden apoptozisi indüklediğini gösteren sonuçlar elde edildi. Bu veriler doğrultusunda, solunum yolu hücrelerindeki apoptozis indüksiyonu sebebi olarak, mitokondriyal apoptotik yolakta anahtar rol oynayan sitokrom c salınımına aracılık eden, artan ROS'un eşlik ettiği mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulması gibi görünmektedir. Dolayısı ile solunum sisteminde, yabancı maddelerin istilasını önlemek üzere bir bariyer görevi gören bronşiyal epitelyum hücreleri için mitokondriyal oksidatif durumun kontrol altında tutulması, solunum yolu hastalıklarıyla mücadele konusunda oldukça önem arz etmektedir. Bu duruma engel olabilecek anti-oksidan ve anti-apoptotik tedavilerin, normal tedavi sürecine eşlik etmesinin dikkate alınması gereken önemli bir husus olduğunu düşünmekteyiz.

6.SONUÇ

Çalışmamızda, hidrojen peroksit (H_2O_2) aracılı oksidatif stres ortamının, gen düzeyinde, bronş epiteli BEAS-2B hücrelerinde intrinsik yolak üzerinden apoptozisi indüklediği gözlenmiştir. Bu nedenle, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve astım gibi solunum yolu hastalıklarında, bronşiyal epitelyum hücreleri için mitokondriyal oksidatif durumun kontrol altında tutulması için anti-oksidan ve anti-apoptotik tedavilerin, normal tedavi sürecine eşlik etmesinin dikkate alınması gereken önemli bir husus olduğunu düşünmekteyiz.



7.KAYNAKLAR

1. **Adams JM.** Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*, **2003**, 17(20): s.2481-2495
2. **Ademowo OS, Dias HKI, Burton DGA, Griffiths HR.** Lipid (per) oxidation in mitochondria: an emerging target in the ageing process? *Biogerontology*, **2017**, 18: s.859-879
3. **Aebi H.** Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, **1984**, 105: s.121-126
4. **Aebi H, Wyss SR, Scherz B, Skvaril F.** Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. *Eur J Biochem*, **1974**, 48(1): s.137-145
5. **Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N ve ark.** Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem*, **1997**, 69(3): s.1196-1203
6. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K ve ark.** *Hücrenin Moleküler Biyolojisi*. 4th edition. Garland science New York, United States of America/Türkiye Bilimler Akademisi, Sistem Ofset Basım Yayın San. Tic. Ltd.Şti. Ankara, **2008**, s.1010-1014
7. **Annis MG, Soucie EL, Dlugosz PJ, Cruz-Aguado JA, Penn LZ ve ark.** Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J*, **2005**, 24(12): s.2096-2103
8. **Antognelli C, Gambelunghe A, Talesa VN, Muzi G.** Reactive oxygen species induce apoptosis in bronchial epithelial BEAS-2B cells by inhibiting the antiglycation glyoxalase I defence: involvement of superoxide anion, hydrogen peroxide and NF-kappaB. *Apoptosis*, **2014**, 19(1): s.102-116
9. **Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M.** The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*, **2000**, 45(2): s.115-134
10. **Blackburn AC, Coggan M, Shield AJ, Cappello J, Theodoratos A ve ark.** Glutathione transferase kappa deficiency causes glomerular nephropathy without overt oxidative stress. *Lab Invest*, **2011**, 91(11): s.1572-1583
11. **Bogdanov M, Brown RH, Matson W, Smart R, Hayden D ve ark.** Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic Biol Med*, **2000**, 29(7): s.652-658
12. **Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ ve ark.** Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*, **2004**, 37(6): s.755-767
13. **Catala A.** An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol*, **2006**, 38(9): s.1482-1495
14. **Champe P, Harvey R, Ferrier D.** *Biyokimya*. 3th edition. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business/Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., **2007**, s.73-82
15. **Chen JJ, Bertrand H, Yu BP.** Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med*, **1995**, 19(5): s.583-590
16. **Chinnadurai G, Vijayalingam S, Rashmi R.** BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene*, **2008**, 27 Suppl 1: s.S20-29
17. **Cho IH, Gong JH, Kang MK, Lee EJ, Park JH ve ark.** Astragalin inhibits airway eotaxin-1 induction and epithelial apoptosis through modulating oxidative stress-responsive MAPK signaling. *BMC Pulm Med*, **2014**, 14: s.122
18. **Cho YS, Moon HB.** The role of oxidative stress in the pathogenesis of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*, **2010**, 2(3): s.183-187
19. **Choi S, Swanson JM.** Interaction of cytochrome c with cardiolipin: an infrared spectroscopic study. *Biophys Chem*, **1995**, 54(3): s.271-278
20. **Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J.** Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*, **2003**, 17(10): s.1195-1214
21. **Cooper G, Hausman R.** *Hücre, Moleküler yaklaşım*. 7th edition. Sinauer Associates/İzmir Tıp Kitapevi Kırtasiye Büro Malz. San. ve Tic. Ltd. Şti. İzmir, **2016**, s.692
22. **Cory S, Adams JM.** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, **2002**, 2(9): s.647-656

23. **Cory S, Huang DC, Adams JM.** The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, **2003**, 22(53): s.8590-8607
24. **Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R.** Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, **2003**, 329(1-2): s.23-38
25. **de Jongh HH, Ritsema T, Killian JA.** Lipid specificity for membrane mediated partial unfolding of cytochrome c. *FEBS Lett*, **1995**, 360(3): s.255-260
26. **Demirel S.** *Biyokimya*. TUSEM Eğitim Sağlık Ltd. Şti, Ankara, **2014**, s.136-146
27. **Di Filippo C, Cuzzocrea S, Rossi F, Marfella R, D'Amico M.** Oxidative stress as the leading cause of acute myocardial infarction in diabetics. *Cardiovasc Drug Rev*, **2006**, 24(2): s.77-87
28. **Dickens LS, Powley IR, Hughes MA, MacFarlane M.** The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms. *Exp Cell Res*, **2012**, 318(11): s.1269-1277
29. **Dix TA, Aikens J.** Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol*, **1993**, 6(1): s.2-18
30. **Dlugosz PJ, Billen LP, Annis MG, Zhu W, Zhang Z ve ark.** Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J*, **2006**, 25(11): s.2287-2296
31. **Downs CA, Montgomery DW, Merkle CJ.** Age-related differences in cigarette smoke extract-induced H₂O₂ production by lung endothelial cells. *Microvasc Res*, **2011**, 82(3): s.311-317
32. **Fulda S, Debatin KM.** Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, **2006**, 25(34): s.4798-4811
33. **Fulle S, Pietrangelo T, Mancinelli R, Saggini R, Fano G.** Specific correlations between muscle oxidative stress and chronic fatigue syndrome: a working hypothesis. *J Muscle Res Cell Motil*, **2007**, 28(6): s.355-362
34. **Gallet PF, Petit JM, Maftah A, Zachowski A, Julien R.** Asymmetrical distribution of cardiolipin in yeast inner mitochondrial membrane triggered by carbon catabolite repression. *Biochem J*, **1997**, 324 (Pt 2): s.627-634
35. **Gelisgen R, Genc H, Kayali R, Oncul M, Benian A ve ark.** Protein oxidation markers in women with and without gestational diabetes mellitus: a possible relation with paraoxonase activity. *Diabetes Res Clin Pract*, **2011**, 94(3): s.404-409
36. **Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA.** Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, **2005**, 55(3): s.178-194
37. **Gilca M, Stoian I, Atanasiu V, Virgolici B.** The oxidative hypothesis of senescence. *J Postgrad Med*, **2007**, 53(3): s.207-213
38. **Girotti AW.** Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res*, **1998**, 39(8): s.1529-1542
39. **Green DR, Llambi F.** Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2015**, 7(12)
40. **Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK ve ark.** Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*, **2014**, 15(11): s.4405-4409
41. **Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY.** Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, **2005**, 213(1-2): s.66-73
42. **Gutteridge JM.** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, **1995**, 41(12 Pt 2): s.1819-1828
43. **Halliwell B.** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, **2006**, 141(2): s.312-322
44. **Hancock JT, Desikan R, Neill SJ.** Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans*, **2001**, 29(Pt 2): s.345-350
45. **Hardwick JM, Youle RJ.** SnapShot: BCL-2 proteins. *Cell*, **2009**, 138(2): s.404, 404.e401.
46. **Harris CC.** Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst*, **1996**, 88(20): s.1442-1455
47. **Hengartner MO.** The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **2000**, 407(6805): s.770-776
48. **Hsia TC, Yin MC.** s-Ethyl Cysteine and s-Methyl Cysteine Protect Human Bronchial Epithelial Cells Against Hydrogen Peroxide Induced Injury. *J Food Sci*, **2015**, 80(9): s.H2094-2101
49. **Jain SK.** Membrane lipid peroxidation in erythrocytes of the newborn. *Clin Chim Acta*, **1986**, 161(3): s.301-306
50. **Jost PJ, Grabow S, Gray D, McKenzie MD, Nachbur U ve ark.** XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*, **2009**, 460(7258): s.1035-1039
51. **Kalkavan H, Green DR.** MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ*, **2018**, 25(1): s.46-55

52. **Karabulut H, Gülay MŞ.** Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **2016**, 4(1): s.50-59
53. **Kato J, Kobune M, Nakamura T, Kuroiwa G, Takada K ve ark.** Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet. *Cancer Res*, **2001**, 61(24): s.8697-8702
54. **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **1972**, 26(4): s.239-257
55. **Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR ve ark.** Stepwise activation of BAX and BAK by tBid, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, **2009**, 36(3): s.487-499
56. **Kim PK, Annis MG, Dlugosz PJ, Leber B, Andrews DW.** During apoptosis bcl-2 changes membrane topology at both the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Mol Cell*, **2004**, 14(4): s.523-529
57. **Kocabaş A.** Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Epidemiyolojisi Ve Risk Faktörleri. *TTD Toraks Cerrahisi Bülteni*, **2010**, 1(2): s.105-113
58. **Koçak N, Yıldırım İH, Cing Yıldırım S.** p53 ve p53 gen ailesi üyeleri olan p63 ve p73'ün hücrel işlevleri. *Dicle Tıp Dergisi*, **2011**, 38(4): s.530-535.
59. **Krapfenbauer K, Birnbacher R, Vierhapper H, Herkner K, Kampel D ve ark.** Glycooxidation, and protein and DNA oxidation in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)*, **1998**, 95(3): s.331-337
60. **Kulikov AV, Shilov ES, Mufazalov IA, Gogvadze V, Nedospasov SA ve ark.** Cytochrome c: the Achilles' heel in apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, **2012**, 69(11): s.1787-1797
61. **Kumar V, Abbas AK, Aster JC.** Robbins Basic Pathology 9th Edition. Erişim: https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=YYZMDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=elsevier+kumar+et+al+robbins+basic+pathology&ots=YiuoM1p-sB&sig=k3uf1WTmdUePvEWbfBOND-u-Fk&redir_esc=y#v=onepage&q=elsevier%20kumar%20et%20al%20robbins%20basic%20pathology&f=false. **2013**. 10.07.2018
62. **Kvansakul M, Yang H, Fairlie WD, Czabotar PE, Fischer SF ve ark.** Vaccinia virus anti-apoptotic FIL is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ*, **2008**, 15(10): s.1564-1571
63. **Lartillot S, Kedziora P, Athias A.** Purification and characterization of a new fungal catalase. *Prep Biochem*, **1988**, 18(3): s.241-246
64. **Leber B, Lin J, Andrews DW.** Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene*, **2010**, 29(38): s.5221-5230
65. **Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M ve ark.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **1997**, 91(4): s.479-489
66. **Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P ve ark.** Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*, **2017**, 8(14): s.23996-24008
67. **Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, **2010**, 4(8): s.118-126
68. **Lovell JF, Billen LP, Bindner S, Shamas-Din A, Fradin C ve ark.** Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell*, **2008**, 135(6): s.1074-1084
69. **Lovell MA, Gabbita SP, Markesbery WR.** Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J Neurochem*, **1999**, 72(2): s.771-776
70. **Lu Y, Xu D, Zhou J, Ma Y, Jiang Y ve ark.** Differential responses to genotoxic agents between induced pluripotent stem cells and tumor cell lines. *J Hematol Oncol*, **2013**, 6(1): s.71
71. **Luo X, Zhang H, Duan Y, Chen G.** Protective effects of radish (*Raphanus sativus* L.) leaves extract against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in human fetal lung fibroblast (MRC-5) cells. *Biomed Pharmacother*, **2018**, 103: s.406-414
72. **Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B.** An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem*, **1997**, 68(5): s.2061-2069
73. **Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd.** Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*, **2003**, 17(1): s.24-38
74. **Martins D, English AM.** Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. *Redox Biol*, **2014**, 2: s.308-313

75. **Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N.** Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*, **2016**, 11(4): s.e0152925
76. **Mates JM, Segura JA, Alonso FJ, Marquez J.** Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch Toxicol*, **2008**, 82(5): s.273-299
77. **Mathai JP, Germain M, Shore GC.** BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *J Biol Chem*, **2005**, 280(25): s.23829-23836
78. **Mathers CD, Loncar D.** Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, **2006**, 3(11): s.e442
79. **Matsui A, Ikeda T, Enomoto K, Hosoda K, Nakashima H ve ark.** Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett*, **2000**, 151(1): s.87-95
80. **Mercan U.** Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2004**, 15(1): s.91-96
81. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **1983**, 65(1-2): s.55-63
82. **Nikolotopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N.** Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, **2013**, 1833(12): s.3448-3459
83. **Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T, Nakagawa Y.** Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J*, **2000**, 351(Pt 1): s.183-193
84. **O'Brien ES, Nucci NV, Fuglestad B, Tommos C, Wand AJ.** Defining the Apoptotic Trigger: THE INTERACTION OF CYTOCHROME c AND CARDIOLIPIN. *J Biol Chem*, **2015**, 290(52): s.30879-30887
85. **Okamoto K, Toyokuni S, Uchida K, Ogawa O, Takenawa J ve ark.** Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer*, **1994**, 58(6): s.825-829
86. **Orrenius S.** Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev*, **2007**, 39(2-3): s.443-455
87. **Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW.** Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2008**, 9(7): s.532-542
88. **Öner Erkekol F, Köktürk N, Mungan D, Saçkesen C, Önen ZP ve ark.** Türkiye kronik hava yolu hastalıkları önleme ve kontrol programı (gard türkiye) birinci basamakta çalışan hekim eğitimi bilgi değerlendirme sonuçları. *Tuberk Toraks*, **2017**, 65(2): s.80-89
89. **Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z.** Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *JCEI /Journal of Clinical and Experimental Investigations*, **2015**, 6(3): s.331-336
90. **Peng J, Tan C, Roberts GJ, Nikolaeva O, Zhang Z ve ark.** tBid elicits a conformational alteration in membrane-bound Bcl-2 such that it inhibits Bax pore formation. *J Biol Chem*, **2006**, 281(47): s.35802-35811
91. **Pisoschi AM, Pop A.** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*, **2015**, 97: s.55-74
92. **Poljsak B, Suput D, Milisav I.** Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*, **2013**, 2013: s.956792
93. **Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R ve ark.** Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*, **2014**, 2014: s.761264
94. **Rao RS, Moller IM.** Pattern of occurrence and occupancy of carbonylation sites in proteins. *Proteomics*, **2011**, 11(21): s.4166-4173
95. **Reed JC.** Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, **2000**, 157(5): s.1415-1430
96. **Rehman A, Nourooz-Zadeh J, Moller W, Tritschler H, Pereira P ve ark.** Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett*, **1999**, 448(1): s.120-122
97. **Riley PA.** Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*, **1994**, 65(1): s.27-33
98. **Rytomaa M, Kinnunen PK.** Evidence for two distinct acidic phospholipid-binding sites in cytochrome c. *J Biol Chem*, **1994**, 269(3): s.1770-1774

99. Sağlık Bakanlığı RSHMB, Halk Sağlığı Okulu. Ulusal Hastalık Yüğü ve Maliyet Etkinliğı Projesi, Hastalık Yüğü Final Raporu. 2004,
100. Salamon Z, Tollin G. Surface plasmon resonance studies of complex formation between cytochrome c and bovine cytochrome c oxidase incorporated into a supported planar lipid bilayer. I. Binding of cytochrome c to cardiolipin/phosphatidylcholine membranes in the absence of oxidase. *Biophys J*, 1996, 71(2): s.848-857
101. Salamon Z, Tollin G. Interaction of horse heart cytochrome c with lipid bilayer membranes: effects on redox potentials. *J Bioenerg Biomembr*, 1997, 29(3): s.211-221
102. Sander CS, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol*, 2003, 148(5): s.913-922
103. Schwarz KB, Kew M, Klein A, Abrams RA, Sitzmann J ve ark. Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*, 2001, 46(10): s.2173-2178
104. Scofield RH, Kurien BT, Ganick S, McClain MT, Pye Q ve ark. Modification of lupus-associated 60-kDa Ro protein with the lipid oxidation product 4-hydroxy-2-nonenal increases antigenicity and facilitates epitope spreading. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38(6): s.719-728
105. Sell DR, Strauch CM, Shen W, Monnier VM. 2-amino adipic acid is a marker of protein carbonyl oxidation in the aging human skin: effects of diabetes, renal failure and sepsis. *Biochem J*, 2007, 404(2): s.269-277
106. Senturker S, Karahalil B, Inal M, Yilmaz H, Muslumanoglu H ve ark. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *FEBS Lett*, 1997, 416(3): s.286-290
107. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(4): s.a008714
108. Shen Z, Ye C, McCain K, Greenberg ML. The Role of Cardiolipin in Cardiovascular Health. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: s.891707
109. Shidoji Y, Hayashi K, Komura S, Ohishi N, Yagi K. Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 264(2): s.343-347
110. Shimoda R, Nagashima M, Sakamoto M, Yamaguchi N, Hirohashi S ve ark. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res*, 1994, 54(12): s.3171-3172
111. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004, 306(5698): s.990-995
112. Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, 2006, 13(3): s.129-142
113. Smith C, Marks AD, Lieberman M. *Marks' Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach*. 2th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2005, s.439-450
114. Spooner PJ, Duralski AA, Rankin SE, Pinheiro TJ, Watts A. Dynamics in a protein-lipid complex: nuclear magnetic resonance measurements on the headgroup of cardiolipin when bound to cytochrome c. *Biophys J*, 1993, 65(1): s.106-112
115. Strasser A, Harris AW, Huang DC, Krammer PH, Cory S. Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J*, 1995, 14(24): s.6136-6147
116. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: s.217-245
117. Sun C, Jin W, Shi H. Oligomeric proanthocyanidins protects A549 cells against H₂O₂-induced oxidative stress via the Nrf2-ARE pathway. *Int J Mol Med*, 2017, 39(6): s.1548-1554
118. Surget S, Khoury MP, Bourdon JC. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *Onco Targets Ther*, 2013, 7: s.57-68
119. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(9): s.621-632
120. Tesfaigzi Y. Roles of apoptosis in airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34(5): s.537-547
121. Tian HF, Feng JM, Wen JF. The evolution of cardiolipin biosynthesis and maturation pathways and its implications for the evolution of eukaryotes. *BMC Evol Biol*, 2012, 12: s.32
122. Tsao SM, Yin MC. Antioxidative and antiinflammatory activities of asiatic acid, glycyrrhizic acid, and oleanolic acid in human bronchial epithelial cells. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(12): s.3196-3204
123. Tseng CY, Wang JS, Chang YJ, Chang JF, Chao MW. Exposure to High-Dose Diesel Exhaust Particles Induces Intracellular Oxidative Stress and Causes Endothelial Apoptosis in Cultured In Vitro Capillary Tube Cells. *Cardiovasc Toxicol*, 2015, 15(4): s.345-354

124. Ushmorov A, Ratter F, Lehmann V, Droge W, Schirmmacher V ve ark. Nitric-oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome C release. *Blood*, **1999**, 93(7): s.2342-2352
125. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*, **2009**, 7(1): s.65-74
126. Varley JM, Evans DG, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *Br J Cancer*, **1997**, 76(1): s.1-14
127. Velculescu VE, El-Deiry WS. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem*, **1996**, 42(6 Pt 1): s.858-868
128. Wang P, Shao BZ, Deng Z, Chen S, Yue Z ve ark. Autophagy in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*, **2018**, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.01.001>
129. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **2001**, 15(22): s.2922-2933
130. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A ve ark. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*, **2000**, 14(16): s.2060-2071
131. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V ve ark. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, **2001**, 292(5517): s.727-730
132. Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, **2005**, 17(6): s.617-625
133. World Health Organisation WHO. Asthma. Erişim: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/asthma>. **2016**. Erişim tarihi: 04.07.2018
134. World Health Organisation WHO. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Erişim: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)). **2016**. Erişim tarihi: 04.07.2018
135. Wright C, Iyer AKV, Yakisich JS, Azad N. Anti-Tumorigenic Effects of Resveratrol in Lung Cancer Cells Through Modulation of c-FLIP. *Curr Cancer Drug Targets*, **2017**, 17(7): s.669-680
136. Wu J, Shi Y, Asweto CO, Feng L, Yang X ve ark. Fine particle matters induce DNA damage and G2/M cell cycle arrest in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Environ Sci Pollut Res Int*, **2017**, 24(32): s.25071-25081
137. Wu XF, Wang LY, Yi JH, Lei J, Ao YH ve ark. [Protective effect of paeoniflorin against PM2.5-induced damage in BEAS-2B cells]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, **2018**, 38(2): s.168-173
138. Yarosz EL, Chang CH. The Role of Reactive Oxygen Species in Regulating T Cell-mediated Immunity and Disease. *Immune Netw*, **2018**, 18(1): s.e14
139. Yethon JA, Epand RF, Leber B, Epand RM, Andrews DW. Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *J Biol Chem*, **2003**, 278(49): s.48935-48941
140. Yi S, Zhang F, Qu F, Ding W. Water-insoluble fraction of airborne particulate matter (PM10) induces oxidative stress in human lung epithelial A549 cells. *Environ Toxicol*, **2014**, 29(2): s.226-233
141. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S ve ark. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*, **1999**, 400(6747): s.886-891
142. Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ ve ark. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol*, **1999**, 154(5): s.1423-1429
143. Ziskoven C, Jager M, Zilkens C, Bloch W, Brixius K ve ark. Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation? *Orthop Rev (Pavia)*, **2010**, 2(2): s.e23

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Hatay'ın İskenderun ilçesinde doğdu. Lisans eğitimini 2009 yılında, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji anabilim dalında; yüksek lisans eğitimini 2011 yılında, Mustafa Kemal Üniversitesi, Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi, Biyokimya (Tıp) anabilim dalında tamamladı. 2013 yılında, Mustafa Kemal Üniversitesi, Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi, Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) anabilim dalında doktora eğitimine başladı.

