

77 7333

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEMEL TIP BİRİMLERİ BÖLÜMÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
Prof. Dr. Biltan Ersöz

STRESİN PEROKSİZOM PROLİFERASYONUNA ETKİSİ



UZMANLIK TEZİ
Dr. Püreda Yazıcı

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Fatma Z. Kutay

İZMİR 2005

Teşekkür;

Ege Üniversitesi Biyokimya AD.'da sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim boyunca deneyimlerini, desteğini, zamanını ve sabrını esirgemeyen tez hocam sayın Prof. Dr Fatma Z. Kutay'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimimin gelişmesi konusunda değerli bilgilerini benden esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Biltan Ersöz başta olmak üzere Prof. Dr. Gülriz Menteş'e, Prof. Dr. Taner Onat'a, Prof. Dr. Necla Nişli'ye, Prof. Dr. Eser Yıldırım Sözmen'e, Prof. Dr. Tijen Tanyalçın'a, Prof. Dr. Nevbahar Turgan'a, Doç. Dr. Gülinnaz Alper'e, Doç. Dr. Ferhan Sağın ve Doç. Dr. Hakan Aydın'a;

Klinik uygulamalardaki deneyimlerinden ve bilgilerinden faydalandığım desteğini ve ilgisini her zaman arkamda hissettiğim kıymetli hocam Prof. Dr. Oya Bayındır'a ve diğer hocalarım Prof. Dr. Dilek Özmen, Prof. Dr. Sara Habif, Prof. Dr. Işıl Mutaf'a ve;

Sıcak bir çalışma ortamı sağlayan uzman, asistan ve diğer çalışma arkadaşlarıma;

Desteklerini esirgemeyen aileme;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Püreda Yazıcı

Nisan 2005

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ

2. GENEL BİLGİLER

- 2.1. Peroksizom Proliferatörü Aktive edici Reseptör (PPAR)'ün yapısı
- 2.2. PPAR'nin gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki anahtar rolleri
- 2.3. PPAR ligandları
- 2.4. PPAR 'nin lipit metabolizmasını düzenlemelerindeki rolü
- 2.5. PPAR 'nin hücre farklılaşmasındaki rolü
- 2.6. PPAR' nin diyabet patofizyolojisindeki rolü
- 2.7. PPAR' nin inflamasyondaki rolü ve kardiyovasküler sistem(KVS)
- 2.8. PPAR 'nin kanser patofizyolojisindeki rolü
- 2.9. PPAR γ ligandları ve kanser
- 2.10. PPAR γ ligandları ve iskemi
- 2.11. Stres ve peroksizomlar
- 2.12. Açıl-KoA oksidaza genel bakış

3. ARAÇ-GEREÇ VE YÖNTEM

- 3.1. Stres modeli
- 3.2. Serum kortikosteron ölçümü
 - 3.2.1. Gerekli malzemeler
 - 3.2.2. Yöntem
- 3.3. KC dokusunun homojenizasyonu
- 3.4. Katalazın spesifik aktivite ölçümü
 - 3.4.1. Gerekli malzemeler
 - 3.4.2. Yöntem

3.5. Açıl-KoA oksidazın spesifik aktivite ölçümü

3.5.1. Açıl-KoA oksidaz enzimi hakkında genel bilgi

3.5.2. Gerekli malzemeler

3.5.3. Yöntem

3.5.4. Yöntemin standardizasyonu

3.6. Doku protein ölçümü

3.6.1. Gerekli malzemeler

3.6.2. Yöntem

4. BULGULAR

4.1. Serum kortikosteron sonuçları

4.2. Karaciğer katalaz spesifik aktivitesi sonuçları

4.3. Karaciğer Açıl KoA oksidaz spesifik aktivitesi sonuçları

4.4. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi

5. TARTIŞMA

5.1. Stres ve kortikosteron ilişkisi

5.2. İmmobilizasyon stres modeli ve kortikosteron ilişkisi:

5.3. Stres ve peroksizom proliferasyonu

6. ÖZET

7. SUMMARY

8. KAYNAKLAR

9. KISALTMALAR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1966'da Christian de Duve peroksizomların izolasyon ve idantifikasyonunu gerçekleştirmiş ve Nobel ödölüne layık görölmüştür. Ayrıca peroksizomların katalaz ve çeşitli oksidatif enzimleri içerdiğini de saptamışlardır (1).

Peroksizomlar; bir çok ara metabolizmada önemli fonksiyonlara sahiptir (1): En önemli olarak H₂O₂ oluşumu yıkılımı ve oksidatif metabolizma, uzun zincirli yağ asitlerinin (YA) ̢ oksidasyonu, karaciğer (KC)'de safra asiti, beyin ve kalpde plazmalojen sentezi, aminoasit (AA) ve pürin katabolizması, ilaç ve ksenobiyotik metabolizması, kolesterol ve dolikol sentezi ve gliksilat metabolizması bunlara örnek olarak verilebilir (1).

1966'dan beri peroksizomlar konusunda büyük gelişmeler yaşanmış ve Peroksizom Proliferatörü Aktive edici Reseptör (PPAR)'ler tanımlanmıştır. PPAR'lere bağlanan substratlar peroksizomal enzimlerde indüklenmeye yol açarken peroksizom volümünü de artırmaktadırlar (5).

PPAR'lerin lipit metabolizması, hücre farklılaşması, apoptoz ve inflamasyon gibi normal veya kanser, diyabet, obesite gibi patolojik bir çok süreçte sayısız genin indüklenmesine neden olan bir grup nükleer hormon reseptör ailesi olduğu anlaşılmıştır (2).

Bu nükleer reseptörlerin ̑, ̢, ̣, ̤ gibi farklı izoformları tanımlanmıştır. Farklı fizyolojik fonksiyonları farklı ligand aktivasyon profillerinden ve özel doku ekspresyonlarından kaynaklanmaktadır (2).

Hipolipidemik ajanlar olarak sıkça kullanılan fibratlar PPAR ̑'yı indüklerken, anti-diyabetik tiazolidinoidler (TZD) 'ler PPAR ̣'nın potent aktivatörleridir (4). Hakkında daha fazla bilgiye sahip olduğumuz ̑ ve ̣ izoformları olup ̢ ve ̤ izoformları daha az önemli gibi görünmektedir.

PPAR ̑ lipit metabolizmasının düzenlenmesinde (5) ve sıçanlarda KC kanser oluşum sürecindeki etkisiyle (10, 2) ön plana çıkarken, PPAR ̣, adipozit

diferansiyasyonu (7), dokuların insülin duyarlılığını artırması yönüyle (15) diyabet patogenezindeki önemiyle ve bir çok kanser için anti-kanserojen (17) etkisiyle ön plana çıkmaktadır.

Strese hormonal yanıt sempatik sinir sistemi tarafından katekolaminlerin, hipotalamo-pituiter-adrenal aksis aktivasyonu üzerinden adrenal medulladan glikokortikoidlerin salınımıdır (96).

Son yıllarda, çeşitli çalışmalarda PPAR- α geninin transkripsiyonel düzeyde glikokortikoidler tarafından regüle edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, stresin peroksizom indüksiyonuna neden olduğunu bildiren az sayıda çalışma da mevcuttur (111, 112).

Lemberger ve arkadaşlarının bu amaçla oluşturdukları immobilizasyon stres modelinde PPAR α geninin karaciğerde indüklenmesi gerçekleşirken hipokampusta böyle bir değişim izlenmemiştir. Sentetik glikokortikoid deksametazonun erişkin sıçanlara injeksiyonuyla karaciğerde PPAR α geni benzer şekilde indüklenmiştir. Anti-glikokortikoid olan RU 486 kullanımıyla stres bağımlı indüksiyon inhibe olmuştur. Buna ek olarak bulgularına göre; karaciğer PPAR α mRNA ve protein düzeyleri dolaşan kortikosteroid düzeylerine paralel olarak diüurnal bir ritmi takip etmektedir (111).

AMAÇ:

Bizim çalışmamızda; stresin peroksizomlar üzerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla sıçanlarda oluşturulan immobilizasyon stres modelinde stres göstergesi olarak, sıçanlardaki temel steroid olan kortikosteronun serum düzeyleri; peroksizom proliferasyon göstergesi olarak da karaciğer homojenatlarında peroksizomal enzim olan katalaz ve açil-KoA oksidazın spesifik aktiviteleri tayin edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Peroksizomlar; eritrositler hariç tüm memeli hücrelerinde bulunan bir çok fonksiyonu bir arada yürüten organellerdir.

1950'lerde fare böbrek hücrelerinde elektron mikroskopunda saptandıklarında "microbody" ismi ile tanımlanmışlardır. Daha sonra fare KC hepatositlerinde yuvarlak veya oval olarak yaklaşık 0.5 µm çapta gözlemlenmiştir (3). KC hücrelerinde peroksizomlar hücre volümünün %2.4'ünü kaplamaktadır. Bu organeller tek bir membran tarafından çevrilmiştir. DNA ve ribozomları yoktur (62). Sitoplazmadan aldıkları protein ve lipidleri içerirler.

1966'da De Duve ve Baudhuin hidrojen peroksit metabolizmasına katkısından ötürü bu organellere peroksizom ismini vermişlerdir. 1966'da Christian de Duve peroksizomların izolasyon ve idantifikasyonunu gerçekleştirmiş ve bu çalışması ile Nobel ödülüne layık görülmüştür. Ayrıca katalaz ve çeşitli oksidatif enzimleri içerdiğini de saptamışlardır (1). Daha sonra De Duve ve Lazarow karaciğer (KC) peroksizomlarının tıpkı mitokondri gibi bütün bir yağ asitleri β oksidasyon siklüsünü içerdiğini saptamışlardır (3).

Peroksizomlar moleküler O₂ ve H₂O kullanarak oksidatif reaksiyonları gerçekleştirmektedirler.



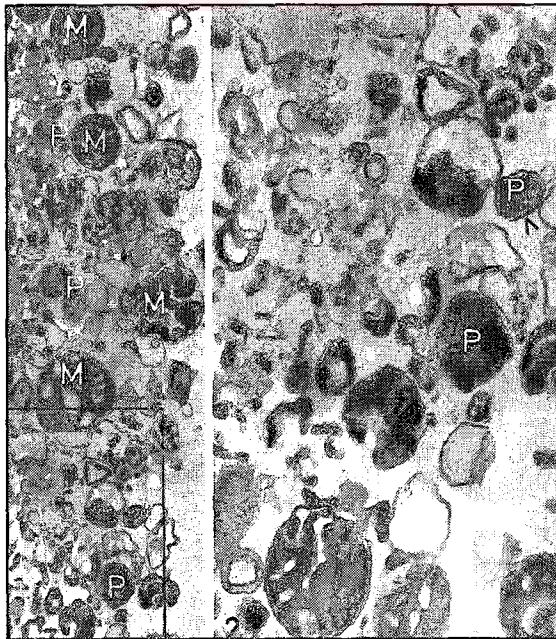
Bu reaksiyonda oluşan H₂O₂, katalaz etkisi ile suya dönüştürülürken fenol, formik asit, formaldehit, alkol gibi bir çok madde oksitlenir. Katalaz peroksizomlarda bulunan en önemli enzimdir (1).

Memeli peroksizomlarının metabolik yollarının başında yağ asidi oksidasyonu gelir. Lazarow ve Duve 1976'da yağ asidi oksidasyon sisteminin varlığını göstermişlerdir. Peroksizomal membranın sitozolik yüzünde yağ asitlerinin oksidasyonunda görevli enzim olan açil-KoA sentetaz bulunur. Aynı enzimin endoplazmik retikulum membranında da bulunduğu bildirilmiştir (63). Mitokondri ise bu çok uzun zincirli açil-KoA sentetaz aktivitesinden yoksundur. Bu nedenle

çok uzun zincirli yağ asitlerini oksitleyemez. Açıl KoA şeklinde aktiflenen yağ asitleri bilinmeyen bir mekanizma ile peroksizomal matriks içine taşınırlar ve açıl KoA oksidaz ile oksitlenirler (63, 64). Mitokondri yağ asidi oksidasyonunda yer alan enzim açıl KoA dehidrojenaz iken, peroksizomlarda yer alan enzim açıl KoA oksidazdır. Her iki enzim de prostetik grup olarak FAD içermektedir. Ancak peroksizomlarda enzime bağlı FADH₂'nin reoksidasyonu, moleküler O₂ ile doğrudan etkileşmesi sonucunda H₂O₂ vererek gerçekleşir (63, 65, 66). 1990 yılında peroksizom proliferatörleri tarafından indüklenen ve indüklenmeyen olmak üzere 2 tip açıl KoA oksidaz varlığı saptanmıştır (65, 67)

Tablo 1: Açıl KoA oksidaz tipleri

Açıl KoA oksidaz tipleri	Etkili olduğu substratlar
Palmitoil KoA oksidaz	Orta-uzun ve çok uzun yağ asitlerine etkili Dikarboksilik yağ asitlerine etkili Prostaglandinlere etkili
Pristanoil KoA oksidaz	Pristanik asit gibi 2-metil dallı yağ asitlerine etkili
Trihidroksi kolestanoil KoA oksidaz	Safra asiti ara maddelerinin KoA esterlerine etkili



Şekil 1: Peroksizomun elektron mikroskopik görünümü (11)

Peroksizomların; bir çok ara metabolizmada önemli fonksiyonları vardır (1):

- ⇒ En önemli olarak H_2O_2 oluşumu yıkılımı ve oksidatif metabolizma
- ⇒ Uzun zincirli yağ asitlerinin (YA) β oksidasyonu (lipit yıkımı)
- ⇒ KC'de safra asiti, beyin ve kalpde plazmalojen sentezi (lipit sentezi)
- ⇒ Aminoasit (AA) ve pürin katabolizması
- ⇒ İlaç ve ksenobiyotik metabolizması (1)
- ⇒ Kolesterol ve dolikol sentezi
- ⇒ Gliksilat metabolizması

2.1. Peroksizom Proliferatörü Aktive edici Reseptör (PPAR)'ün yapısı

Peroksizomlar etkilerini PPAR'ler aracılığıyla gösterirler. PPAR'ler tiroit, steroid ve retinoik asit gibi nükleer hormon reseptör ailesine mensuptur. PPAR agonistleri, PPAR'nin ligand bağlayan domainine bağlandığında hücre içi sinyaller başlatılarak ilgili genlerin aktivitesi düzenlenir.

PPAR'ler lipit metabolizması, hücre farklılaşması, apoptoz ve inflamasyon gibi normal veya kanser, diyabet, obesite gibi patolojik bir çok süreçte sayısız genin indüklenmesine neden olan bir grup nükleer hormon reseptör ailesidir (2).

Bu nükleer reseptörlerin α , β , γ , δ gibi farklı izoformları tanımlanmıştır. Farklı fizyolojik fonksiyonları farklı ligand aktivasyon profillerinden ve özel doku spesifitelerinden kaynaklanır. Hakkında daha fazla bilgiye sahip olduğumuz formlar, α ve γ izoformları olup β ve δ izoformları daha az önemli gibi görünmektedir. PPAR γ 'nın farklı promotorlar kullanan farklı bağlanma bölgelerine sahip γ_1 , γ_2 ve γ_3 , γ_4 izoformları mevcuttur (16). PPAR γ_2 PPAR γ_1 'den amino terminal ucunda ek olarak 28 AA bulundurması yönüyle farklıdır. PPAR γ_2 'nin ligand bağımsız aktivasyon domaini PPAR γ_1 'in ligand bağımsız aktivasyon domaininden 5-10 kat daha etkilidir. İnsan adipozitlerinin insülinle stimülasyonu hem γ_1 hem γ_2 geninin ifade edilmesini artırmaktadır. Öyle ki besinsel faktörler ve obesite PPAR γ_2 geni üzerinden etkili olup gen düzeylerini inhibisyona uğratmaktadır (17).

PPAR α ; yüksek oranda KC, kalp, miyozit, enterosit ve böbrek proksimal tübül hücrelerinde bulunurken PPAR β ve δ yaygın doku dağılımında bulunurlar. PPAR γ geni ise yüksek oranda yağ dokusunda ve immün sistemde ifade edilir. PPAR γ 1 düşük miktarda tüm dokularda bulunurken, PPAR γ 2 baskın olarak adipozitlerde bulunur (6).

Tablo 2: PPAR'nin doku dağılımları (4)

izoform	KC	böbrek	barsak	dalak	adipozit	önemi
PPAR α	++++	++	++++	+	-	<u>lipit metabolizması</u> sıçanlarda KC CA'nın indüklenmesi enfeksiyonun düzenlenmesi
PPAR β/δ	++	++	+++	++	-	embriyo implantasyonu
PPAR γ	-	+/-	++	+++	++++	<u>diyabet patogenezi</u> <u>adipozit diferansiyasyonu</u> anti-kanserojen enfeksiyonun düzenlenmesi

PPAR α ; ilk keşfedilen alt grup olup karaciğerde lipit metabolizmasının düzenlenmesinde merkezi öneme sahiptir. PPAR α , yağ asitlerinin alınmasında, bağlanmasında, aktifleştirilip okside edilmesinde; keton cisimlerinin ve apolipoproteinlerin (apo AI, apo AII) sentezinde; aminoasitlerin deamine edilmesinde ve glikoneojenezdeki genlerin ifade edilmesindeki süreçlerde etkilidir. Benzer şekilde PPAR α ligandları apo A1 aracılığıyla kolesterol çıkışıını indüklerler. PPAR α geni hasarlandırılan sıçanlar canlılıklarını korurlarken, ilginç olarak PPAR α -/- sıçanlar inflamatuvar yanıtta artış göstermişlerdir. In vitro ve klinik sonuçlarda PPAR α ligandları olan fibratların kullanımının kalbi koruyucu ve inflamasyonu önleyici etkileri öngörüldüğü belirtilmektedir. PPAR α geni vasküler endotelde, vasküler düz kas hücrelerinde, monosit ve makrofajlarda ifade edilmektedir. PPAR α ligandları inflamatuvar cevabı inhibe ederek, düz kas hücre göçünü, proliferasyonunu, matriks metalloproteinaz genini ve plazma

fibrinojen düzeylerini inhibe etmektedir. Moleküler düzeylerde bu NFκB yolağıyla ilişkili olabilir (60).

PPAR β ve δ ile ilgili ileri çalışmalara gereksinim vardır. Diğerlerine benzer şekilde PPAR β ve δ lipit metabolizmasında, hücre proliferasyonunda ve inflamatuvar yanıtta düzenleyici etkilere sahiptir. PPAR δ kolon kanserinde, keratinosit diferasyonunda ve inflamasyon sürecinde etkilidir.

PPAR γ'nin en bilinen yönü insülin duyarlılığını artırmasıdır. Tiazolidinoid grubu ilaçlar PPAR γ agonistleri olup diyabet tedavisinde etkilidirler. Bunun dışındaki kullanım alanları da gelişime açıktır. PPAR γ1 yaygın dağılım gösterirken, PPAR γ2'nin daha ziyade beyaz ve kahverengi yağ dokusunda yüksek düzeyde ifade edildiği belirtilmiştir. PPAR γ geni pre-adipozitin adipozitelere diferansiyasyonu için gereklidir. Diğer PPAR izoformlarında olduğu gibi PPAR γ; lipit metabolizmasında, hücre proliferasyonunda ve inflamatuvar yanıtta düzenleyici etkilere sahiptir. Ayrıca vasküler ve kanser hücrelerinde de PPAR γ geni yüksek düzeylerde ifade edilmektedir. PPAR γ aktivasyonu; monositlerin makrofajlara dönüşümünü indüklerken lipit birikimine ve CD 36 ifade edilmesiyle köpük hücre oluşumuna aracılık etmektedir. Öyle ki son çalışmalarda; PPAR γ -/- hücrelerdeki monosit-makrofaj dönüşümü PPAR γ'nin monosit diferansiyasyonunda olmazsa olmaz koşul olmadığını göstermiştir oysa ki CD 36 düzeyleri indüklenmiştir. İn vivo ve in vitro çalışmalarda PPAR γ ligandları vasküler hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve inflamatuvar genlerin ifade edilmesini inhibe etmektedir. Sonuç olarak hayvan modellerinde balon sonrası restenoz ve ateroskleroz inhibe olmaktadır. PPAR γ'nin anti-inflamatuvar ve vasküler duvarı koruyucu etkileri anti-inflamasyon için kullandıkları reseptörler farklı olsa da PPAR α'ninkine benzemektedir (60).

PPAR α'nın etkisi karaciğer üzerinde iken; PPAR γ'nin etkisi yağ depolayan insüline duyarlı metabolik dokular üzerinedir.

Bir çok kanser tipinde (gastro intestinal sistem (GİS), merkezi sinir sistemi (MSS), meme, akciğer, prostat, tiroid kanserleri) PPAR γ ligandlarının apoptozisi indükleyerek çeşitli hücre tiplerinde terminal diferansiyasyonu

artırdığı saptanmıştır. Sentetik PPAR γ ligandlarıyla küçük bir grupta liposarkomun etkili tedavisinde klinik başarı elde edilmiştir. Fakat kolon kanserinde çelişkili veriler elde edilmiştir. PPAR γ ligandları ksenograft tümör oluşumunu etkili olarak inhibe ederken polip oluşumunu barsakta ve adenomatöz polipozis koli (APC) genetik sıçan modelinin kolonunda potansiyalize etmektedir. PPAR γ ligandları ksenograft modellerde tümör büyümesi için gerekli olan vaskülarizasyonu önlemektedir.

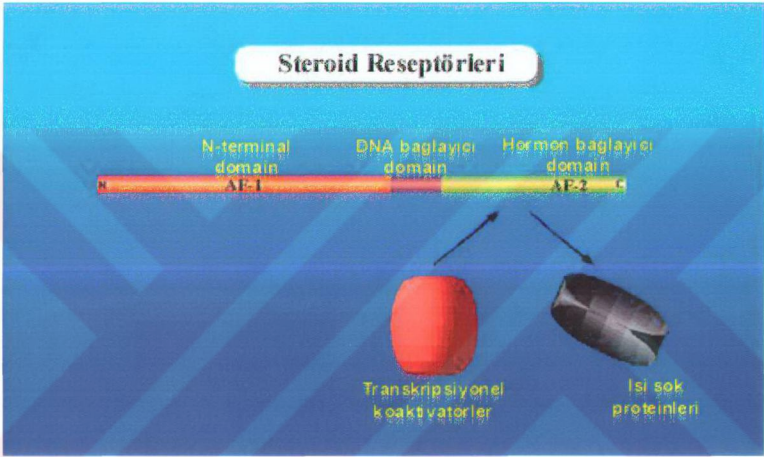
PPAR γ ligandları; bir çok inflamatuvar modelde (ülseratif kolit, romatoid artrit, allerjik ensefalomyelit, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı ve miyokard infarktüsü) etkili gibi görünmektedir. Makrofajlarda başlatılan çalışmalar güçlü bir şekilde göstermiştir ki; PPAR γ 'nın direk anti-inflamatuvar etkisi vardır ve bir çok pro-inflamatuvar sinyal yolağını (AP-1, NF κ B, STAT 1) baskılamaktadır. Anti-proliferatif ve anti-inflamatuvar özelliği sadece inflamatuvar hücrelerde (yardımcı T hücreleri, B lenfosit) değil inflamasyon alanındaki lokal stromal hücrelerde de gözlemlenmektedir. PPAR γ 'nın hedef aldığı alan (p21, aktive T hücreleri için nükleer faktör) bilinse de sıçanlardaki -/- hücrelerde anti-proliferatif ve anti-inflamatuvar etkilerin oluşabilmesi PPAR γ ligandlarının PPAR γ 'dan bağımsız bir özelliği olduğunu düşündürebilir.

PPAR γ -/- sıçanlar iki bağımsız ölümcül faz geliştirmiştir. PPAR γ eksikliği embriyonun gelişimi sırasında trofoblast diferansiyasyonunu ve plasental vaskülarizasyonu inhibe ederek miyokardiyumda şiddetli incelmelere yol açıp ölümlerle sonuçlandırmıştır. Erkeklerde PPAR γ mutasyonlarının varlığında hastalar şiddetli insülin rezistansına ve metabolik sendrom X'e maruz kalmaktadır (59).

2.2. PPAR' nin gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki anahtar rolleri (2)

PPAR γ 'nın diğer nükleer reseptör süper ailesi gibi 3 fonksiyonel domaini mevcuttur: Fosforilasyon basamağının gerçekleştiği N-terminal domain, DNA ve ligand bağlayan domainler (Şekil 2).

Ligandın, PPAR molekülünün ligand bağlayan domainine bağlanması AF 2 (aktivasyon fonksiyonu) domaininde konformasyonel değişikliğe neden olur. Daha sonra ligand bağlı PPAR diğer transkripsiyon faktörleriyle (9-cis retinoikasıit reseptör=RxR) bağlanarak heterodimerik bir kompleks oluşturur (Şekil 3). Bu heterodimerik kompleks PPAR 'nın DNA bağlayan domaini üzerinden DNA üzerindeki hormon response elemente (HRE=PPRE) bağlanır. Bunun sonucunda farklı genlerin transkripsiyonu aktiflenmiş olur.

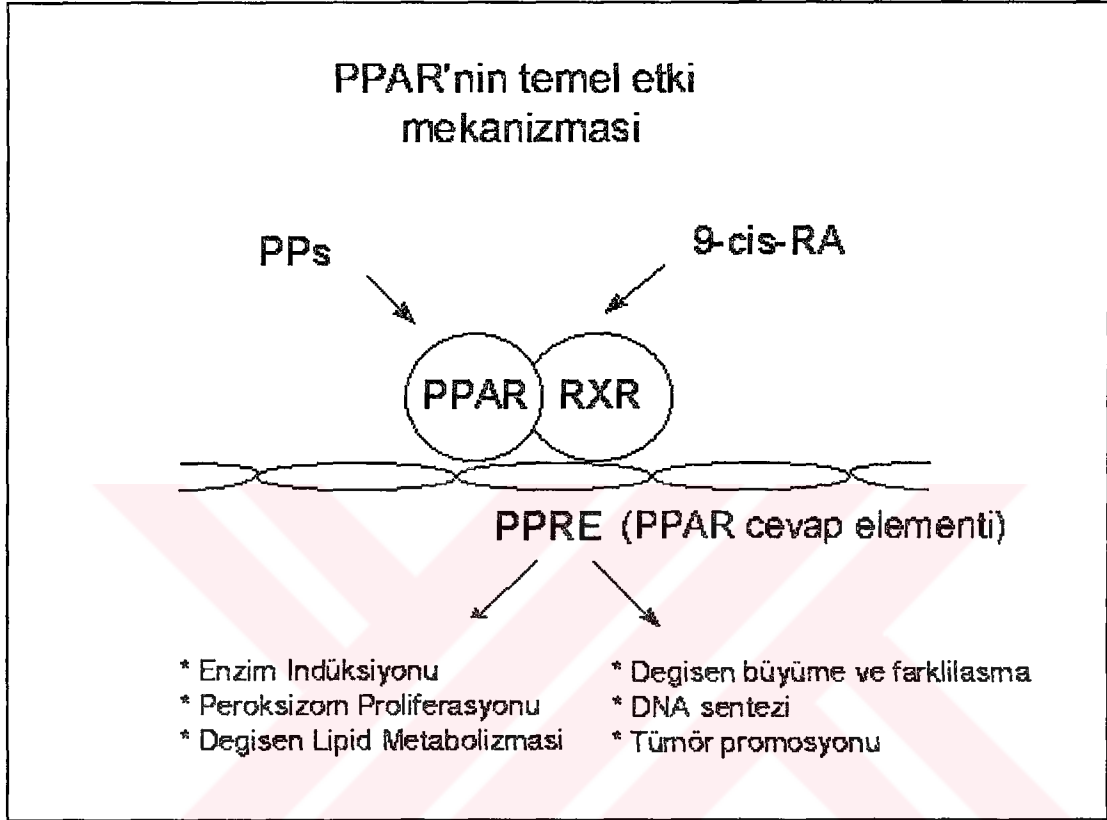


Şekil 2: PPAR benzeri steroid reseptörleri fonksiyonel domainleri

Ko-regülatörler, ko-aktivatör veya ko-represör olabilir, nükleer reseptör kompleksine tutunarak aktivasyon veya inhibisyon yaparlar.

PPAR γ 'nın ifade edilişi N terminal bölgede bulunan A/B domaininin serin kalıntısının fosforillenmesiyle deprese olurken, mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAP) ailesinden olan hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinaz (ERK) tarafından düzenlenir. Ek olarak MAP kinaz ailesinin diğer bir üyesi c-jun N-terminal kinaz (JNK) PPAR γ 'nın serinini fosforilleyerek PPAR γ 'nın transkripsiyonel aktivitesini düşürür (60).

PPAR klonlanarak karakterize edilmiş; tiroid, steroid ve retinoik asit ile aynı gen ailesine sahip nükleer reseptörler oldukları kanıtlanmıştır. Tiroid hormonlarının PPAR ile benzer gen altgrupları tarafından düzenlenen lipid homeostazisinde çakışan metabolik etkileri olduğu bulunmuştur (14).



Şekil 3: Nükleer reseptörler

2.3. PPAR ligandları (Tablo 3) (4)

PPA'leri arasında birçok doğal ve sentetik ligand bulunur. Çeşitli poliansatüre yağ asitleri, PGD₂, PGJ₂, α₁ antitripsinin C-terminal fragmanı doğal olanlardır. Tiazolidinoid türevi anti-diyabetikler, fibratlar ve non-steroid-anti-inflamatuvarlar (NSAİD) peroksizom proliferasyonuna yol açan diğer sentetik türevler olup ve daha bir çok ilaç aynı etkiyi göstermektedir. Yalnız en güçlü PPA olarak hipolipidemik ilaçlar kabul edilmektedir.

Tablo 3: PPAR ligandları

KATEGORİ	İÇERİK	PPAR α	PPAR β/δ	PPAR γ	
Hipolipidemikler	Gemfibrozil	++	-	+	PPA içinde en güçlü etki
	Klofibrat	++	-	+	
	Siprofibrat	++	-	+	
	Fenofibrat	?	?	?	
	WY-14,643	+++	+	++	
	Nafenopin	++	?	?	
	Metilklofenapat	?	?	?	
	BR 931	?	?	?	
Antidiyabetikler (tiazolidionidler)	Englitazon	-	-	+	
	Pioglitazon	-	-	++	
	Ciglitazon	-	-	++	
	BRL 49653=	-	-	++++	
	Rosiglitazon	-	-	++++	
NSAID	Indometazin	+	-	+++	
	Ibuprofen	+	-	+	
	Fenoprofen	+++	-	+	
Sentetik araşidonikasit	ETYA	+++	-	+/-	
LTD4 antagonistleri	MK 571	++	?	?	
	LY -17188	++	?	?	
Sentetik prostoglandinler	Iloprost	++	++	?	
	Karboprostosiklin (CPGI)	++	++	?	
Fitalat esterleri	MEHP(monoetilhek silfalat) DEHP(dietil...) DEPA(.adipat)	+++	+	++	Zayıf etki
Solvent	TCA	+	?	?	
Steroid	DHEA				
Antiepileptik	Valproik asit				
Ürikozürükler					
Herbisitler	Laktofen Fomesafen				
<u>DOĞALLAR</u>					
PGD2					Anti- inflamatuvar Anti- neoplastik
PGJ2				+	Anti- inflamatuvar Anti- neoplastik
Poliansatüre YA'leri		++			
α 1 antitripsin		++		++	

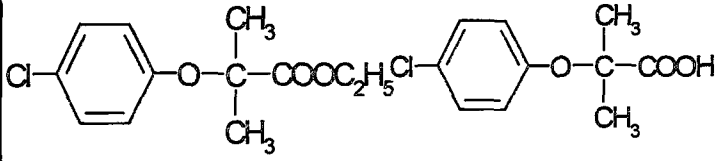
Bu ligandların bir kaçının sıçanlarda hepatokarsinojenik etkileri mevcut olup bu etki reseptörleri aktive etme şiddetleriyle korelidir. Bütün çalışmalar göz önüne alındığında; hepatokarsinojenik etkinin PPAR α üzerinden olduğu ortaya çıkmaktadır. Anti-diyabetiklerden TZD 'ler ise PPAR γ üzerine yüksek afinite göstermektedir. PPAR γ üzerine etkili olanlar adipozit diferansiyasyonlarına olan etkileri ile dikkat çekmektedir.

Lipit metabolizmalarına olan etkilerinden ötürü PPAR'nin aktiflenmesinin bir sonucu olarak serum kolesterol ve trigliserid düzeylerinde azalma ortaya çıkmaktadır.

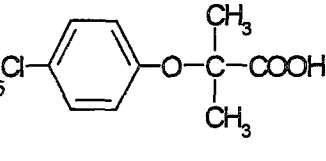
PPAR ligandlarının bazılarının benzer üç boyutlu yapıları mevcuttur. Hepsinin değilse de çoğunun ortak özellikleri karboksil (-COOH) grubu taşımalarıdır.



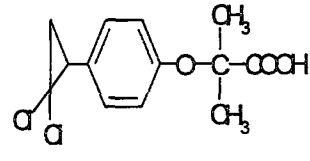
PPAR ligandları



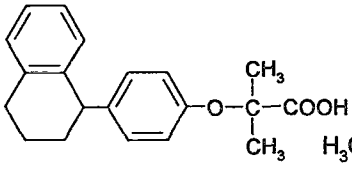
Klofibrat



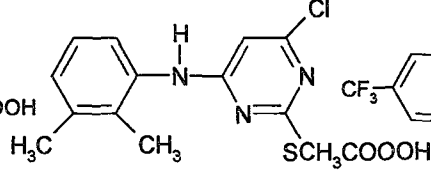
Klofibrik asit



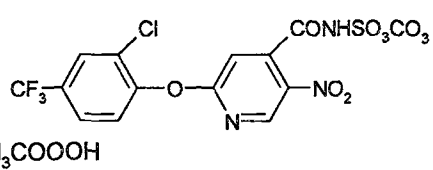
Siprofibrat



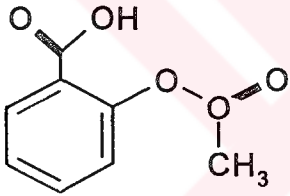
Nafenopin



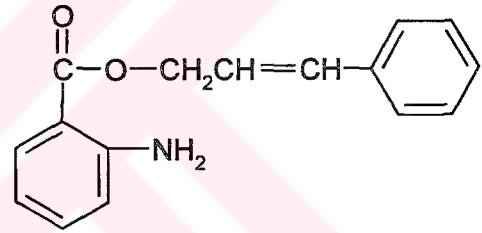
WY-14,643



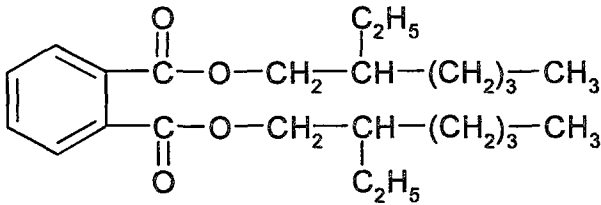
Fomesafen



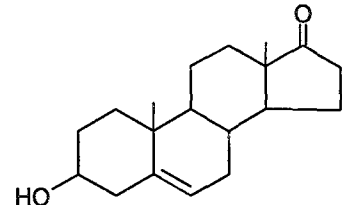
Asetilsalisilik asid



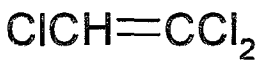
Sinnamil antranilat



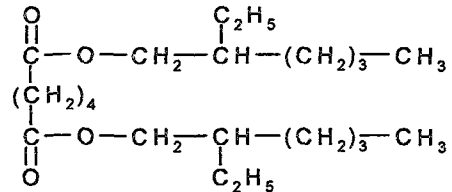
DEHP



DHEA



Trikloretilen



DEHA

Şekil 4: PPAR ligandlarının kimyasal formülleri

2.4. PPAR 'nin lipid metabolizmasını düzenlemelerindeki rolü (5)

Lipit metabolizmasının düzenlenmesini anlamada PPAR'nin peroksizomal β oksidasyon enzim genlerini kodladığının anlaşılması büyük bir aşamadır. Hele yağ asitlerinin gen modülatörü olarak PPA etkisiyle kendi enzimlerini düzenlemelerinin anlaşılması daha büyük bir gelişmedir.

Tablo 4: PPA'ların hücre organellerine etkileri

Peroksizom	Peroksizom volümü	++
	Peroksimal β -oksidasyon	+++
	Karnitin açil transferaz	+++
	H ₂ O ₂	0/-
	Katalaz	0/+
	Açil KoA hidrolaz	+
Mitokondri	Mitokondri volümü	0/+
	Düz zincirli YA'lerinin β oksidasyonu	+
	Dalı zincirli YA'lerinin β oksidasyonu	0
	Karnitin Açil transferaz	++
Mikrozom	Düz ER volümü	+
	Pürtüklü ER volümü	0/-
	Sito P450	0/-
	Sito P452	+++
Diğer etkiler	FABP	++
KC homojenatı	Açil KoA hidrolaz	++
	KC total KoA içeriği	+
	KC total karnitin içeriği	+
	KC total poliamin içeriği	+
	17 β hidroksisteroid DH	+

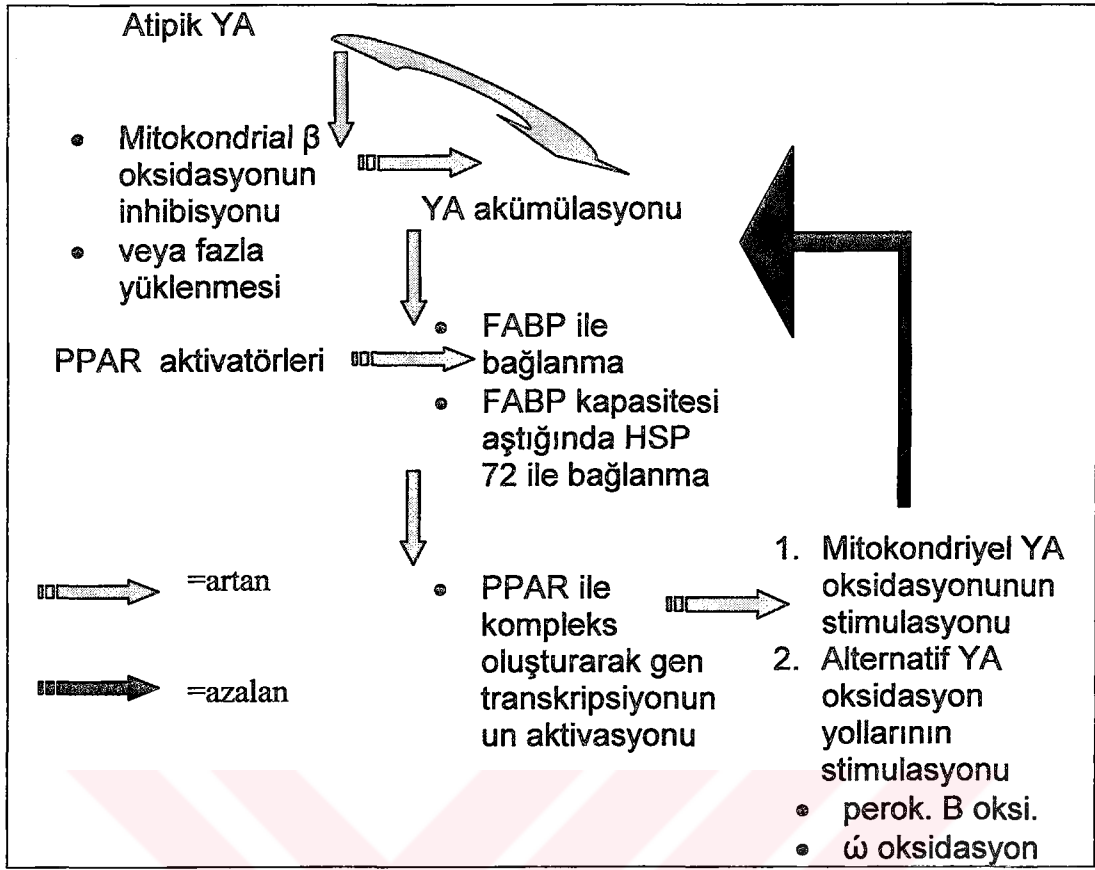
Anlaşıldığı üzere PP'u yağ asitleri, doğal veya ksenobiyotik ilişkili bileşiklerin intrasellüler akümülyasyona bağlı olarak indüklenen bir adaptasyon

mekanizmasıdır. Mitokondrideki major YA oksidasyonunun inhibisyonu veya fazla yüklenmesi PPA'una neden olmaktadır. PPA'u mitokondride düz zincirli YA'lerinin ve aracı proteinlerin sentezini de artırmaktadır. Yani kapasiteyi aşan, oksidasyona uğrayamayan YA'leri direk olarak peroksimal β oksidasyonu indirek olarak mitokondriyel β oksidasyon enzimlerinin gen transkripsiyonunu indüklemektedir. Sitozolik yağ asiti bağlayıcı protein (FABP) YA'lerini bağlayarak β oksidasyona uğramak üzere peroksizoma geçişine imkan tanımaktadır. Bu ve bunun gibi diğer (SCP2 = sterol taşıyıcı protein, ACBP = YA Açil-KoA bağlayıcı protein, HSP 72 = ısı şok proteini = PPBP = PP bağlayıcı protein) bağlayıcı proteinlerin sentezi de indüklenmektedir. FABP PPA'leriyle indüklenirken, HSP 72 = PPBP sadece olayı tetiklemektedir.

PPA'lerinin bir diğer etkisi yağ asitlerinin ω oksidasyonunu başlatan sitokrom P452 'nin indüklenmesidir.

PPA indüksiyonuyla LCAT, YA sentaz ve lipaz enzim sentezleri azalırken Apolipoprotein A serisi de Apo II hariç azalmaktadır.

Peroksizomların safra asiti sentezinde rol aldığı bilinmektedir. Ancak PPA'leri safra asiti sentezini indüklememektedir. Keton oluşumunda birkaç mekanizma geçerli olup ileri araştırmalara gerek vardır. Glikoneojenezde ise anahtar enzim olan fosfoenol piruvat karboksikinas enzim geni PPA'ler ile indüklenmektedir (5).



Şekil 5: PPAR'nin lipit metabolizmasına etkisi

2.5. PPAR'nin hücre farklılaşmasındaki rolü (7)

Vücutta beyaz yağ dokusunun gelişimi; geç gestasyonel dönemde ve postnatal ilk haftalarda olmaktadır. Adipoziterin prekürsörü olan preadipoziter lipit içermeyen mezenşimal hücrelerdir. Preadipoziter postgestasyonel aktive olup TG depolayabilmektedirler. Bu da yağ kitlesinin çevre koşullarına bağlı olarak yaşam boyunca geçirdiği modifikasyonları (sayı artışı veya ebatının büyümesi gibi) açıklayabilmektedir.

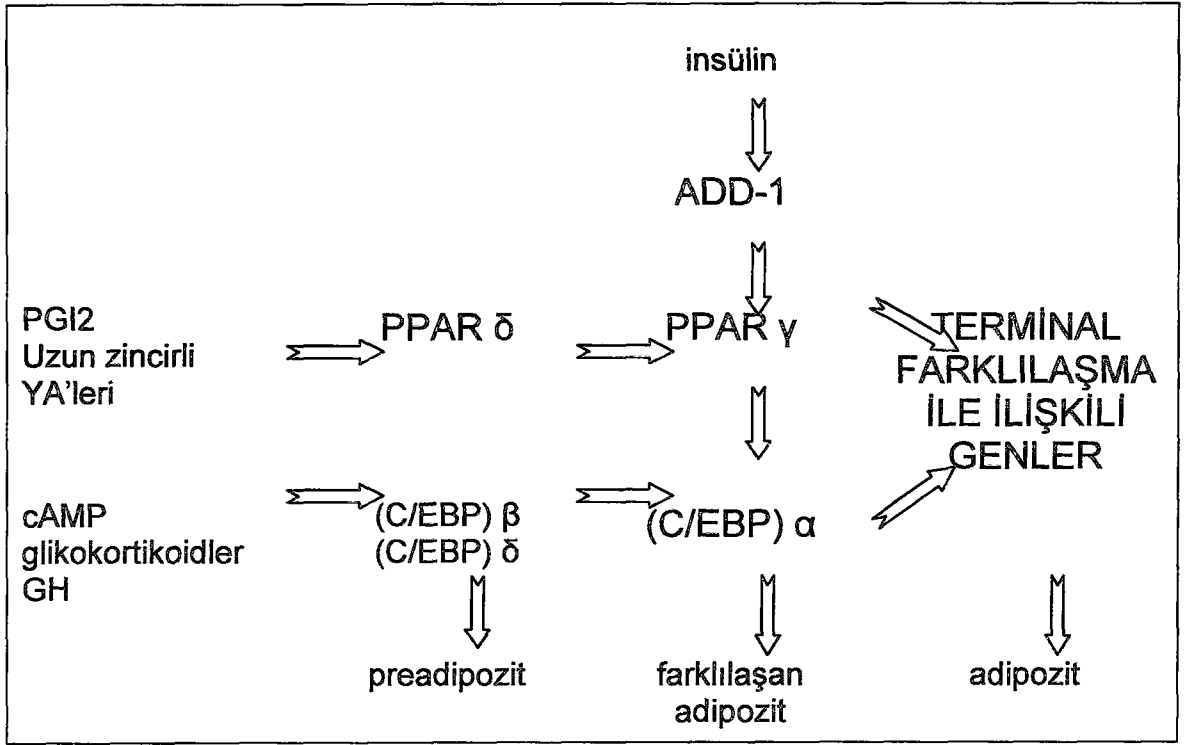
İlimli yani hipertrofik obesitede adipoziterin TG akümülayonu artarken, şiddetli yani hiperplastik obesitede ek olarak matür adipoziter sayısı da artmaktadır. Yağ veya KH'dan zengin beslenme ilk basamakta pre-adipoziterin proliferasyonuna (günler içinde) neden olurken, terminal dönemde (haftalar içinde) lipit depolanmasına neden olmaktadır

Bu gelişimi takip etmede erken göstergeler; lipoprotein lipaz gibi lipit metabolize edici enzimler, transkripsiyon faktörleri=(C/EBP)= β ve δ enhancer binding protein), PPAR δ iken hücrelerin klonal gelişimini takiben terminal diferansiyasyon döneminde; GPDH (gliserofosfat DH), ALBP (adipozit lipit bağlayıcı protein), FAT(yağ asiti translokazı), hormon duyarlı lipaz, ADD-1(adipozit saptama ve farklılaştırma faktörü, (C/EBP) α ve PPAR γ marker olarak kullanılabilir.

PPAR γ 'nın beyaz ve kahverengi yağ dokusunda bulundu bilinmektedir. PPAR γ 'nın aktivasyonu lipit dolu matür adipozitlerin apoptozunu uyarırken, küçük, göreceli olarak insüline daha duyarlı olan adipozit sayısında artmaya neden olmaktadır. (C/EBP) PPAR γ 'nın uyarılmasında aracı rol oynamaktadır. Ayrıca PPAR δ doğrudan adipozit diferansiyasyonunda etkili değilken PPAR γ 'nın etkisine aracı olmaktadır.

Belki de PPAR γ ve δ agonist ve antagonistleri kullanılarak yağ oluşum dengesi düzenlenebilir. Öyle ki; klinisyenler için diyet yapmadan ilaç indüklü obesitenin engellenmesi büyük adım olacaktır.

In vivo PPAR γ kullanımıyla yağ dokusunda, kas ve KC'de insülin duyarlılığı artmaktadır. PPAR γ hepatositlerde, myoblastlarda, meme ve kolon epiteli dahil daha bir çok hücre tipinde diferansiyasyonu uyarmaktadır. İnsan primer liposarkom hücrelerinin pioglitazon kullanımıyla terminal diferansiyasyonu indüklenmektedir. Pankreatik kanser hücre hatlarında PPAR γ agonistlerinin kullanımıyla CEA, E-cadherin, ve ALP gibi çeşitli diferansiyasyon göstergelerinin indüklendiği gösterilmiştir. PPAR γ aktivasyonu insan ve sıçan malign glioma hücrelerinde apoptoza neden olmak dışında rediferansiyasyon göstergesi olan N-cadherin düzeyini de artırmaktadır. Böylelikle malign hücrelerin kanserojen olmayan hücrelere veya daha az malign hücrelere rediferansiye olabilecekleri düşünülmektedir (17).



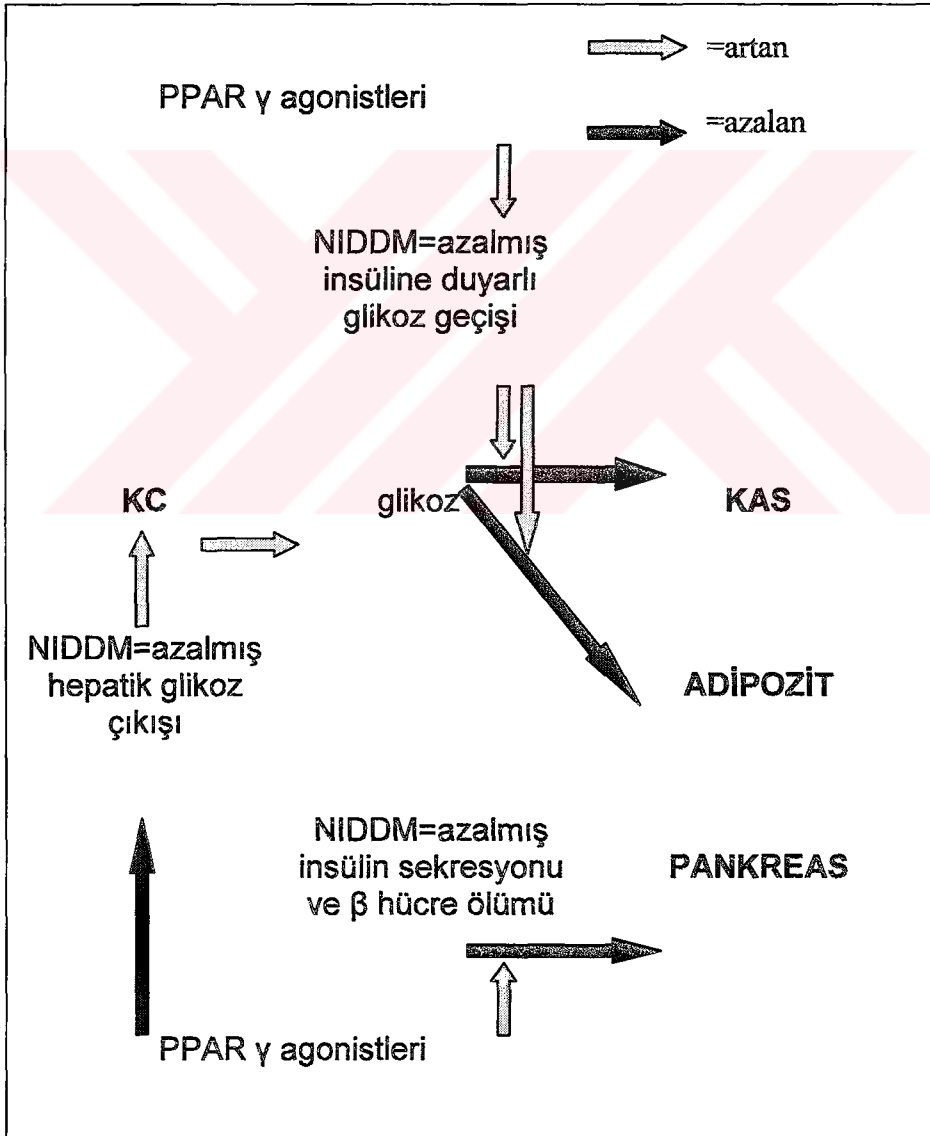
Şekil 6: PPA'ların adipozit diferansiyasyonuna etkisi

2.6. PPAR' nin diyabet patofizyolojisindeki rolü (2)

PPAR hedef genleri lipid metabolizmasında PPAR α ile, enerji homeostazisinde yağ dokusunda PPAR γ ile anahtar rol oynamaktadır. PPAR γ ; YA metabolizmasıyla, glikoz homeostazisiyle ve insülin sinyal yolları ile ilgili genleri düzenlemektedir. Adiponektin sentez ve sekresyonu insülin duyarlılığını artıran TZD ile in vivo ve in vitro olarak artırılmakta ve etkisine PPAR γ aracılık etmektedir. Adiponektin KC hücrelerinden glikoz salınımını azaltırken, periferik dokuların (kas ve yağ dokusu) glikoz alınımını artırarak serum glikoz düzeylerini düşürücü etki göstermektedirler (15).

Yaşam boyu süren, sürekli izlem ve tedavi gerektiren, akut ve kronik komplikasyonları nedeniyle hastanın yaşam kalitesini oldukça azaltan DM morbiditesi, mortalitesi ve topluma ekonomik yükü yüksek kronik metabolik bir hastalıktır. İnsülinin kısmen veya tamamen eksik ve/veya etkisiz olması ve glukozun vücutta yetersiz kullanımına bağlı hipergliseminin oluşturduğu bir grup metabolik bozukluk diyabetes mellitus sendromu olarak adlandırılmaktadır

Tip 1 diyabet insülin düzeyinin düşüklüğü ile karakterize iken, Tip 2 diyabet; iskelet kası ve yağ dokusu gibi periferik dokularda insülin direnciyle karakterize, genelde hiperinsülineminin eşlik ettiği bir hastalıktır. PPAR γ 'nın tiazolidinoid grubu ilaçlar gibi farmakolojik ligandları insülin aktivitesini artırmaktadır ve iskelet kası ve yağ dokusunda insülinle uyarılmış glikoz alınımı uyarılmaktadır. Kas ve yağ dokusunda insülin aracılı glikoz geçişinden sorumlu olan GLUT 4 ekspresyonu artmaktadır (8). Ek olarak hepatik glikoz çıkışının inhibisyonunu gerçekleştirmektedir. TG'leri ve plazma serbest YA'lerini düşürmektedir. TZD bağlayan PPAR'nin güçleriyle in vivo glikoz düşüşü arasında güçlü bir korelasyon vardır.



Şekil 7: PPAR γ agonistlerinin diyabet patolojisine etkisi

Az sıklıkta görülen PPAR γ mutasyonları şiddetli insülin rezistansı, parsiyel lökodistrofi, tip II diyabetes mellitus ve hipertansiyonla korele bulunmuştur (13, 16). Nadir görülen PPAR γ 'nın heterozigot mutasyonları 8 bireyde tanımlanmıştır. Bu bireyler kompleks bir klinik fenotipe sahip olup "PPAR γ ligand rezistans sendromu" olarak isimlendirilmiştir. Bu sendrom parsiyel lipodistrofi, erken başlangıçlı şiddetli insülin rezistansı, tip 2 diyabet ve dislipidemiye (yüksek TG, düşük LDL), erken başlangıçlı HT ve hepatik steatozise neden olduğundan PPAR γ 'nın insülin aktivitesi için gerekli, yağ kütle kontrolü için önemli olduğu vurgulanmaktadır. Bu mutasyonları taşıyan bireylerde ekstremitelerde ve gluteal bölgelerde subkutan yağ dokusunun kaybolduğu, abdominal bölgede ise depozitlerin olduğu stereotipik bir parsiyel lökodistrofi tanımlanmıştır (16).

TZD 'ler PPAR γ üzerinden lipit ve glikoz metabolizması gen ekspresyonunu düzenlemesi açısından önemlidir. KC'de TG üretimini düşürürken hepatik TG klirensini artırmaktadır. YA mobilizasyonunu baskımlarken YA'lerinin adipozitelere girişini artırmaktadır. Lipit metabolizması üzerine olan etkisi insülin duyarlılığının artırmasıyla ilişkilidir.

Çeşitli çalışmalarda prediyabetik farelerde TZD 'ler ile tedavi sonrası diyabetde görülen β hücre kaybının engellendiği gözlenmiştir. Bir hipoteze göre pankreas β hücrelerinde lipit akümüülasyonunun indüklediği β hücre apoptozu, TZD 'lerin lipit toksisitesini engellemesiyle önlenmektedir.

İnsanlarda PPAR γ 2 geninde sıkça oluşan bir mutasyonla (12.kodonda prolinin alanine dönüşümü (Pro 12Ala)) şiddetli insülin direnciyle ilişkili bulunmuştur. Bu mutasyona sahip olanların vücut kütle indeksleri önemli derecede yüksekken leptin düzeyleri de taşıyıcı olmayanlara kıyasla verilen vücut kütle indekslerine göre daha yüksek bulunmuştur. Yine ilginç olarak, taşıyıcılarda insülin direnci, diyabet ve hipertansiyon gözlenirken yağlanma anormalliği saptanmamıştır. Bu da adipogenez ile insülin duyarlılığının PPAR γ 'nın farklı gen regülasyonu ile düzenlendiğini düşündürmektedir.

2.7. PPAR'nin inflamasyondaki rolü ve kardiyovasküler sistem (KVS) (2, 9)

PPAR'ler çok farklı hücre tiplerinde bulunurlarken, aterosklerotik lezyonlarda da bulunmaktadır. Ayrıca makrofajlarda, vasküler düz kas hücresinde, endotelial hücrelerde ve kardiyak myositlerde bulunmaktadır (60).

Ateroskleroz bir çok etkenin katkıda bulunduğu komplike bir olaydır. Endotel hasarı, düz kas hücrelerinin proliferasyonu, monosit/makrofaj göçü, büyüme faktörleri ve sitokinlerin düzenleyici etkileri; ateroskleroz gelişim sürecinde rol alır. Ek olarak vasküler duvarın kronik inflamasyonu vardır. PPAR γ ligandları; transkripsiyon faktörlerini (AP-1, STAT, NK κ B) inhibe ederek inflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6), indüklenebilir nitrik oksit sentazın ve TNF α 'nın düzeylerini düşürmektedir. Aterosklerotik lezyondaki plakların rüptüre gitmesinde makrofajlar etkilidir. Plak rüptüründeki makrofajların rolü ekstrasellüler matriks yıkımında önemli enzimler olan matriks metalloproteinazların sekrete edilmesidir. Makrofaj hücrelerinde ve düz kas hücrelerinde PPAR γ ligandları, düz kas hücrelerinin göçünde ve plak destabilizasyonunda etkili olan matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) düzeylerini azaltmaktadır. Düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve göçü aterosklerozda ve restenozda kritik olaylardır. TZD 'ler düz kas hücrelerindeki değişimi inhibe ederek vasküler hasar sonrası neointimal kalınlaşmayı önlemektedir. Ayrıca düz kas hücrelerinde p53 aracılığıyla apoptozisi uyarmaktadırlar. Endotel hücreleri tarafından adezyon moleküllerinin ifade edilmesi lökositlerin endotel hücrelerine adezyonuna neden olmaktadır. PPAR γ ; VCAM-1 ve ICAM-1 düzeylerini düşürürken, insan aortik endotel hücrelerinde IL 8 ve monosit kemotaktik protein (MCP-1) gibi kemokinlerin düzeylerini de azalmaktadır. PPAR γ ligandları MCP-1'in indüklediği monosit göçünü de inhibe etmektedir. Endotelin-1 endotel fonksiyonlarının ve vasküler tonusun düzenlenmesinde etkilidir. Endotelin-1 aterosklerotik lezyonlarda ifade edilerek düz kas hücrelerinin proliferasyonunu indüklemektedir. PPAR γ ligandları sığır aortik endotel hücrelerinde AP-1 ile etkileşerek endotelin-1 promotorünün ifade edilmesini baskılamaktadır. Bütün bu bulgular PPAR γ aktivasyonunun aterosklerozdaki inflamatuvar cevabın düzenlenmesinde faydalı etkileri olabileceğini düşündürmektedir (60).

PPAR γ 'nin okside LDL'nin temel okside lipit komponentleri olan hidroksioktadekadienoik-asit (9-HODE) ve 13-HODE tarafından aktivasyonu, çöpçü reseptör CD 36'nın indüksiyonu üzerinden makrofajlarda lipit depolanmasında önemli role sahiptir. CD 36'sı hasarlı sıçanlar aterosklerozdan korunmuştur. Bu bilgiler gösteriyor ki aterojenik okside LDL partikülleri, kendi alınımlarını PPAR γ ve CD 36 düzeylerinin aktiflenmesi üzerinden indükleyerek ateroskleroza neden olmaktadır. Son zamanlarda Jiang, Johnson ve Zarnegar PPAR γ ligandlarının hepatosit büyüme faktörü (HGF) mRNA'sını indüklediklerini ve fibroblastlarda protein sentezini artırdıklarını rapor etmişlerdir. HGF, endotel hücrelerinde mitojenik ve anti-apoptotik etkilidir. PPAR γ ligandları HGF'nün indüklenmesi üzerinden vasküler hastalıklarda faydalı etkilere neden olabilir (60).

PPAR γ bir çok inflamatuvar olayın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. PPAR γ ligandlarının (PGJ2, IL 1 β , NSAID, v.b.) monositlerin makrofajlara dönüşümünü indüklerken NO sentezini azalttığı görülmüştür. PGI2 başta olmak üzere PPAR γ ligandlarının in vitro olarak TNF α , IL 1 β ve IL 6 gibi sitokinleri inhibe ettiği rapor edilmiştir. IL 1 β 'yi inhibe etmesi NF κ B yolunu inhibe etmesine bağlanmaktadır. TNF α 'nın inhibisyonuyla kalbe olan (-) inotropik etki ortadan kalkmaktadır. Bu durum konjestif kalp yetmezliği için PPAR ligandlarına olumlu bir bakış açısı sunmaktadır.

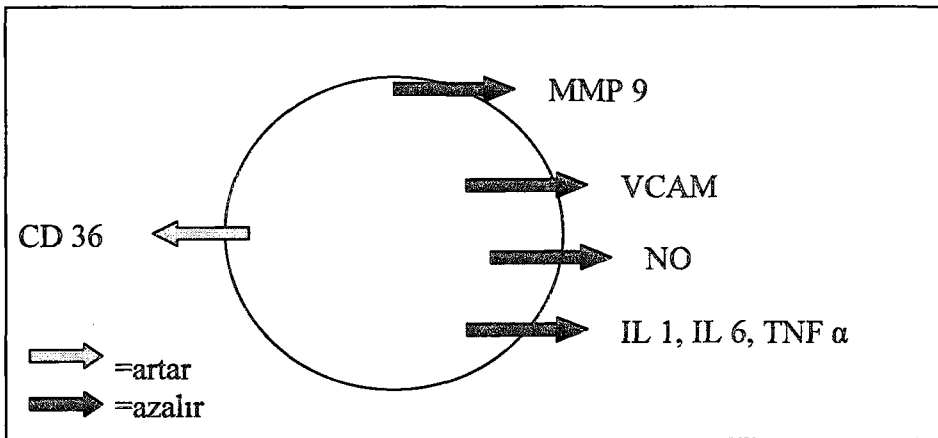
Köpük hücresi oluşumunu artırması bakımından monositlerin makrofajlara dönüşümünü indüklemesi, çöpçü reseptör CD 36 ekspresyonunu artırması ve degradasyonda görevli metalloproteinaz 9'u inhibe etmesi proaterojenik olarak değerlendirilirken MCP (monosit kemotaktik protein), VCAM 1, ICAM ekspresyonunu azaltması yönüyle antiaterojenik etki göstermektedir. Net etkinin anlaşılması için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

PPAR'lerin kalp üzerine olan etkisi tamamen anlaşılmış değildir. PPAR α kalpte mitokondriyel YA β oksidasyonunda önemli role sahiptir. Basınç artışı kardiyak hipertrofiye neden olarak PPAR α 'da deaktivasyona neden olmaktadır ve sonuçta YA β oksidasyon enzimlerinin (karnitin palmitoil transferaz I, orta zincirli açil-KoA dehidrojenaz) genlerinde azalma meydana gelmektedir. Bu sonuçlar göstermiştir ki kardiyak hipertrofi, kardiyak lipid homeostazisinde anormallikleri indükleyerek ve PPAR α aktivitesini azaltarak enerji üretimini düşürmektedir (60).

Sistolik ve diastolik disfonksiyonla karakterize diyabetik kardiyomyopati diyabetin temel komplikasyonlarından biridir. Bu yüzden anti-diyabetik TZD 'in kullanımı diyabet hastalarında bozuk kardiyak disfonksiyonu düzeltmek açısından avantajlıdır (60).

Son olarak rapor edilmiştir ki PPAR γ mRNA'nın insanlarda yağ dokusunda ifade edilmesi kardiyak riskle ters orantılıdır. PPAR γ polimorfizmi ile koroner arter hastalığı arasında önemli ilişki vardır (60).

PPAR'lerin bu anti-inflamatuvar etkileri aterosklerozdaki inflamasyonun azaltılmasına olumlu bir bakış açısı sunmaktadır. Spekülasyonlara göre PPAR γ ligandları kondroprotektif olarak osteoartrit ve romatoid artrit tedavisinde de kullanılabilir.



Şekil 8: PPAR'nin etkileri

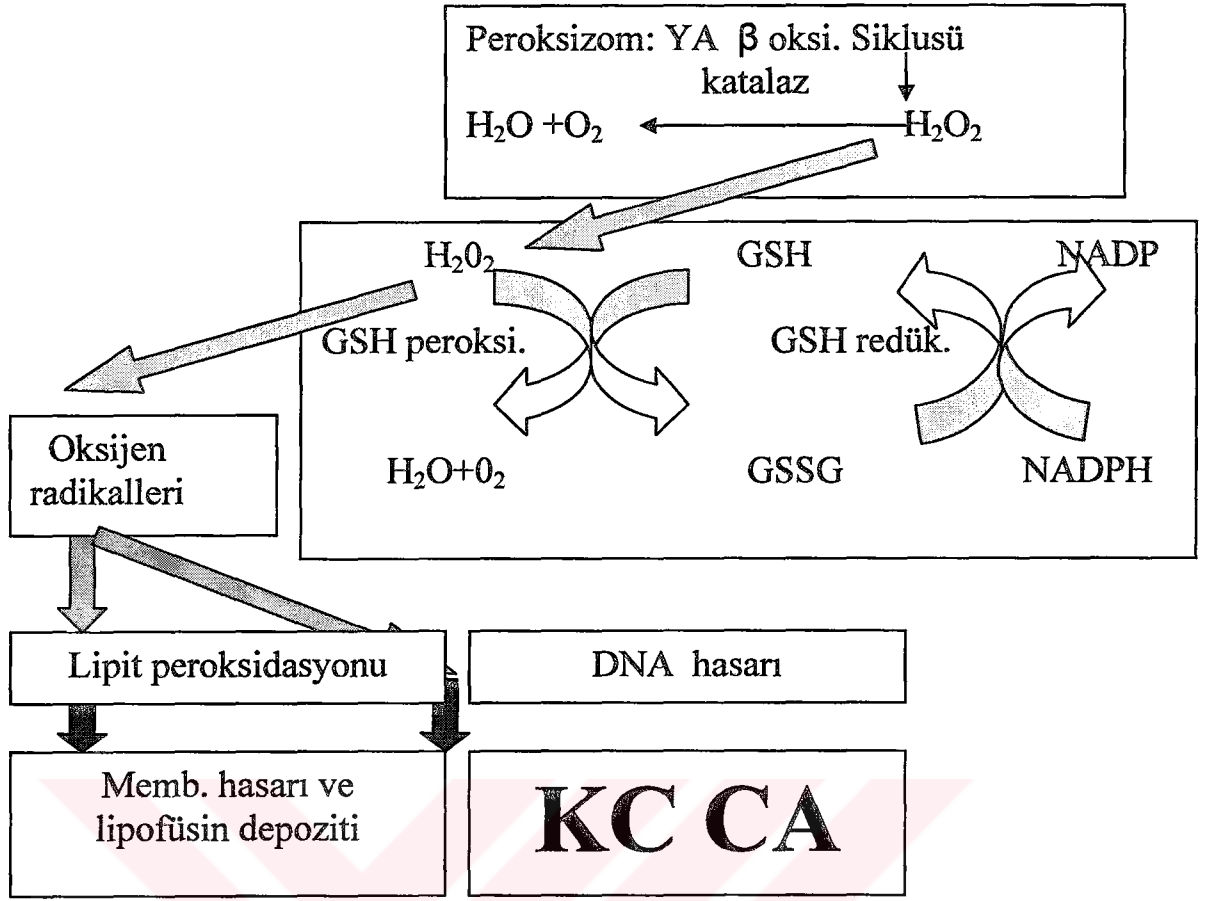
2.8. PPAR α 'nin kanser patofizyolojisindeki rolü (10, 2, 5)

PPAR α uygulamasından sonra sıçan veya fare karaciğer ağırlığında belirgin bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Hepatomegali hepatositlerin hipertrofi ve hiperplazisine bağlı iken karaciğerde DNA ve protein sentezi de artmaktadır. Peroksizomların sayı ve büyüklükleri artarken endoplazmik retikulum, mitokondri sayısı da artmış ve lipofussin depolanması gözlenmiştir. Sonuç olarak karaciğerde nodüller ve hepatokarsinom gelişmiştir.

Peroksizomal enzimlerin bazılarında indüksiyon olurken, özellikle yağ asidi β -oksidasyon enzimlerinde belirgin artış ve katalaz aktivitesinde ise diğer enzimlere oranla daha az artış bir oluşmuştur. Diğer mikrozomal ve sitozolik enzimlerde indüksiyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon transferaz ve süperoksid dismutaz aktivitelerinde inhibisyon olmaktadır. Enzim aktivitelerinde gözlenen bu farklılaşmaların KC'de tümör gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

PPAR α agonistleri ile görülen hepatokarsinojenik etkinin yaşlı KC'de daha da arttığı belirtilmiştir. Bu yaşla birlikte azalan hepatik antioksidan kapasiteye, PPAR α agonistleri ile aktivite kazanan farklı oksidazlara ve yaşlanma ile PPAR α agonistlerinin antiapoptotik etkilerine karşı artan duyarlılıkla açıklanmıştır (12). Siprofibrat, Wy-14,643 sıçan karaciğerinde 40-60 hafta gibi kısa bir sürede %100 tümör oluşturmaktadır. Klofibrat, dietilhekzil fitalat 2 yıl gibi bir sürede ve daha düşük bir insidansta tümör geliştirmektedir.

Oksidatif stres hipotezi: Yağ asidi β oksidasyon enzimlerinin aktivasyonuna bağlı olarak Açıl KoA oksidaz aktivitesi çok artarken; katalaz aktivitesi ise çok daha az artmaktadır; böylelikle H_2O_2 yapım ve yıkımında dengesizlik ortaya çıkmaktadır. Peroksizomların kapasitesini aşan H_2O_2 , peroksizomal membrandan serbestçe diffüze olarak glutatyon peroksidaz için substrat haline gelmektedir. Ancak peroksizomlar tarafından aktiviteleri inhibisyona uğramış olan süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon transferaz ve glutatyon peroksidaz H_2O_2 'i yıkmaya yetmeyerek, artmış H_2O_2 düzeyleri hücre hasarı oluşturmaktadır. PPAR'nin kronik kullanımı lipit peroksidasyonunu arttırmaktadır.



Şekil 9: PPAR'lerin KC hasarındaki rolü

Ayrıca bu tür karsinojenlerin temel olarak apoptozu etkiledikleri saptanmıştır. Apoptozun baskılanması, transforme hücrelerin gelişmesine olanak sağlayarak karaciğerde tümör oluşumuna neden olmaktadır.

Yapılan çalışmalarda PPAR'lere karşı türlerin farklı yanıtlar verdikleri saptanmıştır. İnsanlardaki çalışmalar, klofibrat, siprofibrat, fenofibrat ve gemfibrozil gibi hipolipidemik ajanlarla tedavi gören hastalarda gerçekleştirilmiştir. Sıçanlarda saptanan bulguların tersine PPAR α 'lerin oluşturdukları ciddi hasarlar insanlar için şu an bir tehlike oluşturmuyor gibi görünmektedir. Bu konuda daha ileri çalışmaların yapılması, insan karaciğer hücrelerinin sıçan karaciğerinde çok ciddi harabiyet oluşturan bu PPAR α 'ne karşı nasıl oluyor da yanıtsız kalıyor sorusunun yanıtlanmasına ışık tutacaktır.

KC CA'ya etkisi bu düzeyde iken in vitro olarak akciğer, mesane, prostat, mide, kolon, meme CA ve liposarkomda büyümeyi inhibe ettiğine dair bulgular mevcuttur. PPAR'nin adipozit benzeri hücrelerde terminal adipozit diferansiyasyonunu indükleyerek tümörde küçülmeye neden olduğu düşünülmektedir. Bu konuda çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.

2.9. PPAR γ ligandları ve kanser:

İnsan küçük hücreli akciğer CA dışındaki akciğer kanserlerinde TZD tedavisiyle hücrel büyüme inhibe olurken zaman ve doz bağımlı olarak apoptozis meydana gelmektedir (14). PPAR γ'ların çeşitli hücre tiplerinde apoptozisi indükleyerek bir tümör supresör gen gibi davranabileceğinden bahsedilmektedir (16, 17). PPAR γ agonistleri diyabet tedavisinde kullanılmasının yanı sıra kanser tedavisi için yeni tedavi alternatifleri oluşturabilecek mi, sorusuna yanıt aranmaktadır.

PPAR γ ligandları aynı zamanda farklı organlardan kaynaklanan epitel hücrelerinin büyümesini düzenlerler. Örneğin TZD'lerden olan pioglitazon ve 15d-PGJ2 prostat kanser hücrelerinin androjen stimülasyonlu gen aktivitesini azaltarak in vivo ve in vitro anti-prostat CA etki göstermektedirler Shimada ve arkadaşları da kolon kanserlerinde troglitazon tedavisiyle indüklenen apoptozdan bahsetmektedirler. İnsan pankreas kanserlerinde de ciglitazon kullanımıyla apoptozun indüklendiği ve bu etkinin ZVAD-FMK gibi bir kaspaz inhibitörüyle ortadan kalktığını belirtmektedirler (17). Bilindiği üzere kaspazlar apoptozu yönlendiren proteazlardır.

Zander ve arkadaşları; PPAR γ agonistlerinin kullanımıyla C6 glioma hücrelerinde proapoptotik proteinler olan BAX ve BAD'ın düzeylerinin arttığını saptamışlardır. BAX ve BAD mitokondriden sitokrom C ayrılmasıyla kaspaz aktivasyonuna neden olan aracı proteinlerdir. PPAR γ insan malign astrositoma hücrelerinde ve insan KC CA hücrelerinde kaspaz 3 aktivitesini indüklemektedir (17).

Antiproliferatif etki mekanizması: PPAR γ agonistleri siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri olan p21 ve p18'i hedef almaktadır. Morrison ve Farmer PPAR γ agonistleri ile tedavi ile adipogenez sırasında p21 ve p18 düzeylerinde artış saptamışlardır. CDK inhibitörleri CDK komplekslerinin oluşumlarını önleyerek hücre siklusunun oluşumunu bloklamaktadırlar. PPAR γ indüklenmesiyle farklı tümör hücre hatlarında G1 fazında duraklama meydana gelmiştir. Pankreas tümör'lerinde glitazonlarla indüklenen p21 düzeyleri hücre siklusunu G1 fazında durdurmuştur. Hepatosellüler CA'da da aynı etki ortaya çıkmıştır. PPAR γ agonistlerinin diğer bir etki mekanizması hücre siklusunun ilerlemesini sağlayan siklin D1 düzeylerinin çeşitli hücre hatlarında düşürülmesidir. Pankreas, meme, hepatosellüler karsinom ve küçük hücreli akciğer kanseri dışındaki akciğer kanserlerinde bu etki gözlemlenmiştir (17).

PPAR γ aracılı direk anti-neoplastik etkisinin dışında tümör büyümesine ikincil bir etki damar oluşumudur. PPAR γ ile yeni damar oluşumunda etkili olan endotel hücrelerinin leptin aracılı göçü inhibe olmaktadır. Glitazon damar oluşumunu in vivo ve in vitro inhibe etmektedir (17).

Hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, PPAR agonistlerinin;

2.9.1. Prostat kanserinde (19-22)

2.9.2. İnsan tiroid kanserinde (18, 23)

2.9.3. Liposarkom (24, 73, 74))

2.9.4. Gastrointestinal sistem kanserlerinde:

a. Gastrik kanserde (25, 26)

b. Kolon kanserinde (27-30, 75-78)

c. İnsan pankreas kanserinde (31,32, 79, 80)

d. İnsan hepatosellüler kanserinde (33, 34, 81)

2.9.5. Meme kanserinde (35-40, 82, 83)

2.9.6. İnsan akciğer kanserinde (55, 56, 84)

2.9.7. MSS kanserleri:

a. Nöroblastomada (57, 85, 86))

b. Astrositoma (58)

c. Gliomada (87-90)

anti-proliferatif etkilere neden olduğu gösterilmiştir.

2.9.1. Prostat kanseri

PPAR γ sağlıklı insan prostatında az miktarda bulunur. Mueller ve arkadaşları insan prostat kanserlerinden elde edilen hücre hatlarında (LNCaP, DU145, PC3) PPAR γ 'nın artan düzeylerini saptamışlardır (19). Bir çok çalışmada PPAR γ aktivasyonunun prostat kanser hücre hatlarında büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir (20, 21, 22). Bu inhibisyon apoptoz bulguları olmadan genişlemiş sitoplazmik vakuoller gibi çeşitli morfolojik bulgularla karakterizedir. Mueler 'in çalışmasında metastazı olmayan prostat kanserli olgularda 800 mg /gün troglitazon tedavisiyle PSA düzeylerinde stabilleşme sağlanmıştır (19).

2.9.2. İnsan tiroid kanseri

Çeşitli insan tiroid kanser hücre hatlarında (BHP 2-7, 7-13, 10-3 ve 18-21) PPAR γ ifade edilmektedir. Bu hücre hatlarına in vitro olarak PPAR γ agonistlerinin uygulanmasıyla apoptoz indüklenirken hücre sayısı azalmaktadır. BCL2 ve BAX gibi apoptotik süreci yönlendiren parametrelerde değişiklik saptanmamıştır (18). Kroll ve arkadaşları kromozomal translokasyonlar ile tiroid karsinomu arasında bağlantı olduğunu saptamışlardır. PPAR γ aktivasyonuna engel olan kromozomal translokasyonların (2;3)(q13;p25) tiroid kanseri için kritik öneme sahip olduğunu kaydetmişlerdir (23).

2.9.3. Liposarkom

PPAR γ insan liposarkomunda yüksek oranda bulunmaktadır (24). İnsan liposarkomunun pioglitazon ile tedavisi terminal diferansiyasyona yol açmaktadır. Liposarkom diferansiyasyonundaki bloğun PPAR γ yolağının tam aktivasyonu ile önlenileceği düşünülmektedir. Orta ve yüksek derece liposarkomu olan 3 bireyde 800 mg/gün peroral troglitazon tedavisiyle histolojik ve biyokimyasal analizlerde diferansiyasyonun arttığı saptanmıştır. Hastaların klinik sonuçları yayımlanmamıştır ama tedaviye hasta toleransı olumludur (73). 12 liposarkomlu hastada yapılan bir başka faz II çalışmasında klinik sonucun önemli oranda etkilenmediği kaydedilmiştir (74).

2.9.4. Gastrointestinal sistem kanserleri

a) Gastrik Kanser

Takahashi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada insan gastrik kanser hücre hatlarının (MKN-45) troglitazon veya pioglitazon ile tedavisiyle hücre büyümesinin inhibe olup apoptozun indüklendiği belirtilmektedir (25). Diğer bir çalışma insan mide kanseri hücre hatlarında (MKN-7, MKN-28, MKN-45 ve AGS) PPAR γ 'nın ifade edildiğini göstermiştir. Tüm bu hücre hatlarında PPAR γ agonistleri ile inkübasyon sonrası proliferasyonda azalma gözlemlenmiştir. Diğerlerine göre daha belign bir hücre hattı kabul edilen MKN-7'de PPAR γ agonistleri ile tedaviyle bir değişim gözlenmemiştir. Bu bulgular indifferansiye hücre hatlarının PPAR γ agonistleri ile tedaviye yanıt verirken, diferansiye olanların yanıt vermediğini göstermiştir (26).

MKN-45 protoonkogen olan hepatosit-büyüme-faktör reseptörünü (MET) içermektedir. PPAR γ agonistleri ile tedavi sonrası MKN-45 hücre hatlarında MET düzeyleri baskılanmıştır.

b) Kolon Kanseri

PPAR γ mRNA düzeyleri beyaz-yağ dokusuyla kıyaslanabilir düzeyde çekum ve kolon mukozasında yüksek oranda bulunmaktadır (75). Benzer şekilde PPAR γ adenokarsinomlarda ve insan kolon kanser hücre hatlarında yüksek düzeyde ifade edilmektedir (76). PPAR γ agonistlerinin kolon kanserindeki etkisi çelişkilidir. Adenokarsinom hücre hatlarının ve insan kolon kanser hücre hatlarının PPAR γ agonistleri ile tedavi edilmesi hücre siklusunu G1 fazında durdurarak diferansiyasyonu artırırken apoptoza neden olmaktadır (78). Buna zıt olarak Lefebvre ve arkadaşları (27) ile Saez ve arkadaşları (75) intestinal neoplaziye yatkın kılan Apc mutasyonlu ratlarda PPAR γ aktivasyonu polipozise neden olarak kolon tümör sayısını artırmaktadır. Bir klinik faz II çalışmasında peroral kullanılan troglitazon kemoterapiye dirençli metastatik kolon kanseri olan 25 hastada ortalama yaşam süresini uzatmamıştır (28). Buna zıt olarak insan kolon kanser hücreleri sistemik olarak PPAR γ ligandları ile tedavi edilen sıçanlara subkutan enjekte edildiklerinde büyümede önemli oranda azalma görülmüştür (76). Tanaka ve arkadaşları (29) ise kimyasal olarak indüklenmiş inflamatuvar barsak hastalığı bulunanalarda kolon kanserleri için prekürsör

lezyon kabul edilen anormal kriptal fokusların sayısında PPAR γ ligandları ile azalma gözlemlenmiştir. Sarraf ve arkadaşları ise (30) PPAR γ aktivasyonunun koruyucu etkilerini saptamışlardır. PPAR γ geninde fonksiyon kaybı olan kolon karsinomlu hastalarda PPAR γ aktivasyonunu bozan birkaç mutasyonun ligand bağlama domainini etkileyerek yetersiz ligand bağlanmasına yol açmasıyla bozulmuş PPAR γ fonksiyonu ortaya çıkmıştır. Kolorektal kanserli bazı hastalarda PPAR γ gen polimorfizmi saptanmıştır (77). Bugün için kolon kanserinde çok farklı veriler elde edilmişse de çoğu veri PPAR γ ligandlarının kolon kanserinde anti-neoplastik etkilerini onaylamaktadır.

c) İnsan pankreas kanseri

Bir çok insan pankreas kanser hücre hattında PPAR γ agonistleri ile tedavi hücrel ve klonal gelişimi inhibe ederken, hücre siklusunu G1 fazında durdurmaktadır. Ayrıca TZD ile tedavi p21 düzeylerini indüklemektedir (30). Motomura ve arkadaşları (79); pankreatik kanser hücre hatlarında (PK-1, PK-8, PK-9 ve MIA PaCa-2) PPAR γ mRNA düzeylerinde artış göstermişlerdir. Troglitazon tedavisiyle her dört hücre hattında büyümede inhibisyon ve eş zamanlı p27 düzeylerinde indüklenme meydana gelmektedir. İleri çalışmalar PPAR γ aktivasyonunun siklin D1 düzeylerini düşürerek CDK inhibitörlerinde artışa neden olduğunu göstermiştir. Bu da pankreas hücre hatlarında hücre siklusunu bioklamaktadır (31). Eibl ve arkadaşları; pankreas kanser hücrelerinde PPAR γ 'nın yönlendirdiği apoptozisi tanımlamışlardır (80).

Hücre büyümesinin inhibisyonuna ek olarak PPAR γ agonistleri 5 insan pankreas kanser hücre hattında pankreatik diferansiyasyon göstergelerinin (CEA, E-kaderin ve ALP) artışı ile ilişkilendirilmiş farklılaşmanın indüklendiği saptanmıştır (32).

d) İnsan hepatosellüler kanseri

Rumi ve arkadaşları; hepatosellüler kanser hücre hatlarında (Hep G2, HuH-7, KYN-1 ve KYN-2) fonksiyonel olarak aktif PPAR γ geninin ifade edildiğini tanımlamışlardır (33). PPAR γ agonistleri ile tedavi, hücre büyümesini durdururken hücre siklüsünün ilerlemesini ve DNA sentezini inhibe etmektedir. Koga ve arkadaşları; insan hepatoma hücre hatlarının (HLF, HAK-1A, HAK-1B

ve HAK-5) ve bir çok insan hepatosellüler kanserinin, PPAR γ genini ifade ettiklerini göstermişlerdir (81). Troglitazon tedavisiyle hücresel büyümenin konsantrasyon bağımlı olarak hücre siklusunun G0/1'de durduğu belirtilmektedir. Bu sitostatik etkiye ek olarak p21 ve p27 genleri indüklenmektedir. Toyoda ve arkadaşları; PPAR γ agonistleri ile tedavinin insan karaciğer kanser hücre hatlarında (PLC/PRF/5, Hep G2, HuH-7) kaspaz 3 aktivitesini indükleyerek apoptozise neden olduğunu kaydetmişlerdir. Hem kaspaz aktivitesinin artışıyla hem de hücre siklusuna olan etki ile PPAR γ agonistleri ön plana çıkmaktadır (34).

2.9.5. Meme kanseri

Hem insanlardan hem de sıçanlardan olan meme dokusu kültürlerinde, hem bir çok meme kanser hücre hattında da (Hep G2, HuH-7, KYN-1 ve KYN-2) PPAR γ geninin ifade edildiği bulunmuştur (37, 38). Daha da fazlası insan primer ve metastatik meme adenokarsinomlarında PPAR γ geni sıkça ifade edilmektedir (35). PPAR γ mRNA konsantrasyonları gebelik ve laktasyon boyunca ve meme tümör dokusunda düşmektedir (82). PPAR γ aktivasyonu; meme kanser hücre hatlarında ve insanlardan alınan meme kanser hücre kültürlerinde proliferasyonu inhibe ederek hücreyi siklusun G1 fazında durdurmakta ve apoptozisi indüklemektedir (35, 37, 38). Meme kanser hücre kültürlerinde PPAR γ 'nın ligandlarla aktive edilmesi lipid birikimine yol açarak meme epitelindeki genlerin ifade edilme düzeylerini etkilemektedir. Sonuçta daha diferansiye, daha az malign hücreler oluşmaktadır (35). Elstner ve arkadaşları (38); meme kanser hücrelerini troglitazon tedavisi alan immünyetmezlikli sıçanlara enjekte ettiklerinde tümör büyüklüğünde ve ağırlığında önemli miktarda düşme gözlemlemişlerdir. Histolojik çalışmalarda da apoptozis gözlemlenmiştir. Kimyasal olarak sıçanlarda indüklenmiş meme kanser modelinde, PPAR γ agonistleri tümör görülme sıklığını ve tümör ağırlığını düşürmüştür. Bir polisiklik aromatik hidrokarbon olan dimetilbenzantrazen ile ratlarda indüklenen meme kanserinde troglitazon tedavisiyle gerileme ve duraklama görülürken, toplam tümör volümü de %40-50 azalmıştır (83).

Bcl2 geninin düşük düzeyleri troglitazon ile tedavi edilen meme kanser hücre hatlarında hücre büyümesinin inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (38). Clay ve

arkadaşları (70); PPAR γ aktivasyonuna yanıt olarak kaspaz-3 aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. PPAR γ agonistleriyle apoptozisin indüklenmesi pan-kaspaz ve kaspaz-3 inhibitörleriyle önlenmektedir.

Samid ve arkadaşları; meme kanser hücre hatlarında , PPAR γ agonistleri ile tedavi sonrası p21 düzeylerinde artış saptamışlardır (40). Bu siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri CDK2, CDK4 ve siklin D1 düzeylerinde düşüşe neden olarak hücre siklusunda duraklamaya neden olmuştur (36).

2.9.6. İnsan akciğer kanseri

Sağlıklı ve malign akciğer dokusunda, bir çok tümör hücre hattında olduğu gibi PPAR γ geni ifade edilmektedir (55, 56, 84). PPAR γ mRNA düzeyleri; bitişikteki sağlıklı akciğer dokusundaki düzeylerine oranla tümör dokusunda daha düşüktür. Ayrıca PPAR γ mRNA düzeylerinin düşük düzeyde ifade edildiği hastalarda, yüksek düzeyde ifade edilen hastalara göre yaşam süresi daha kısadır (56). PPAR γ agonistleriyle tedavi sonrası küçük hücreli akciğer kanseri dışı akciğer kanserlerinde ve insan akciğer kanseri hücre hatlarında büyümede inhibisyon ve apoptozis gözlemlenmiştir (55, 56). Küçük hücreli akciğer kanseri dışı akciğer kanserlerinde PPAR γ agonistleriyle tedavi sonrası matriks metalloproteinaz 2'nin aktivitesi ve gen düzeyleri azalmıştır (55). Matriks metalloproteinaz 2 ekstrasellüler matriks proteinlerinin degrade edilmesinde önemli olup, aktivitesinin artışı küçük hücreli akciğer kanseri dışı akciğer kanserlerinde invazyon düzeyiyle koreledir. Bu yönüyle PPAR γ agonistleriyle tedavi metastazı önlemede önemli olabilir. Chang ve Szabo (55) akciğer kanserlerinde diferansiyasyon ile ilgili göstergelerin PPAR γ agonistlerinin kullanımıyla indüklendiğini ve rediferansiyasyonun sağlandığını kaydetmişlerdir. P21 düzeyleri artarken siklin D1'in düşmesi PPAR γ agonistlerinin hücre siklusunun kontrolündeki kritik önemini göstermektedir.

2.9.7. MSS kanserleri

a) Nöroblastoma

Hem primer nöroblastom hücreleri hem klonal nöroblastom hücre hattı (LA-N-5) PPAR γ genini ifade etmektedir (75). PPAR γ agonistleri nöroblastom hücrelerinin farklılaşmasını uyarırken, hücre proliferasyonunu ve sinir uzamasını

inhibe etmektedir. Rohn ve arkadaşları (76); PPAR γ 'nın rolünü birincil kortikal nöron kültürlerinde ve insan nöroblastom hücrelerinde (SH-SY5Y) göstermişlerdir. Prostaglandin J2 ile tedavi; nöron dejenerasyonu ve nükleer yoğunlaşma gibi morfolojik değişimleri indükleyerek apoptozise neden olmaktadır. Bu morfolojik değişimler nöronların genel kaspaz inhibitörleri ile (Z-VAD) tedavi edilmesiyle önlenir. Değişiklikler PGJ2 ile indüklenirken buna PPAR γ 'nın aracılık edip etmediği açık değildir. Burdge ve arkadaşları; PPAR γ için endojen ligandlar olan yağ asitlerinin, insan nöronal hücre hattında (IMR-32) proliferasyonu inhibe ettiğini ve morfolojik diferansiyasyonu uyardığını saptamışlardır (77).

b) Astrositoma

PPAR γ insan primer astrositlerinde ve insan malign astrositoma hücre hattında (T98G) ifade edilmektedir. İnsan astrositik hücrelerin PPAR γ agonistleriyle tedavi sonrası hücresel canlılığı kaybolurken apoptozis oluşmuştur. Bu hücrelerde kaspaz 3 aktivitesinin indüklenmesi PPAR γ aracılı apoptoziste kaspaz aktivasyonunun rolünü düşündürmüştür.

c) Glioma

İnsan ve sıçan glioma hücre hatlarında PPAR γ ifade edilmektedir (90, 87). PPAR γ agonistleri ile tedavi edildiğinde hücre canlılığında azalma ve apoptozis gözlemlenmektedir (90, 88). PPAR γ antagonisti (bisfenol-diglisidil-eter) PPAR γ aktivasyonundan sonra hücre canlılığındaki azalmayı bloklamaktadır. PPAR γ aktive olduğunda BAD ve BAX düzeyleri indüklenirken, BAX anti-sense oligonükleotidlerle tedavi apoptozisi bloklayarak PPAR γ 'yı indüklemektedir. PPAR γ agonistleri BT4Cn sıçan glioma hücrelerinin büyümesini inhibe ederken etkileri seçici PPAR antagonisti (GW 9662) tarafından azaltılmaktadır. Kato ve arkadaşları (88); farklı patolojik evrelerde olan 20 hastadan alınan glioma hücrelerinin %95'inde PPAR γ 'nın ifade edildiğini göstermişlerdir. Zhou ve arkadaşları; glioblastomalı Amerikalı hastalarda PPAR γ gen polimorfizmini saptamışlardır (89). Belki PPAR γ agonistleri glioblastoma için ileride tedavi seçeneği oluşturabilir.

Sonuç olarak; PPAR γ reseptörlerine bağlanan ligandların in vivo ve in vitro antineoplastik etkileri ile ilgili bir çok makale yayınlanmıştır. Uygulanan PPAR γ agonistlerinin dozları da dikkate alınarak kemoterapi ve radyoterapi ile birleştirilerek uygulama alanına sokulması denenebilir. Bu konudaki klinik çalışmalar henüz yetersizdir ve ileri araştırmalara gerek vardır.

2.10. PPAR γ ligandları ve iskemi (61)

İskemi hipoksiye neden olarak, trombositlerin aktivasyonu, vazokonstriktör maddelerin (TX A₂, 5-HT) salınımı gibi bir seri olayı başlatmaktadır. İskemi yeterince şiddetliyse metabolizma hızı düşerek, ATP gibi enerjiden zengin bileşiklerin oluşumu azalmaktadır. Azalmış enerji metabolizması doku hasarına ve nekroza neden olmaktadır. Daha sonra doku hasarı reperfüzyon ile hızlandırılmaktadır. İskemi ve reperfüzyon ölümle sonuçlanabilen bir çok patofizyolojik değişimle ilişkilendirilmiştir. Reperfüzyonda lokal ve sistemik değişimler meydana gelmektedir. Lokal değişimler: PMN'lerin adezyonu ve aktivasyonu, permeabilite artışı, reperfüze dokuda nekrotik hasar şeklindedir. Reperfüzyon sırasındaki sistemik değişimler: ortalama arteriyel kan basıncında ilerleyici bir düşme, pro-inflamatuvar sitokinlerin reperfüze dokudan sistemik dolaşıma geçişi şeklindedir. Vasküler endotel oksidan stresin temel etki noktası olup serbest radikal üretiminden sorumludur.

Post iskemik endotel disfonksiyonunda oksidan stres önemli rol oynamaktadır. Endotel hücreleri vazoaktif ajanların (NO, anjiotansin, bradikinin, prostasiklin, trombin) salınımlarının kontrolünde, kan basıncı ve vasküler permeabilite değişikliklerinde, koagülasyon, fibrinolizis, adezyon ve migrasyonda düzenleyici fonksiyona sahiptir. Serbest oksijen radikalleri; arterioskleroz, hipertansiyon, trombozis, diyabet, kardiyo-pulmoner by-pass, iskemi reperfüzyon, ARDS (acute respiratory distress syndrome), pulmoner ödem, hiperoksi-hipoksi, normal yaşlanma süreci gibi bir çok patolojik ve fizyolojik süreçte önemli fonksiyonlara sahiptir. Oksidatif stres aktive lökositlerden ve patolojik durumlarda endotelin kendisinden salınan oksidan ajanlarla başlatılabilir. Endotelden de daha düşük hızda ve daha düşük amplitüde yalnız daha uzun süre serbest oksijen radikalleri salınmaktadır. İskemi ve reperfüzyon ile indüklenen vasküler hasar lökositlerin endotelle etkileşimi için bir uyarandır.

Lökosit endotel etkileşimi adezyon glikoproteinlerinin (integrinler, selektinler) aracılık yaptığı komplike bir olaydır. Endotel hücrelerinin trombin, histamin, hipoksi-reoksijenasyon, oksijenden derive serbest radikaller ile aktivasyonu P-selektin düzeylerini indüklemektedir. P-selektin lökositlerin endotel üzerinde yuvarlanmasını sağlayarak, lökosit endotel etkileşiminde lökositlerin aktivasyonu ve yapışmasında ilk basamak rolünü oynamaktadır. Adezyon molekülleri lökositlerin lokalize edilmesinde ve inflamasyonun başlatılmasında merkezi öneme sahiptir. ICAM-1 (intercelluler adhesion moleküle) düzeyleri normalde düşükken çeşitli inflamatuvar sitokinler (IL-1, TNF α) tarafından artırılmaktadır.

2.10.1. Miyokard infarktüsü (MI) ve PPAR γ

Önceki çalışmalar; miyokardın iskemi ve reperfüzyonunun; inflamasyon, nekroz, apoptozis ve bir çok stresle ilişkili proteinin aktivasyonuna neden olduğunu göstermiştir. PPAR agonistleri anti-inflamatuvar etkileri ile burada ön plana çıkmaktadır. Kalpte PPAR γ 1 geni bulunmaktadır. PPAR γ 'nın kalp üzerine olan etkileri ise çelişkilidir. Farklı kimyasal özellikte ki PPAR-ligandları (TZD, 15d-PGJ2, PGA1, v.b.) sıçanın kalp kasında reperfüzyon hasarını azaltmaktadır. Ek olarak pioglitazon miyokard infarkt alanını sınırlandırmaktadır MMP-9, TNF α ve serum amiloid A (SAA)'nın serum düzeyleri koroner arter hastalığı olan tip II diyabetli hastalarda, koroner arter hastalığı olan diyabeti olmayan hastalara göre önemli düzeyde artmış bulunmuştur. Bu hasta grubunda PPAR γ aktivatörü anti-diyabetik TZD'lerin kullanımıyla (rosiglitazone 8mg/gün) MMP-9, TNF α ve SAA'nın düzeyleri düşüşe geçmiştir. PPAR agonistlerinin kalbi koruyuculuğunda farklı mekanizmaların altı çizilecek olursa:

- NF-B aktivasyonunun inhibisyonu
- İNOs (indüklenebilir nitrik oksit sentaz) düzeylerinin düşürülmesi
- MCP-1 (monosit kemoatraktan protein) düzeylerinin düşürülmesi
- ICAM-1 düzeylerinin düşürülmesi

Ayrıca neonatal kalp kasında PPAR-ligandları mekanik stresden kaynaklanan hipertrofiyi azaltmaktadır. Pioglitazon MI'ne maruz kalan sıçan kalbinde sol ventrikülün tekrar şekillenmesini sağlamaktadır. Pioglitazonun böyle bir etkisi olmadığını gösteren çalışmalar olduğu gibi TZD ile tedavi edilen tip II diyabetli

hastalarda kalp yetmezliğinden ölüm insidansının arttığını gösteren çalışmalarda mevcuttur. Bu konudaki bilgiler çelişkili olduğundan daha ileri düzey araştırmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca iskemi ve reperfüzyonun hangi zaman diliminde ilacın verilmesi gerektiği de araştırma konusudur.

2.10.2. İskemi-reperfüzyon ve böbrek (122)

Renal iskemi akut böbrek yetmezliğinin temel nedenlerinden biridir. Böbrek iskemisi reperfüzyon ile komplike olabilir. Son olarak 15d-PGJ2'nin böbreğin iskemi ve reperfüzyonundan kaynaklanan böbrek fonksiyon bozukluğunu önemli oranda azalttığı bulunmuştur. Sıçan böbreğinde PPAR α , PPAR β ve PPAR γ 1 genleri ifade edilmektedir. Bilateral iskemi ve reperfüzyon PPAR'nin diğer izoformlarını etkilemezken PPAR α genini inhibe etmektedir. Rosiglitazon ve ciglitazon iskemi ve reperfüzyondan kaynaklanan tübüler ve glomerüler disfonksiyon gelişimini ve renal hasarın histolojik bulgularını azaltabilir. Rosiglitazonun dozuna bağlı olarak bu değişimler gerçekleşmektedir. (1mg/kg rosiglitazon böbrek hasarını azaltmakta 3mg/kg rosiglitazondan daha etkilidir)

2.10.3. İskemi-reperfüzyon ve akciğer

Çeşitli son dönem akciğer hastalığı olan hastalarda akciğer transplantasyonu kabul edilen tedavi seçeneklerinden biridir. Son yıllarda geliştirilen graft dokunun korunması metodları, ameliyat teknikleri, post-operatif uygulamalar böyle transplant hastalarında klinik sonucu etkilemektedir. İskemi-reperfüzyon bu hastaların %22'sinde oluşurken post-operatif ilk bir ay içindeki ölümlerde temel ölüm nedenidir. Preiskemik dokunun pioglitazon ile tedavisi sıçanlarda iskemi-reperfüzyon indüklü akciğer hasarını azaltmaktadır. İskemi-reperfüzyon akciğer hasarını farklı yollarla indüklemektedir: akciğerin mikrovasküler permeabilitesinin değiştirilmesi, lipit peroksidasyonu, lökosit infiltrasyonu ve pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımı bunlardan bir kaçıdır. PPAR γ agonistlerinin etkisinde ise NF- κ B'yi inhibe ederek inflamatuvar sitokinlerin (TNF α , siklooksijenaz-2, ICAM...) üretimini azaltmaktadırlar. TNF α akciğerde nötrofil popülasyonunu ve endotel hasarını artırarak akciğer ödemeine neden olmaktadır. Bu etkiler PPAR γ agonistleri ile önlenmektedir. PPAR γ agonistlerinin diğer bir koruyucu mekanizması inflamatuvar genlerin (IL 1b,

MCP-1 (monosit kemoatrik protein), makrofaj inflamatuvar protein-2) hedef alınarak baskılanmasıdır.

2.10.4. İskemi-reperfüzyon ve barsak

Barsak iskemi-reperfüzyon hasarı; akut mezenterik iskemi, ince barsak transplantasyonu, abdominal aort anevrizması, ciddi yanıklar, hemorajik-travmatik veya septik şoktan kaynaklanıp ciddi bir durumdur. Gastrointestinal sistemin iskemik-reperfüzyonunu bir çok mikrovasküler ve mukozal değişimleri, kan akımında azalma ve mukozal bariyer disfonksiyonunu içermektedir. Nakajima, PPAR γ geni defektli sıçanlar kullanarak iskemi-reperfüzyon hasarında anti-inflamatuvar aktivitenin PPAR γ geni tarafından düzenlendiğini bulmuştur (123). PPAR γ geninin indüklenmesi ICAM-1 düzeylerini azaltırken TNF α mRNA düzeylerini de düşürmüştür. Ayrıca pioglitazonun mukozadan lökosit infiltrasyonunu azaltmaktadır. Lipit peroksidasyonunu inhibe ederek iskemi-reperfüzyonun indüklediği gastrik mukozal inflamasyon gelişimi önlenmektedir.

2.11. Stres ve peroksizomlar

Strese hormonal yanıt sempatik sinir sistemi tarafından katekolaminlerin, hipotalamo-pitüiter-adrenal aksis aktivasyonu üzerinden adrenal medülladan glikokortikoidlerin salınımıdır. Stres sonrası katekolamin piki daha erken oluşurken steroid yanıtı daha gecikmeli olarak oluşmaktadır

Çok iyi bilindiği gibi hipotalamo-pitüiter-adrenal aksis (HPA) internal veya eksternal streslerle aktive olduğunda adrenal glikokortikoidlerin hipersekresyonu gerçekleşmektedir (96).

Stres uyarısı ilk olarak yukarı beyin sapına doğru taşınarak sonunda median eminensiya ulaşmaktadır. Buradan hipofizer portal sisteme CRH salgılanırken. dakikalar içinde tüm kontrol ile ilgili olaylar dizisi bol miktarda kortizolün kana verilmesine yol açmaktadır. Mental stres aynı zamanda ACTH salgısında da hızlı bir artışa neden olmaktadır. Bunun limbik sistemde özellikle amigdala ve hipokampus bölgesindeki aktivite artışından kaynaklandığına inanılmaktadır. Bu

bölgeler daha sonra sinyallerini posterior medial hipotalamusa göndermektedirler

Kortizol CRF salgısını azaltmak için hipotalamusta ve ACTH oluşumunu azaltmak için ön hipofiz bezinde direk (-) feed back etkiye sahiptir. Her iki feed back sistemi kortizol konsantrasyonunu düzenlemeye yardım eder. Konsantrasyon çok arttığında feed back otomatik olarak ACTH'ı normal düzeyine indirir (96).

Depresyonda bahsedilen bu glikokortikoid feed back mekanizma etkilenmektedir. Major depresyonda glikokortikoid düzeylerinin uzun süreli yüksek kalması merkezi glikokortikoid reseptörlerinde desensitizasyona neden olmaktadır.

Kronik stres hipokampusta geri dönüşümlü hasardan kalıcı nöron kaybına yol açan aralıkta zaman bağımlı nöronal hasarı indüklemektedir. Bu hasar hipokampus bağımlı öğrenme işlevlerini ve bilişsel yetileri bozmaktadır (97).

Bulgular, glikokortikoidlerin hipersekresyonu ve pro-inflamatuvar sitokinlerin artışının beyinde serotonerjik ve noradrenerjik fonksiyon bozukluğuna neden olarak depresyonun major semptomlarını oluşturduğunu göstermişlerdir. Anti-depresanlar glikokortikoidlerin etkisini tersine çevirirken sitokinlerin beyindeki olumsuz etkilerini de azaltmaktadır. (98).

Sunduğumuz çalışmanın deney protokolünde kullandığımız fluoksetin, serotonin geri alımını selektif olarak inhibe eden ilaçların prototipi olup en sık kullanılan antidepresandır. Depresyonun tedavisinde trisiklik anti-depresanlar kadar etkilidir. Demetilizasyon ile aktif metabolitli olan norfluoksetine çevrilir. Fluoksetin ve nor fluoksetin vücuttan yavaş atılırlar. İlacın yarı ömrü 1-10 gün, aktif metabolitlerinin yarı ömrü ise 3 ile 30 gün arasında değişir (121).

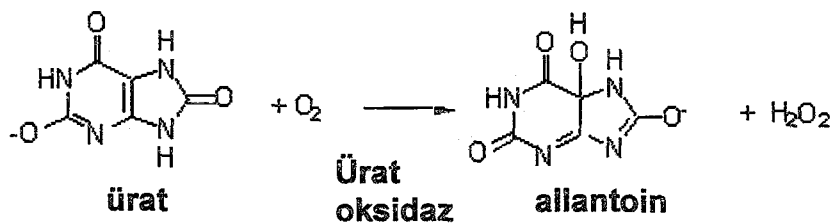
Son yıllarda, çeşitli çalışmalarda Peroksizom Proliferatörü Aktive edici Reseptör α (PPAR- α) geninin transkripsiyonel düzeyde glikokortikoidler tarafından regüle edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, stresin peroksizom indüksiyonuna neden olduğunu

bildiren az sayıda çalışma da mevcuttur (111, 112). Lemberger ve arkadaşları PPAR α alt grubunun yağ asiti metabolizmasıyla ilgili birçok hedef geni düzenlediğini kaydetmişlerdir. In vitro olarak primer hepatosit kültürlerinde PPAR α gen düzeylerinin glikokortikoidler tarafından düzenlendiğini bildirmişlerdir. Bu amaçla oluşturdukları immobilizasyon stres hayvan modelinde PPAR α geni karaciğerde indüklenirken hipokampusta böyle bir değişim izlenmemiştir. Sentetik glikokortikoid deksametazonun erişkin sıçanlara enjeksiyonuyla karaciğerde PPAR α geni benzer şekilde indüklenmiştir. Anti-glikokortikoid olan RU 486 kullanımıyla stres bağımlı indüksiyon inhibe olmuştur. Buna ek olarak bulgularına göre; karaciğer PPAR α mRNA ve protein düzeyleri kan kortikosteroid düzeylerine paralel olarak diüurnal bir ritmi takip etmektedir (111)

Amacımız bu çalışmadan yola çıkarak sıçanlarda oluşturulan immobilizasyon stres ile depresyon modelinde karaciğer peroksizomlarında proliferasyon olup olmadığının incelenmesidir. Bu konuda literatur taraması yapıldığında çok az veri elde edilmektedir. Bu nedenle PP göstergesi olarak peroksizomal enzim aktivitelerinin saptanması amaçlanmıştır.

Çünkü peroksizom proliferasyonu oluşturulduğunda peroksizomal enzimlerde indüklenme gerçekleşmektedir. En iyi bilinen peroksizomal enzimler; katalaz, ürat oksidaz ve açıl-KoA oksidazdır.

Ürat oksidaz; bakterilerden memelilere kadar çok çeşitli canlıda bulunup farklı metabolik roller üstlenmiştir. Yalnız insanda bu enzim bulunmamaktadır. 1930 'dan beri çalışılmakta olup Cu^{2+} bağımlı bir enzimdir. Katalizlediği reaksiyon O_2 bağımlı üratın allantoinine çevrilmesidir. Asıl ürün 5-hidroksiüurat olup enzim kullanmadan in vitro allantoinine dönüşmektedir.



2.12. Açil-KoA oksidaza genel bakış

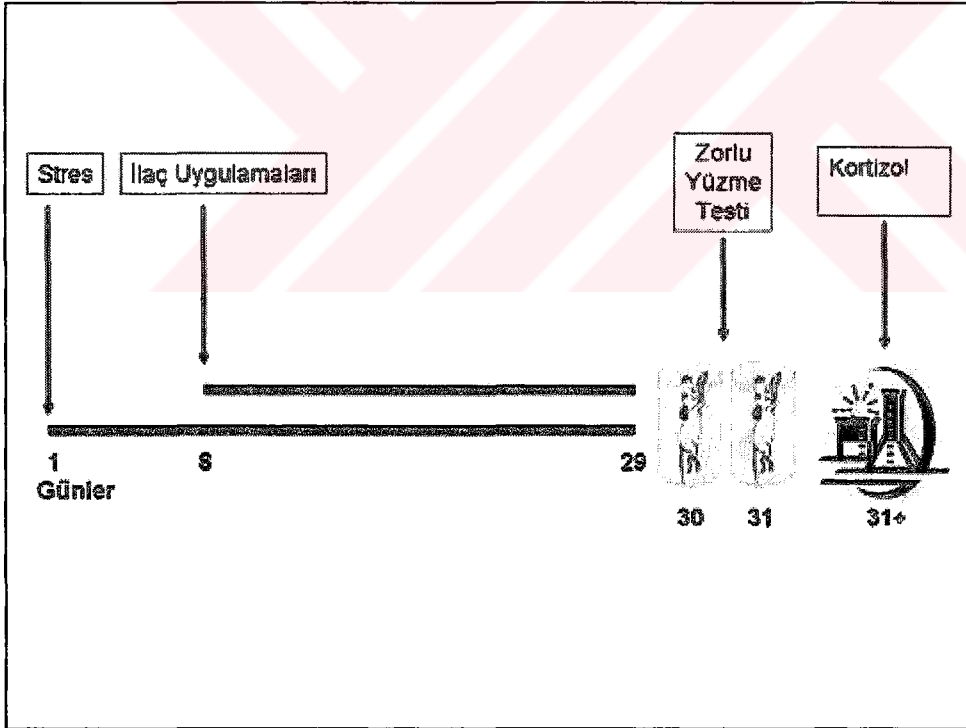
Peroksizomlar; hidrojen peroksiti yıkan katalaz ve hidrojen peroksit oluşturan oksidazları içeren subsellüler organellerdir.

Oksidazlar farklı substratlar üzerinden etki göstermektedir (bu türlere göre değişen; alkoller, poliaminler, nötral ve asidik D-aminoasitler, pürin metabolitleri, L-2-hidroksiasitler, açil-KoA'lar) Sıçanlarda,. şimdiye kadar prostoglandin, dikarboksilik yağ asitleri, ksenobiyotikler, çok uzun zincirli yağ asitleri, safra asiti ara ürünleri ve dallı zincirli yağ asitlerinin yıkımına yardımcı olan 3 tip açil KoA oksidaz tarif edilmiştir. 3 enzimin karakteristik substrat spektrumu ve doku dağılımları mevcuttur. En iyi bilineni palmitoil Koa oksidaz orijinal olarak Hashimoto ve Leighton grubu tarafından saflaştırılmıştır. Enzim uzun ve çok uzun zincirli yağ asitlerinin, kısa ve uzun zincirli dikarboksilik asitlerin ve prostoglandinlerin KoA esterlerine etki etmektedir. Doğal olarak 139 kDa moleküler ağırlığa sahipken 53 ve 21.6 kDa'luk subünitelerden oluşmaktadır ve sıçanlara hipolipidemik ilaç uygulanmasıyla aktivitesi birkaç kat indüklenmektedir. Diğer oksidaz; (pristanoil KoA oksidaz) pristanik asit gibi uzun zincirli 2-metil dallı yağ asitlerinin KoA esterleri üzerine fakat tabi ki düz zincirli yağ asitleri üzerine de etki etmektedir. Pristanoil KoA oksidaz peroksizom proliferatörleri ile indüklenmeyip, karaciğer ve böbrekte mevcuttur. 415 kDa (jel filtrasyonla) molekül kütlesine sahiptir ve 70 kDa subünitelerden oluşmaktadır. Üçüncü açil-KoA oksidaz; (trihidroksikoprostanoil KoA oksidaz) ise hipolipidemik ajanlarla indüklenmemektedir ve sadece karaciğerde bulunmaktadır. Bir safra asiti ara elemanı olan trihidroksikoprostanoil KoA üzerine etkilidir ve olasılıkla 70 kDa subünitelerin dimeridir.

3. ARAÇ-GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Stres modeli

Bu çalışmada sıçanlarda stres modeli Ege Üniversitesi Beyin Araştırmaları ve Uygulama Merkezi ve Fizyoloji AD 'da uygulanmıştır. Stres yanıtında cinsiyet farkları olduğu bilindiğinden çalışma gruplarında her grubun yarısı erkek yarısı dişi sıçan olarak düzenlendi. 40 adet 3 aylık Sprague Dawley sıçan serum fizyolojik (SF) (n=10), SF+fluoksetin (5 mg/kg/gün) (n=10), SF+stres (n=10), SF+stres+fluoksetin (5 mg/kg/gün) uygulanan (n=10) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Sıçanlarda oluşturulan depresyon modelinde, serotonin geri alım inhibitörü olan fluoksetin (FLX) ile stres yanıtının baskılandığı sıçanlarda, karaciğer peroksizomları incelendi. Stres göstergesi olarak, sıçanlardaki temel steroid olan kortikosteronun serum düzeyleri; peroksizom proliferasyon göstergesi olarak da karaciğer homojenatlarında peroksizomal enzim olan katalaz ve açıl-KoA oksidaz aktiviteleri tayin edildi.



Şekil 10: Peroksizomlarda uygulanan stres modeli

Stres, cam silindirlerde hareket kısıtlaması şeklinde, 30 gün boyunca 60 dk/gün uygulandı (Şekil 10). Stres uygulamasının 8. gününde FLX (5mg/kg/gün) veya serum fizyolojik (1mL/kg salin) uygulamasına başlandı ve enjeksiyonlar 23 gün

sürdü. İlaç uygulamalarının son iki gününde hareket kısıtlaması şeklindeki uygulamaya son verildi ve tüm hayvanlara Porsolt zorlu yüzme testi uygulandı.

Porsolt zorlu yüzme testi: Zorunlu yüzme testi büyük bir maliyet gerektirmeyen, kullanımı pratik ve hızlı olan ve çok yaygın olarak kullanılan bir hayvan depresyon modelidir. Literatür taramasında zorunlu yüzme testinin çeşitli deney protokollerinde yapılabileceği görülecektir

Depresif bozuklukların araştırması ve tedavisi ile ilgili çeşitli kuramlar ve modeller ileri sürülmüştür. Bunların içinde en ünlüsü Seligman tarafından ortaya atılan ve daha sonra yine aynı grup tarafından yeniden düzenlenen öğrenilmiş çaresizlik (learned helplessness) modelidir (Stoltz ve Galassi, 1989) (93). Seligman ve arkadaşları bu kavramı önceleri laboratuvar koşulları altında belirli deneylerden geçen köpeklerin davranışlarında gözledikleri değişiklikleri açıklamada kullanmışlardır. Ancak zamanla, bu kavram depresif bozuklukların gelişmesini açıklayan bir model haline gelmiştir (Uzunöz, 1990) (94).

Bu benzerliğin temelinde, depresyonun öğrenilmiş çaresizlik gibi, bireyin pekiştiriciler karşısında kontrolünü kaybettiğini ve bu yüzden herhangi bir uygun tepkileri verme cesaretini kaybettiğini öğrenmesine hizmet eden, kaçılmaz gibi görünen travmaların sonucu olduğunu öne sürmüştür (Bootzin, R. R. ,Acocella, R. J. , Alloy, L. B. ,1993) (95).

Seligman ve Overmier tarafından 1967 de tanımlanan, kontrol edilemeyen şokun yol açtığı stres kaynaklı depresyon hali olan öğrenilmiş çaresizlik ile Porsolt, Lepichon ve Jalfe'nin 1977 de geliştirdiği iki aşamadan oluşan zorunlu yüzme testi birbiri ile örtüşmektedir. Zorunlu yüzme testi antidepresan ilaçların ve beyin nörokimyası değişikliklerin gözlenmesinde kullanılan bir hayvan depresyon modelidir (Porsolt,Bertin,Jalfe,1997). Klasik zorunlu yüzme testinde sıçanlar birinci testte 15dk. , 24 saat sonra yapılan ikinci testte ise 5dk. süre ile kaçamayacakları bir silindirde yüzmeye zorlanır. Birinci yüzme testinde görülen hareketliliğin; baş sallama, dalma, yüzme gibi kaçma davranışlarının ikinci yüzme testinde anlamlı olarak azaldığı görülür. Bunun ilk test sırasındaki başarısızlığından kaynaklanan bir davranışsal umutsuzluğu yansıttığına inanılır. Bir çok antidepresan ilaç bu etkiyi tersine çevirebilir (Borsini ve Meli,1988).

Yakın zamanlarda, hareketsiz kalmaya ek olarak yüzme ve tırmanma gibi diğer aktif davranışları da skorlamak üzere yeni örnekleme teknikleri geliştirilmiştir (Detke ve ark.1995, Lucki 1997). Bu teknikle elde edilen sonuçlar, çok çeşitli antidepresanların zorlu yüzme testinde farklı davranış paternlerini indüklediğini göstermektedir.

Porsolt zorlu yüzme testi Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmüştür (92). Üç parametre incelenmiştir: Yüzme, immobilizasyon, tırmanma. Yüzme ve tırmanma sürelerinin kısa olup immobilizasyon sürelerinin uzun olması depresyon lehinedir.

Örneklerin alınması: Sıçanlar dekapite edilerek kuyruk kanları alındı ve serumları ayrıldı. Dekapitasyon sonrası sıçan KC 'leri diseke edilerek alındı. Serum ve KC doku örnekleri çalışma zamanına kadar derin dondurucuda (-80° C) saklandı. Sıçan serumlarında kortikosteron ölçümü Mattingly'nin fluometrik yöntemi ile (69), katalaz aktivitesi ölçümü karaciğer homojenatlarında Aebi yöntemi ile (70) , açil-KoA oksidaz aktivite tayini ise florometrik yöntemle (71) yapıldı. Katalazın ve açil-KoA oksidazın spesifik aktivitesi, aynı homojenatlarda Lowry yöntemiyle (68) ölçülen protein düzeylerine oranlanarak hesaplandı. İstatistiksel değerlendirmede SPSS 11.0 paket programındaki varyans analizi, regresyon analizi ve post-hoc testler kullanıldı.

3.2. Kortikosteron ölçümü (Mattingly yöntemi) (69)

3.2.1. Gerekli malzemeler

- Spektroflorometre (Shimadzu RF-5301 PC Spectrofluorophotometer)
- Florometrik kuartz küvet
- Hassas terazi (Scaltec SBC 31)
- Manyetik karıştırıcı (Heideolph)
- Vorteks (IKA MS1 minishaker)
- Diklorometan (Merck): Organik solvent olduğundan organik yapıdaki maddeleri çözme özelliği dikkate alınarak cam tüp dışında tüp kullanılmamalıdır.
- Konsantre H₂SO₄ (Merck)
- Distile etanol
- Floresan reaktifi (3 volüm etanol + 7 volüm H₂SO₄): Etanolün üzerine H₂SO₄ yavaşça eklenmelidir. Reaksiyon şiddetli ekzergonik olduğundan kap buz içinde veya akan suya tutularak hazırlanmalıdır.
- Kortikosteron standartı: 10 mg kortikosteron standartı 10 mL etanolde çözüldü. Bundan 1 mL alınarak 99 mL etanol eklendi. Sonuçta 1000 µgr/dL olan stok çözelti elde edildi. (4°'de saklamaya uygundur.)

3.2.2. Yöntem

	Analiz	Standart	Kör
Serum	0.5 mL		
Standart		0.5 mL	
Distile su			0.5 mL
Diklorometan	3.75 mL	3.75 mL	3.75 mL

Çalışma şekli: Diklorometan eklendikten sonra tüpler vortekste iyice karıştırıldı. Diklorometanın tabakalanması için 5-10 dk beklendi. Santrifüj edildikten sonra alt fazlar ayrı ayrı cam tüplere alındı. (Bu haliyle 0-4°C'de 24 saat bekleyebilir.) Daha sonra ayrılan bu alt fazların üzerine floresan reaktifi eklendi.

	Analiz	Standart	Kör
Alt faz	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
Fluoresan reaktifi	1.25 mL	1.25 mL	1.25 mL

Vorteksleyerek alt faz ve fluoresan reaktifinin iyice karışması sağlandı. Gözle en iyi görülecek şekilde üst fazı mavi röfle veren iki faza ayrıldı. 15 dk sonra alt faz küvete alınarak uyarıcısı 470 nm, 2.filtresi 530 nm olan florometre cihazında oluşan fluoresans saptandı.

1000 µgr/dL stok kortikosteron çözeltisinden 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 ng/mL olacak şekilde uygun dilüsyonlar yapılarak standart grafiği çizildi. Bu grafik kullanılarak örneklerin kortikosteron içeriği hesaplandı.



3.3. KC dokusunun homojenizasyonu

3.3.1. Gerekli malzemeler

- Homojenizatör (Braun Biotech International Potter S (800-1500 rpm))
- pH metre (InoLab WTW)
- Hassas terazi (Scaltec SBC 31)
- Vorteks (IKA MS1 minishaker)
- Manyetik karıştırıcı (Heideolph)
- Homojenizasyon çözeltisi (HM):
 1. 0.25 M sukroz
 2. 5 mM 3-N Morfonino propan sülfonik asit (MOPS)
 3. 1 mM EDTA
 4. %0.1 (v/v) etanol

Sukroz = 8.5575 gr, EDTA = 37,224 mg, MOPS = 104,65 mg, etanol = 100 l
100 mL distile suda çözölerek pH = 7.2' ye getirildi.

3.3.2. Yöntem

Homojenizasyon işlemi sırasında her zaman 0-4°C arasında çalışılmaya özen gösterildi. Reaktifler buzda hazırlandı.

Homojenizasyon işlemi iki aşamada ayrı günlerde gerçekleştirildi. Birinci aşamada: aynı dokuda protein ve katalaz, ikinci aşamada: aynı dokuda protein ve açil KoA oksidaz ölçümü yapıldı. Her seferinde yaklaşık 200 mg sıçan KC dokusu kullanıldı. 10 %'luk (w/v) KC homojenatı (200 mg doku / 2 mL HM) 10 kez 1200 rpm'de aşağı yukarı yumuşak vuruşlarla homogenize edildi. Daha sonra HM içinde 1/10 seyreltildi. (120 l homojenat /1080 l HM).Toplam seyreltme oranı 1/100 oldu. Daha sonra. homojenatın 100 l'si dokuda protein ölçümü için ayrılırken kalanından katalaz ölçümü, ikinci seferde de gene homojenatın 100 l'si dokuda protein ölçümü için ayrılırken kalanından da açil KoA oksidaz ölçümü yapıldı.

3.4. Katalaz aktivite ölçümü (Aebi yöntemi) (70)

3.4.1. Gerekli malzemeler

- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208 UV-VIS Spectrophotometer)
- Spektrofotometrik mikro cam ve kuartz küvet (Hellma)
- pH metre (InoLab WTW)
- Hassas terazi (Scaltec SBC 31)
- Vorteks (IKA MS1 minishaker)
- Manyetik karıştırıcı (Heideolph)
- 30 mM H₂O₂ tampon çözeltisi (0.34 mL %30'luk H₂O₂ + 99.66 mL fosfat tampon ile karıştırılarak hazırlandı.) (Ölçüm öncesinde taze hazırlanması gerekir.)
- 50 mM fosfat tampon (pH:7)

Tampon çözelti hazırlanışı:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{\text{K}_2\text{HPO}_4}{\text{KH}_2\text{PO}_4}$$

$$7 = 7.2 + \log \frac{\text{K}_2\text{HPO}_4}{\text{KH}_2\text{PO}_4}$$

$$0.2 = \log \frac{\text{KH}_2\text{PO}_4}{\text{K}_2\text{HPO}_4}$$

$$1.585 = 4 \frac{\text{KH}_2\text{PO}_4}{\text{K}_2\text{HPO}_4}$$

$$79.25 / 50 = \frac{\text{KH}_2\text{PO}_4}{\text{K}_2\text{HPO}_4}$$

$$544 \text{ mg KH}_2\text{PO}_4 / 80 \text{ mL} = 50 \text{ mM}$$

$$435 \text{ mg K}_2\text{HPO}_4 / 50 \text{ mL} = 50 \text{ mM}$$

79.25 / 50 = KH₂PO₄ / K₂HPO₄ oranı korunacak şekilde 79.25 mL 50 mM KH₂PO₄ ve 50 mL 50 mM K₂HPO₄ karıştırılarak pH=7 olan fosfat tampon elde edildi.

3.4.2. Yöntem:

Deney protokolüne göre hazırlanmış sıçanların KC homojenatları 1/100 oranında seyreltildi. Hesaplamalarda seyreltme faktörü dikkate alındı.

Örnek	0.1 mL			
H ₂ O ₂ tampon karışımı	3 mL			
Okuma küveti içinde karıştırılır. Absorbans değişimi 240 nm'de 2 dk boyunca 15'sn de bir kez okunur.				

Aktivitenin hesaplanması:

$$(2.3 * \log A1/ A2) / t * 6,93 * 10^{-3} \longrightarrow$$

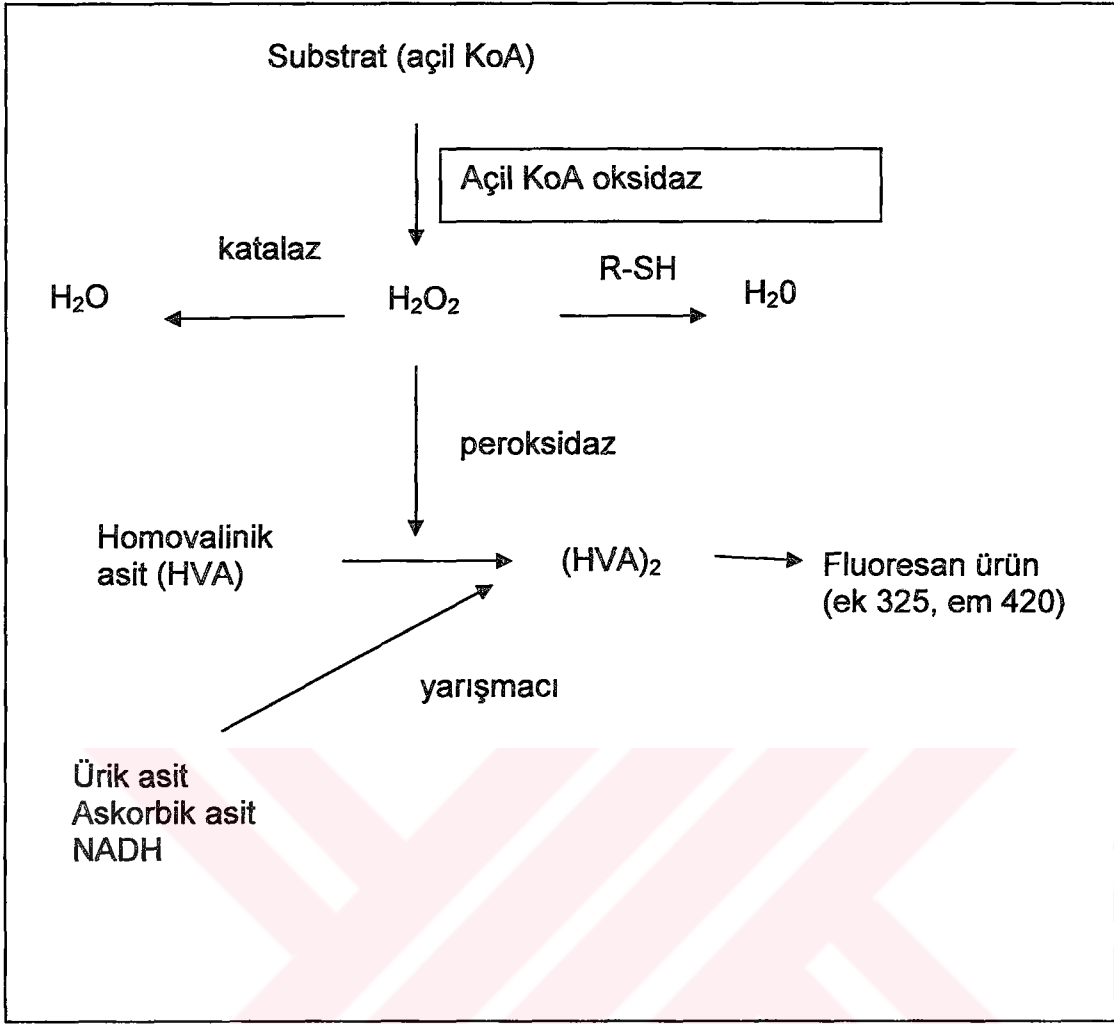
U / 0.1 mL U / mL'ye çevrildi.
Seyreltme dikkate alınarak mg proteine oranlandı.

A1 = ölçümün ilk okunan değeri
A2 = ölçümün son okunan değeri
t = total süre

2 dk boyunca okunan absorbanslar için yukarıdaki formül kullanılarak hesaplama yapılabilir. Bizim çalışmamızda 0. ve 30.sn'lardaki absorbans değerleri kullanıldı çünkü kinetik bu yöntemin ölçümünde lineariteden olan sapmanın en az olduğu aralık bu sn'ler arasındaydı. 1 dk'da 1 µmol H₂O₂'yi parçalayan enzim miktarı ünitedir. Mg protein başına düşen enzim aktivitesi U / mg protein olarak sonuçlar değerlendirildi.

3.5. Açil-KoA oksidaz aktivite ölçümü (71)

Bu çalışmada, substrat olarak palmitoil Koa kullanıldı ve palmitoil KoA oksidaz aktivitesi ölçüldü. Substrat bağımlı H_2O_2 oluşumu; peroksidaz katalizli homovalinik asitin fluoresan ürüne dimerizasyonunun saptanmasıyla ölçüldü. Çok H donörü olduğu halde homovalinik asit kullanılması tercih edildi çünkü veriler çok stabil ve sonuçlar yüksek duyarlılıktaydı. Ek olarak bu flurometrik ölçüm küçük hacimlerle tüm oksidazlara uyarlanabilmektedir ve pahalı substratların düşük miktarları tüketilmektedir. Oluşan H_2O_2 kimyasal olarak sülfhidril bileşikleriyle (glutatyon, dithiothreitol) veya enzimatik olarak katalazla yıkılabilir. Sonuncusunun interferansı örnekleri azid ile preinkübe ederek önlenabilmektedir. Eğer enzim stabilse kimyasal interferans diyaliz ile, eğer aktivite yüksekse seyreltme ile ortadan kaldırılabilir. NADH, askorbik asit, serotonin ve ürik asit gibi yarışmacı inhibitörlerin; biyolojik örneklerde H donörlerinin yeterli miktarının varlığında homovalinik asitle yarışmasına daha az raslanır. KoA esterleriyle karşılaşılan diğer problem; hidroliz (kimyasal olarak stok solüsyonlarda veya enzimatik olarak ölçüm sırasında) ile oluşun H_2O_2 ile birleşen serbest KoA esterleridir. Kimyasal interferans işlenmemiş homojenatı sitozolik ve nükleer fraksiyonu analiz ederken oluşun H_2O_2 oluşumu sırasındaki lag fazından sorumludur.



Şekil 11: HVA'in fluoresan ürüne dönüşümü

3.5.1. Gerekli malzemeler

- Spektroflorometre (Shimadzu RF-5301 PC Spectrofluorophotometer)
- Florometrik kuartz küvet
- pH metre (InoLab WTW)
- Su banyosu (Kotterman)
- Hassas terazi (Scaltec SBC 31)
- Vorteks (IKA MS1 minishaker)
- Manyetik karıştırıcı (Heideolph)
- Ependorf santrifüjü
- Reaksiyon karışımı:

1. Homovanilik asit (Aldrich ref. 14, 364-2; 1 g ; 98%)(60mM homovanilik asit 55 mg' ı 10 mL 0.1N HCl'de çözülmeli, -20°de bölerek saklanabilir, kullanmadan önce ısıtılmalı)
2. Peroksidaz (horse radish- grade II - ± 200 U: mg; Boehringer ref. 127361 ; 10.000 U); 1mg/mL peroksidaz (10 mg'ı 10 mL'de distile suda çözülmeli, -20°de bölerek saklanabilir.)
3. Palmitoil-KoA (Sigma p9276)) (1mM palmitoil-KoA çözeltisi bölerek dondurulabilir.)
4. Yağı alınmış bovine serum albumin (6%w/v BSA 5mL)
5. 0,2M K-fosfat tampon pH=8.3 (100 mL)

Tampon çözelti hazırlanışı:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{\text{K}_2\text{HPO}_4}{\text{KH}_2\text{PO}_4}$$

$$8,3 = 7.2 + \log \frac{\text{K}_2\text{HPO}_4}{\text{KH}_2\text{PO}_4}$$

$$1.1 = \log \frac{\text{K}_2\text{HPO}_4}{\text{KH}_2\text{PO}_4}$$

$$13 = \frac{\text{K}_2\text{HPO}_4}{\text{KH}_2\text{PO}_4}$$

$$6.69 \text{ gr} / 200 \text{ mL } \text{K}_2\text{HPO}_4 = 0,2 \text{ M}$$

$$272 \text{ mg} / 10 \text{ mL } \text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,2 \text{ M}$$

$$13 = \frac{\text{K}_2\text{HPO}_4}{\text{KH}_2\text{PO}_4}$$

oranını koruyacak şekilde 130 mL K_2HPO_4 + 10 mL KH_2PO_4 karıştırılarak pH = 8.3 olan 0,2M K-fosfat tampon elde edildi.

Reaksiyon karışımı bu 5 maddeden oluşturuldu ve karışım hazırlanırken tabloda verilen oranlar kullanıldı. Yalnız palmitoil KoA kör karışıma katılmazken, test uygulamasına katıldı.

- HClO_4 (8 % w/v) hazırlamak için yoğunluğu 1.67 gr / mL olan %70/lik perklorik asit kullanıldı. Bunun için perklorik asitten 6.87 mL alınarak 100 mL'ye tamamlandı.
- FAD- NaN_3 (25 μm FAD, 25 mM NaN_3) karışımı sağlanacak şekilde stok solüsyonlardan uygun seyreltme yapıldı. (4.1475 mg / 5 mL FAD + 422.565 mg NaN_3 /65 mL, 195 mL distile suda çözüldü. Gerektiğinde miktar azaltılarak çalışıldı.)

1. Flavin adenin dinükleotid (Boehringer ref. 1102338; 200mg) (1mM FAD, 1 mL hazırlanıp dondurularak saklanabilir, ışıktan korunmalıdır.)
 2. Sodyum azid (100mM NaN₃, 10mL, dondurularak saklanabilir.)
- 0,5M karbonat tampon pH=10.7-10mM EDTA: Karbonat tamponunda 10mM EDTA hazırlandı.

Tampon çözelti hazırlanışı:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{\text{NaHCO}_3}{\text{Na}_2\text{CO}_3}$$

$$10.7 = 11,08 + \log \frac{\text{NaHCO}_3}{\text{Na}_2\text{CO}_3}$$

$$0,38 = \log \frac{\text{Na}_2\text{CO}_3}{\text{NaHCO}_3}$$

$$2,4 = \frac{\text{Na}_2\text{CO}_3}{\text{NaHCO}_3}$$

$$63,6 \text{ gr} / 1200 \text{ mL Na}_2\text{CO}_3 = 0,5 \text{ M}$$

$$21 \text{ gr} / 500 \text{ mL NaHCO}_3 = 0,5 \text{ M}$$

2,4 = Na₂CO₃ / NaHCO₃ oranı korunacak şekilde 0.5 M 1200 mL Na₂CO₃ ile 0.5 M 500 mL NaHCO₃ birleştirilerek, pH=10.7 olan 0,5M karbonat tampon hazırlandı.

- Homojenizasyon çözeltisi (HM):

1. 0.25 M sukroz
2. 5 mM MOPS
3. 1 mM EDTA
4. %0.1 v/v etanol

Sukroz = 8.5575 gr, EDTA = 37,224 mg, MOPS = 104,65 mg, etanol = 100 µL
100 mL distile suda çözülerek pH = 7.2' ye getirildi.

3.5.2. Yöntem

1. 10 %'luk (w/v) KC homojenatı HM içinde 1/10 sulandırıldı. Toplam seyreltme oranı 1/100 oldu ve bu homojenat kullanıldı.
2. Reaksiyon karışımı uygun oranlarda hazırlandı.
3. 80 µL dilue homojenatı 5mL' lik reaksiyon tüplerinin dibine yerleştirdi. FAD-NaN₃'ün 20 µL 'si ile 0 °C'de 5-10 dakika arasında inkübe edildi.
4. 400 µL reaksiyon karışımını konarak reaksiyon başlatıldı.

5. 8-16-24 ve 32. dakikalarda 100 μL 'si alınarak 40 μL HClO_4 içeren ependorf tüplerine konuldu.
6. Toplam 140 μL örnek içeren ependorflar santrifüj edilerek süpernatanttan 100 μL alındı ve 1.5mL karbonat tampon konarak yaklaşık 10 dk sonra fluoresansı okundu. (exitasyon:327nm, em:420nm)



	Kör				Analiz			
10%(w/v) KC'in homojenatı HM ile 1/10 sulandırılıp (5mL'lik tüpe konuldu)	(80 µL)				(80 µL)			
FAD-NaN ₃ (25 µmolar FAD) (25 mM NaN ₃)	(20 µL)				(20 µL)			
O°C 'de 5-10dk arasında inkübasyon								
Reaksiyon karışımı	(400 µL)				(400 µL)			
KPI tampon POD BSA Palmitoil KoA Su HVA	450 180 22,5 - 1102,5 45				450 180 22,5 225 877,5 45			
Reaksiyon karışımından 8-16-24-32 dklarda 100 µL alınır								
40 µL HClO ₄ içeren ependorflar	40	40	40	40	40	40	40	40
	8	16	24	32dk	8	16	24	32dk
	100	100	100	100	100	100	100	100
Ependorflar santrifüj edilir supernatantlardan 100 µL alınır								
	100	100	100	100	100	100	100	100
Karbonat tampon (µL)	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
10 dk sonra fluometrede ex327 em420'de fluosansları okunur								

Şekil 12: Açıl-KoA oksidaz enzim aktivitesi ölçüm yöntemi

3.5.3. Yöntemin standardizasyonu (72)

Keller ve Sommer'in çalışmasında (72); homovalinik asit, horseradish peroksidaz kullanılarak 440 pmol H₂O₂ 'nin fluoresan değişimi (ΔF) = 18-19 olarak saptanmıştır. Toplam 2.215 mL'de 440 pmol H₂O₂'nin fluoresan değişimi (ΔF) = 18 olduğuna göre 199 nmol/L H₂O₂'nin fluoresan değişimi (ΔF) = 18' dir. Bu bilgi dikkate alınarak yöntemin standardize edilmesinde kullanılmıştır.

200 nmol/L H ₂ O ₂	(ΔF) = 18 /dk
x	absorbans (A)
<hr/>	
(A*200) *140(seyreltme faktörü) =x (nmol H ₂ O ₂ /dk)	
<hr/>	
18	
<hr/>	
x*100(seyreltme faktörü) (nmol H ₂ O ₂ /dk)	= x nmol H ₂ O ₂ /dk/ mg protein
protein(mg) *100(seyreltme faktörü)	
x değeri her okunan örneğin absorbansı için hesaplanmıştır.	
<u>Örneğin absorbansı:</u>	
(Örneğin 32. dk absorbansı - Örneğin 8. dk absorbansı)- (Örnek körünün 32. dk absorbansı – Örnek körünün 8. dk absorbansı) / 24 dk	

Açil-KoA oksidaz yöntemi çalışılırken örneklerin çalışma prosedüründe 140 kat seyreltme uygulandığından bu dikkate alınmıştır.

Homojenattan protein ve açil-KoA oksidaz aktivitesi çalışılırken yapılan 100 seyreltme faktörü hesaba katılmıştır.

3.6. Protein ölçümü (Lowry yöntemi) (68)

3.6.1. Gerekli malzemeler

- Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208 UV-VIS Spectrophotometer)
- Spektrofotometrik mikro cam ve kuartz küvet (Hellma)
- Manyetik karıştırıcı (Heideolph)
- Hassas terazi (Scaltec SBC 31)
- Vorteks (IKA MS1 minishaker)
- Alkali bakır çözeltisi

2. %2'lik 100 mL Na₂CO₃: 0.1 N NaOH'in 100 mL'sinde 2 gr

Na₂CO₃:çözülerek elde edildi.

3. 1 mL %1'lik Cu SO₄.

4. 1 mL %2.7'lik Na-K tartarat

Yukarıdaki 3 çözelti karıştırılarak alkali bakır çözeltisi elde edildi.

- 1/1 oranında 1N HCl ile seyreltilmiş Folin-Chiocalteu reaktifi

Folin-Chiocalteu çözeltisi:

Bir balon içerisine 100 gr. Sodyum tungstat, 25 gr. Sodyum molibdat, 700 mL distile su, 50 mL fosforik asit ve 100 mL konsantre HCl konulur ve geri soğutucu altında 10 saat kaynatılır. 150 gr. Lityum sülfat, 150 mL distile su ve 1-2 damla brom eklendikten sonra geri soğutucusuz olarak 15 dk daha kaynatılır. Soğutulduktan sonra 1 L'ye distile su ile tamamlanır. Belirli bir hacim alınarak fenolfitaleine karşı 0.1 N sodyum hidroksit ile titre edilerek normalitesi belirlenir. Normalitesi 1 olacak şekilde 1 N HCl ile seyreltilir.

- Bovin serum albuminden 200 mg/dL stok çözelti hazırlanarak uygun dilüsyonlar yapıldı.

3.6.2. Yöntem:

Protein ölçümü sıçan KC doku homojenatlarında yapıldı. Seçilen yöntemin (Lowry) ölçüm aralığında analiz yapabilmek için doku homojenatlarından farklı seyreltmeler (1/2, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/1500, 1/2000) yapıldı. En uygun seyreltme oranı protein için 1/100 olarak belirlendi. Diğer çalışmalarda da (katalaz ve açil-KoA oksidaz aktivitesinin ölçümü için) örneklerin 1/100 dilüsyonu uygun bulundu. Hesaplamalarda bu seyreltme faktörü dikkate alındı.

	Örnek	Kör
Doku homojenatı	0.1 mL	
Distile su	0.9 mL	1 mL
Alkali bakır çözeltisi	5 mL	5 mL
Kariştirilerek oda ısısında 10 dk bekletildi		
Dilue folin	0.5 mL	0.5 mL
Kariştirilerek oda ısısında 30 dk bekletildi. 750 nm'de köre karşı okundu.		

20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 mg / dL' lik protein standart çözeltileri hazırlanarak absorbanları spektrofotometrede okundu. Lineer regresyon ile protein standart grafiği çizilerek örneklerden elde edilen absorbanlar bu grafikte değerlendirildi.



4. BULGULAR

4.1. Serum kortikosteron sonuçları

40 adet Sprague Dawley sıçandan oluşturulan 4 grubun serum kortikosteron sonuçları Tablo 5' de verilmiştir. Bir örnek için iki okuma yapıp 2 okumanın ortalaması alınmıştır.

Tablo 5 : serum kortikosteron (ng/mL) sonuçları

- 1. grup = serum fizyolojik (sf) (n=10),
- 2. grup = SF+fluoksetin (fx) (5 mg/kg/gün) (n=10),
- 3. grup = SF+stres (n=10),
- 4. grup = SF+stres+fluoksetin (5 mg/kg/gün) uygulanan (n=10)
- cinsiyet: D = dişi, E = erkek

Cinsiyet	Uygulanan tedavi	Serum kortikosteronu (ng/mL)
E	sf	273
E	sf	299
E	sf	665
E	sf	446
E	sf	453
D	sf	140
D	sf	523
D	sf	675
D	sf	751
D	sf	357
E	sf + fx	101
E	sf + fx	108
E	sf + fx	701
E	sf + fx	461
E	sf + fx	293
D	sf + fx	87
D	sf + fx	761
D	sf + fx	1329
D	sf + fx	394
D	sf + fx	64
E	sf + stres	275
E	sf + stres	146
E	sf + stres	99
E	sf + stres	395
E	sf + stres	178
D	sf + stres	152
D	sf + stres	689
D	sf + stres	1054
D	sf + stres	712
D	sf + stres	354
E	sf + fx + stres	98
E	sf + fx + stres	253
E	sf + fx + stres	74
E	sf + fx + stres	218
E	sf + fx + stres	274
D	sf + fx + stres	117
D	sf + fx + stres	888
D	sf + fx + stres	764
D	sf + fx + stres	361
D	sf + fx + stres	273

4.2. Karaciğer katalaz spesifik aktivitesi sonuçları

40 adet Sprague Dawley sıçandan oluşturulan 4 grubun KC homojenatlarındaki katalaz aktivite sonuçları Tablo 6' da verilmiştir. Bir örnek için iki okuma yapıp 2 okumanın ortalaması alınmıştır.

Tablo 6 : KC homojenatı katalaz aktivitesi sonuçları

- 1. grup = serum fizyolojik (sf) (n=10),
- 2. grup = SF+fluoksetin (fx) (5 mg/kg/gün) (n=10),
- 3. grup = SF+stres (n=10),
- 4. grup = SF+stres+fluoksetin (5 mg/kg/gün) uygulanan (n=10)
- cinsiyet: D = dişi, E = erkek

cinsiyet	tedavi	A1	A2	Katalaz U / mL	protein mg/mL	katalaz U / mg protein	iki değerin ortalaması
E	sf	1225	959	11,76	1,345	8,74	7,86
E	sf	1248	1012	10,07	1,44	6,99	
E	sf	1174	771	20,20	1,7	11,88	13,31
E	sf	1240	824	19,63	1,332	14,74	
E	sf	1038	721	17,50	1,4	12,50	13,84
E	sf	1069	680	21,73	1,432	15,17	
E	sf	1157	851	14,75	1,334	11,06	9,86
E	sf	1215	954	11,61	1,34	8,67	
E	sf	1127	811	15,80	1,343	11,77	12,62
E	sf	1182	807	18,33	1,36	13,48	
D	sf	1302	1016	11,91	1,722	6,92	6,30
D	sf	1331	1011	13,21	2,32	5,69	
D	sf	1245	942	13,39	1,198	11,18	10,20
D	sf	1300	1012	12,03	1,304	9,22	
D	sf	1203	929	12,41	1,373	9,04	9,34
D	sf	1230	929	13,48	1,397	9,65	
D	sf	1244	968	12,05	1,35	8,92	8,98
D	sf	1269	980	12,41	1,373	9,04	
D	sf	1258	925	14,77	1,438	10,27	10,31
D	sf	1290	943	15,05	1,454	10,35	
E	sf + fx	1094	752	18,01	2,14	8,41	10,66
E	sf + fx	952	669	16,94	1,312	12,91	
E	sf + fx	1129	780	17,76	1,34	13,25	12,83
E	sf + fx	1169	797	18,40	1,482	12,41	
E	sf + fx	1120	843	13,65	1,47	9,28	10,89
E	sf + fx	1145	773	18,87	1,509	12,50	
E	sf + fx	1157	841	15,32	1,453	10,54	10,01
E	sf + fx	1193	897	13,70	1,446	9,47	
E	sf + fx	1193	835	17,14	1,46	11,74	11,75
E	sf + fx	1258	875	17,44	1,482	11,77	
D	sf + fx	1302	975	13,89	1,444	9,62	9,67
D	sf + fx	1302	1030	11,25	1,157	9,73	
D	sf + fx	1386	1143	9,26	1,195	7,75	7,58
D	sf + fx	1323	1107	8,56	1,154	7,42	
D	sf + fx	1230	941	12,86	1,24	10,37	10,22

D	sf + fx	1255	970	12,37	1,228	10,07	
D	sf + fx	1271	1064	8,54	1,356	6,29	6,36
D	sf + fx	1296	1086	8,49	1,322	6,42	
D	sf + fx	1320	1093	9,06	1,252	7,24	7,36
D	sf + fx	1378	1129	9,57	1,278	7,49	
E	sf +stres	1094	708	20,90	1,378	15,17	13,89
E	sf +stres	952	656	17,89	1,419	12,60	
E	sf +stres	1117	734	20,17	2,264	8,91	12,47
E	sf +stres	1174	750	21,52	1,343	16,03	
E	sf +stres	1143	771	18,91	1,33	14,22	13,07
E	sf +stres	1226	871	16,42	1,378	11,91	
E	sf +stres	1133	800	16,72	1,321	12,65	13,28
E	sf +stres	1198	818	18,33	1,317	13,91	
E	sf +stres	1127	745	19,88	1,563	12,72	12,15
E	sf +stres	1209	826	18,30	1,581	11,57	
D	sf +stres	1434	1166	9,94	1,504	6,60	6,79
D	sf +stres	1362	1166	7,46	1,069	6,98	
D	sf +stres	1170	831	16,43	1,25	13,15	14,41
D	sf +stres	1220	827	18,68	1,192	15,67	
D	sf +stres	1335	1096	9,47	1,27	7,46	7,37
D	sf +stres	1335	1096	9,47	1,302	7,27	
D	sf +stres	1227	969	11,34	1,492	7,60	7,94
D	sf +stres	1222	943	12,45	1,501	8,29	
D	sf +stres	1266	958	13,39	1,321	10,13	10,44
D	sf +stres	1287	964	13,88	1,292	10,74	
E	sf + fx + stres	1077	730	18,68	1,381	13,52	13,44
E	sf + fx + stres	1094	752	18,01	1,348	13,36	
E	sf + fx + stres	1244	775	22,73	1,351	16,82	16,16
E	sf + fx + stres	1163	691	25,01	1,613	15,50	
E	sf + fx + stres	1203	847	16,85	1,468	11,48	10,87
E	sf + fx + stres	1230	896	15,22	1,482	10,27	
E	sf + fx + stres	1102	764	17,59	1,296	13,58	13,13
E	sf + fx + stres	1157	818	16,65	1,312	12,69	
E	sf + fx + stres	1166	816	17,14	1,372	12,49	12,16
E	sf + fx + stres	1233	875	16,47	1,393	11,82	
D	sf + fx + stres	1387	1001	9,98	1,523	6,55	8,91
D	sf + fx + stres	1434	1030	15,89	1,411	11,26	
D	sf + fx + stres	1300	1057	9,94	1,217	8,16	8,05
D	sf + fx + stres	1360	1107	9,88	1,244	7,94	
D	sf + fx + stres	1271	986	12,19	1,21	10,08	9,89
D	sf + fx + stres	1301	1014	11,97	1,233	9,71	
D	sf + fx + stres	1179	882	13,94	1,465	9,51	9,60
D	sf + fx + stres	1246	926	14,26	1,472	9,68	
D	sf + fx + stres	1292	1044	10,24	1,292	7,92	6,95
D	sf + fx + stres	1287	934	7,70	1,289	5,97	

4.3. Karaciğer Açıl KoA oksidaz spesifik aktivitesi sonuçları

40 adet Sprague Dawley sıçandan oluşturulan 4 grubun KC homojenatlarındaki açıl-KoA oksidaz aktivite sonuçları Tablo 7' de verilmiştir. Her örnek için örnek körü kullanılmıştır.

Tablo 7 : KC homojenatı açıl-KoA oksidaz aktivitesi (nmol/dk/mg protein) sonuçları

- 1. grup = serum fizyolojik (sf) (n=10),
- 2. grup = SF+fluoksetin (fx) (5 mg/kg/gün) (n=10),
- 3. grup = SF+stres (n=10),
- 4. grup = SF+stres+fluoksetin (5 mg/kg/gün) uygulanan (n=10)
- cinsiyet: D = dişi, E = erkek

cinsiyet	Tedavi	Örnek körü 8. dk	Örnek körü 32. dk	Örnek 8. dk	Örnek 32. dk	Açıl-KoA oksidaz nmol / dk	protein mg/ L	Açıl-KoA oksidaz nmol / dk / mg protein
E	sf	7,145	12,943	16,369	35,141	840,90	1280	0,65
E	sf	7,581	11,421	15,103	33,081	916,35	1305,5	0,70
E	sf	6,541	12,071	13,042	41,112	1460,92	1344,5	1,08
E	sf	7,145	12,762	16,362	36,937	969,50	1220,5	0,79
E	sf	6,631	12,062	13,91	44,921	1657,96	1242,5	1,33
D	sf	7,504	10,103	15,561	26,237	523,50	1203	0,43
D	sf	6,954	7,412	9,609	24,503	935,66	1330	0,70
D	sf	5,19	7,452	11,11	22,187	571,34	1217	0,46
D	sf	6,513	6,194	11,123	23,76	839,74	1223,5	0,68
D	sf	6,113	8,103	9,014	25,04	909,74	1177	0,77
E	sf+fx	10,849	18,109	20,194	47,911	1325,91	1339,5	0,98
E	sf+fx	10,416	17,121	10,818	23,803	407,03	1250	0,32
E	sf+fx	11,192	20,198	14,141	47,223	1560,48	1233,5	1,26
E	sf+fx	10,994	18,666	20,904	45,004	1064,77	1268	0,83
E	sf+fx	15,41	21,245	14,88	50,569	1934,98	1334	1,45
D	sf+fx	10,543	13,042	15,707	27,612	609,64	1266,5	0,48
D	sf+fx	7,451	8,611	11,351	29,942	1129,78	1356,5	0,83
D	sf+fx	8,541	11,427	12,61	30,361	963,47	1293,5	0,74
D	sf+fx	8,541	10,777	12,78	29,053	909,80	1271,5	0,71
D	sf+fx	7,145	9,103	11,78	28,14	933,46	1100	0,84
E	sf+stres	6,141	10,153	11,032	21,931	446,37	1280	0,34
E	sf+stres	7,531	11,23	10,103	25,191	738,17	1305	0,56
E	sf+stres	7,232	15,541	16,903	39,71	939,68	1269,5	0,74
E	sf+stres	5,504	10,738	11,104	23,737	479,56	1349,5	0,35
E	sf+stres	8,986	15,536	16,567	38,71	1010,65	1415	0,71
D	sf+stres	6,103	9,912	10,104	22,412	550,86	1253	0,43
D	sf+stres	8,426	10,153	11,842	23,249	627,40	1261,5	0,49
D	sf+stres	7,613	9,411	9,103	25,261	930,74	1316	0,70
D	sf+stres	8,127	9,317	9,557	22,796	780,95	1360	0,57
D	sf+stres	8,103	9,73	10,151	19,103	474,76	1175	0,40
E	sf+fx+stres	6,144	8,138	12,042	24,147	655,34	1223,5	0,53
E	sf+fx+stres	8,199	14,106	11,105	30,456	871,37	1313,5	0,66
E	sf+fx+stres	8,042	11,104	15,541	36,089	1133,35	1305	0,86
E	sf+fx+stres	6,67	8,386	11,241	25,798	832,28	1301,5	0,63
E	sf+fx+stres	9,03	11,973	16,966	38,083	1177,94	1027	1,14
D	sf+fx+stres	6,103	8,192	12,632	23,523	570,50	1180	0,48
D	sf+fx+stres	9,716	11,891	12,104	31,416	1110,73	1254,5	0,88
D	sf+fx+stres	6,512	8,104	14,421	23,603	491,94	1243,5	0,39
D	sf+fx+stres	8,758	15,812	12,664	29,133	610,23	1389,5	0,43
D	sf+fx+stres	9,153	12,851	12,159	30,108	923,67	1095,5	0,84

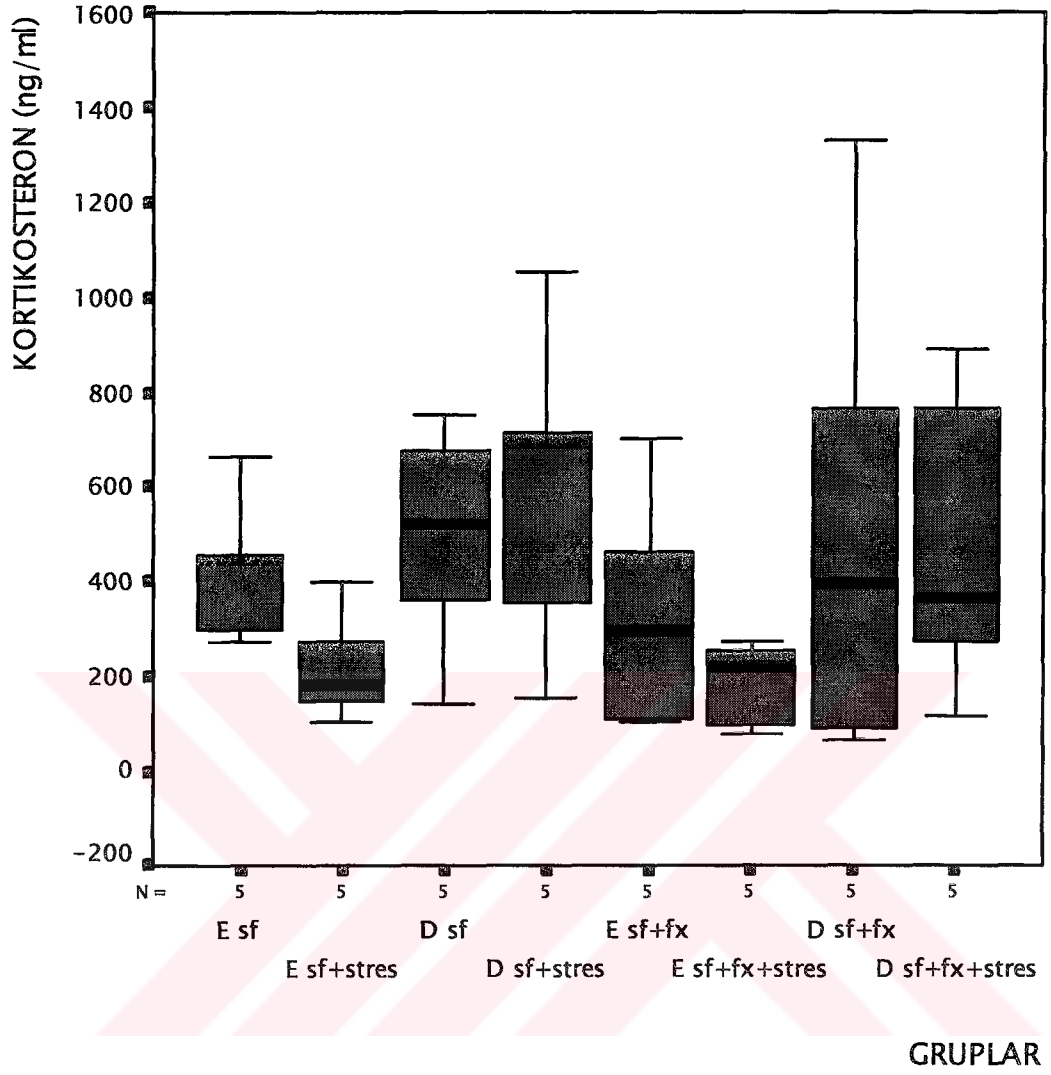
4.4. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi

Tablo 8 : Serum kortikosteronu ve KC homojenatı katalaz ve açil-KoA oksidaz aktivitesi sonuçlarının tanımlayıcı istatistik değerlendirilmesi:

- 1. grup = serum fizyolojik (sf) (n=10),
- 2. grup = SF+fluoksetin (fx) (5 mg/kg/gün) (n=10),
- 3. grup = SF+stres (n=10),
- 4. grup = SF+stres+fluoksetin (5 mg/kg/gün) uygulanan (n=10)
- cinsiyet: D = dişi, E = erkek

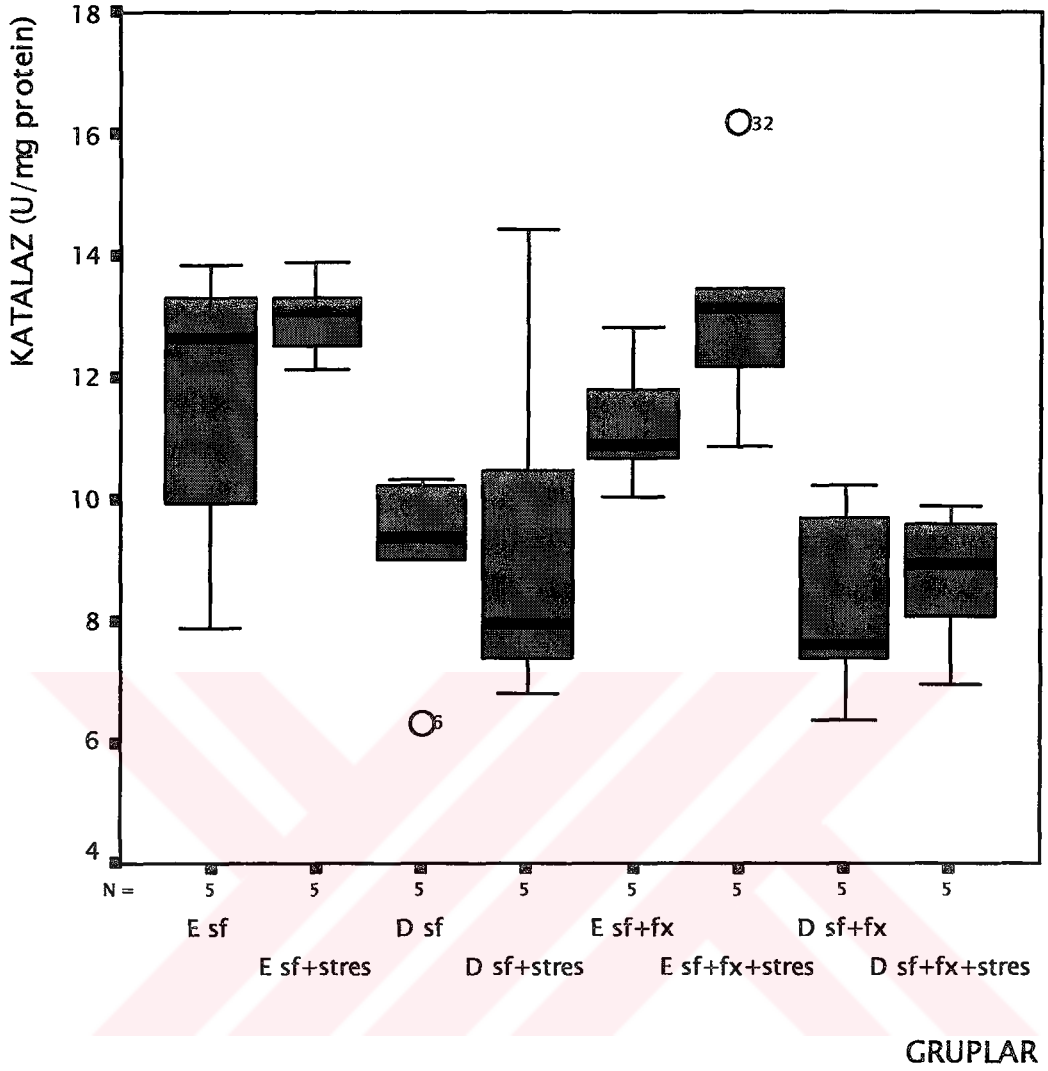
cinsiyet	tedavi		Kortikosteron	Açil-KoA	Katalaz
E	sf	ortalama	427,2000	,9112	11,5084
		N	5	5	5
		std. sapma	156,3496	,2887	2,5419
		ortanca	446,0000	,7900	12,6300
		minimum	273,00	,65	7,86
		maksimum	665,00	1,33	13,84
		değer aralığı	392,00	,68	5,98
		varyans	24445,200	8,337E-02	6,461
		ortalamanın std hatası	69,9217	,1291	1,1368
		D	sf	ortalama	489,2000
N	5			5	5
std. sapma	246,7898			,1529	1,6239
ortanca	523,0000			,6800	9,3500
minimum	140,00			,43	6,31
maksimum	751,00			,77	10,31
değer aralığı	611,00			,34	4,01
varyans	60905,200			2,337E-02	2,637
ortalamanın std hatası	110,3677			6,837E-02	,7262
E	sf + flx			ortalama	332,8000
		N	5	5	5
		std. sapma	253,8980	,4349	1,0903
		ortanca	293,0000	,9800	10,8970
		minimum	101,00	,32	10,01
		maksimum	701,00	1,45	12,83
		değer aralığı	600,00	1,13	2,82
		varyans	64464,200	,189	1,189
		ortalamanın std hatası	113,5466	,1945	,4876
		D	sf + flx	ortalama	527,0000
N	5			5	5
std. sapma	530,0042			,1454	1,6377
ortanca	394,0000			,7400	7,5900
minimum	64,00			,48	6,36
maksimum	1329,00			,84	10,23
değer aralığı	1265,00			,36	3,87

		varyans	280904,500	2,115E-02	2,682
		ortalamanın std hatası	237,0251	6,504E-02	,7324
E	sf + stress	ortalama	218,6000	,5400	12,9800
		N	5	5	5
		std. sapma	117,8147	,1907	,6804
		ortanca	178,0000	,5600	13,0700
		minimum	99,00	,34	12,15
		maksimum	395,00	,74	13,89
		değer aralığı	296,00	,40	1,74
		varyans	13880,300	3,635E-02	,463
		ortalamanın std hatası	52,6883	8,526E-02	,3043
D	sf + stress	ortalama	592,2000	,5180	9,3934
		N	5	5	5
		std. sapma	349,1049	,1207	3,1302
		ortanca	689,0000	,4900	7,9480
		minimum	152,00	,40	6,80
		maksimum	1054,00	,70	14,41
		değer aralığı	902,00	,30	7,61
		varyans	121874,200	1,457E-02	9,798
		ortalamanın std hatası	156,1244	5,398E-02	1,3999
E	sf + stres + flx	ortalama	183,4000	,7640	13,1584
		N	5	5	5
		std. sapma	91,5303	,2419	1,9579
		ortanca	218,0000	,6600	13,1380
		minimum	74,00	,53	10,88
		maksimum	274,00	1,14	16,17
		değer aralığı	200,00	,61	5,29
		varyans	8377,800	5,853E-02	3,833
		ortalamanın std hatası	40,9336	,1082	,8756
D	sf + stres + flx	ortalama	480,6000	,6040	8,6836
		N	5	5	5
		std. sapma	330,1126	,2363	1,2002
		ortanca	361,0000	,4800	8,9100
		minimum	117,00	,39	6,95
		maksimum	888,00	,88	9,90
		değer aralığı	771,00	,49	2,95
		varyans	108974,300	5,583E-02	1,440
		ortalamanın std hatası	147,6308	,1057	,5367
	Toplam	ortalama	406,3750	,7041	10,5293
		N	40	40	40
		std. sapma	299,4301	,2734	2,5148
		ortanca	326,5000	,7000	10,2700
		minimum	64,00	,32	6,31
		maksimum	1329,00	1,45	16,17
		değer aralığı	1265,00	1,13	9,86
		varyans	89658,394	7,475E-02	6,324
		ortalamanın std hatası	47,3441	4,323E-02	,3976



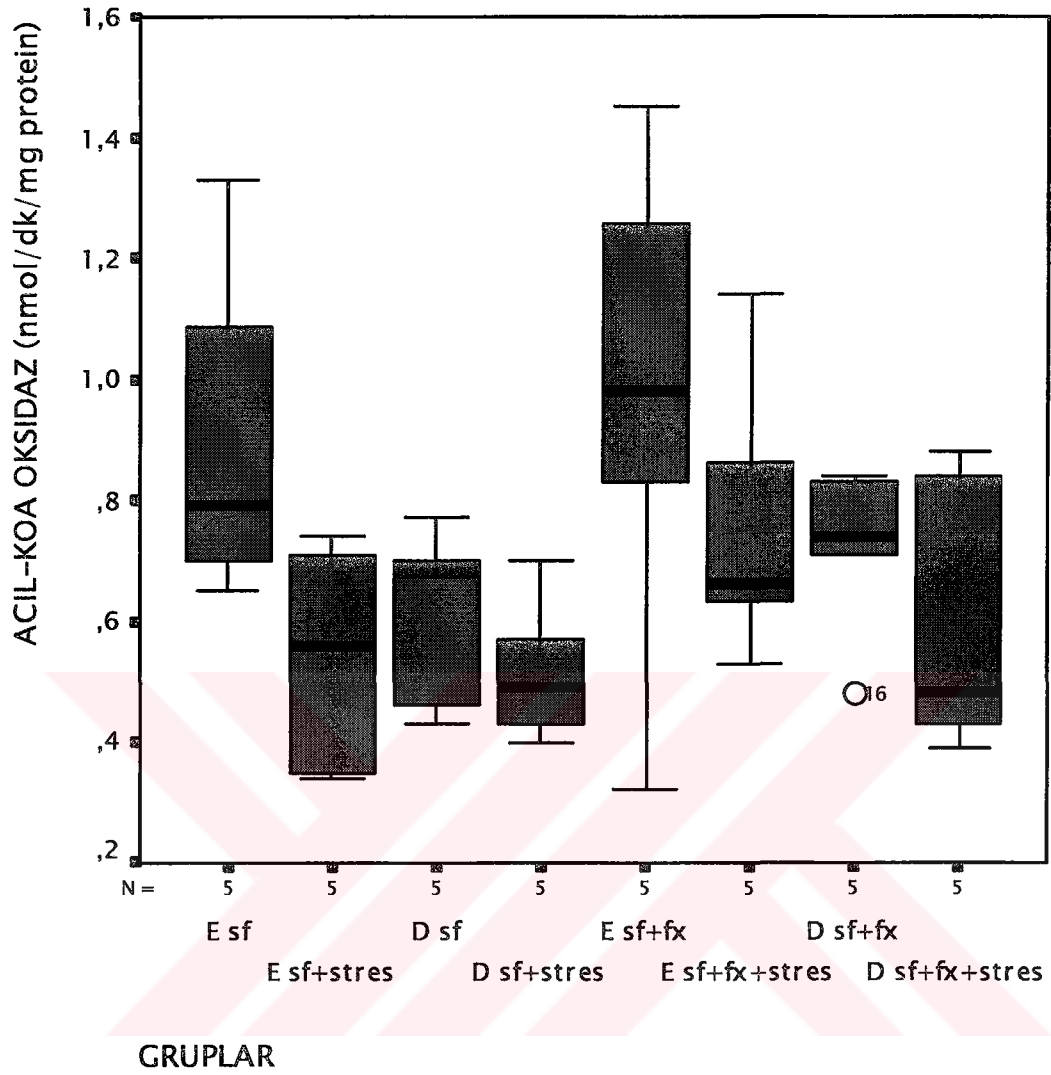
Şekil 13: Kortikosteron ölçümünün gruplara göre box-plot grafiği:

- 1. grup = serum fizyolojik (sf) (n=10),
- 2. grup = SF+fluoksetin (fx) (5 mg/kg/gün) (n=10),
- 3. grup = SF+stres (n=10),
- 4. grup = SF+stres+fluoksetin (5 mg/kg/gün) uygulanan (n=10)
- cinsiyet: D = dişi, E = erkek



Şekil 14: Karaciğer katalaz aktivitesi ölçümünün gruplara göre box-plot grafiği:

- 1. grup = serum fizyolojik (sf) (n=10),
- 2. grup = SF+fluoksetin (fx) (5 mg/kg/gün) (n=10),
- 3. grup = SF+stres (n=10),
- 4. grup = SF+stres+fluoksetin (5 mg/kg/gün) uygulanan (n=10)
- cinsiyet: D = dişi, E = erkek



Şekil 15: Karaciğer açil-KoA oksidaz aktivitesi ölçümünün gruplara göre box-plot grafiği:

- 1. grup = serum fizyolojik (sf) (n=10),
- 2. grup = SF+fluoksetin (fx) (5 mg/kg/gün) (n=10),
- 3. grup = SF+stres (n=10),
- 4. grup = SF+stres+fluoksetin (5 mg/kg/gün) uygulanan (n=10)
- cinsiyet: D = dişi, E = erkek

Tablo 9: Gruplar ve faktörler

		değişken
CINSİYET	1,00	E (erkek)
	2,00	D (dişi)
STRES	1,00	stres (-)
	2,00	stres (+)
TEDAVİ	1,00	sf (serum fizyolojik)
	2,00	fx (fluoksetin)

Tablo 10: Kortikosteronun univariate analizi:

BAĞIMLI DEĞİŞKEN: KORTİKOSTERON

	Tip III Kareler toplamı	df	Ortalamanın karesi	F	Sig.
Doğrulanmış model	761374,575	7	108767,796	1,272	,295
Kesisim	6605625,625	1	6605625,625	77,278	,000
CINSİYET	537080,625	1	537080,625	6,283	*.017
STRES	56776,225	1	56776,225	,664	,421
TEDAVİ	25857,225	1	25857,225	,303	,586
CINSİYET*STRES	107433,225	1	107433,225	1,257	,271
CINSİYET*TEDAVİ	1946,025	1	1946,025	,023	,881
STRES*TEDAVİ	5085,025	1	5085,025	,059	,809
CİNSİYET*STRES*TEDAVİ	27196,225	1	27196,225	,318	,577
Hata	2735302,800	32	85478,213		
Toplam	10102303,000	40			
Doğrulanmış toplam	3496677,375	39			

R kare = 0,218 (Ayarlanabilir R kare = 0,047)

*P<0.05

- Yukarıdaki tabloda görüldüğü gibi kortikosteron düzeyleri cinsiyetler arasında farklılık göstermektedir (p=0.017)
- Kortikosteron düzeylerini stresin uygulanıp uygulanmaması veya fluoksetin kullanıp kullanılmaması etkilememektedir (sırasıyla p=0.421, p=0.586)
- Kortikosteron düzeylerine cinsiyet farklılığının etkisi stres uygulamasından ve uygulanan tedavi protokolünden ve (stres uygulaması + tedavi protokolünden) bağımsızdır (sırasıyla p=0.271, p=0.881, p=0.577).

Tablo 11: Katalazın univariate analizi:

BAĞIMLI DEĞİŞKEN: KATALAZ

	Tip III Kareler toplamı	df	Ortalamanın karesi	F	Sig.
Doğrulanmış model	132,639	7	18,948	5,318	,000
Kesisim	4434,646	1	4434,646	1244,651	,000
CINSİYET	114,332	1	114,332	32,089	,000
STRES	11,006	1	11,006	3,089	,088
TEDAVI	1,591	1	1,591	,447	,509
CINSİYET*STRES	4,217	1	4,217	1,184	,285
CINSİYET*TEDAVI	1,228	1	1,228	,345	,561
STRES*TEDAVI	,177	1	,177	,050	,825
CİNSİYET*STRES*TEDAVI	8,780E-02	1	8,780E-02	,025	,876
Hata	114,015	32	3,563		
Toplam	4681,301	40			
Doğrulanmış toplam	246,654	39			

R kare = 0,538 (Ayarlanabilir R kare = 0,437)

*P<0.05

- Yukarıdaki tabloda görüldüğü gibi katalaz aktivite düzeyleri cinsiyetler arasında farklılık göstermektedir (p=0.000)
- Katalaz aktivite düzeylerini stresin uygulanıp uygulanmaması veya fluoksetin kullanılıp kullanılmaması etkilememektedir (sırasıyla p=0.088, p=0.509)
- Katalaz düzeylerine cinsiyet farklılığının etkisi stres uygulamasından ve uygulanan tedavi protokolünden ve (stres uygulaması + tedavi protokolünden) bağımsızdır (sırasıyla p=0.285, p=0.561, p=0.876).

Tablo 12: Açıl-KoA oksidazın univariate analizi:

BAĞIMLI DEĞİŞKEN: ACIL-KOA OKSİDAZ

	Tip III Kareler toplamı	df	Ortalamanın karesi	F	Sig.
Doğrulanmış model	,986	7	,141	2,336	,048
Kesim	19,833	1	19,833	328,950	,000
CINSİYET	,336	1	,336	5,573	*,025
STRES	,381	1	,381	6,326	*,017
TEDAVI	,143	1	,143	2,376	,133
CINSİYET*STRES	8,519E-02	1	8,519E-02	1,413	,243
CİNSİYET*TEDAVI	4,285E-03	1	4,285E-03	,071	,791
STRES*TEDAVI	1,246E-02	1	1,246E-02	,207	,652
CİNSİYET*STRES*TEDAVI	2,333E-02	1	2,333E-02	,387	,538
Hata	1,929	32	6,029E-02		
Toplam	22,748	40			
Doğrulanmış toplam	2,915	39			

R kare = 0,338 (Ayarlanabilir R kare = 0,193)

*P<0.05

- Yukarıdaki tabloda görüldüğü gibi açıl-KoA oksidaz aktivite düzeyleri cinsiyetler arasında farklılık göstermektedir (p=0.025)
- Açıl-KoA oksidaz aktivitesini stresin uygulanması etkilemektedir (p=0.017)
- Enzim aktivitesini fluoksetin kullanıp kullanmaması etkilememektedir (p=0.113)
- Açıl-KoA oksidaz aktivitesine cinsiyet farklılığının etkisi stres uygulamasından ve uygulanan tedavi protokolünden ve (stres uygulaması + tedavi protokolünden) bağımsızdır (sırasıyla p=0.243, p=0.791, p=0.538).
- Açıl-KoA oksidaz aktivitesine stresin etkisi cinsiyetten ve uygulanan tedavi protokolünden ve (cinsiyet + tedavi protokolünden) bağımsızdır (sırasıyla p=0.243, p=0.652, p=0.538).

Tablo 13: Post Hoc Testler:

parametre	test	1.grup	ortalama	2.grup	ortalama	Sig.
kortikosteron	LSD	D stres	592	E stres+fx	183	0.034
	LSD	D stres	592	E stres	218	0.052
katalaz	Tukey	D sf	9.03	E stres	12.98	0.043
	Tukey	D stres+fx	8.68	E stres	12.98	0.021
	Tukey	D sf	9.03	E stres+fx	13.15	0.030
	Tukey	D fx	8.24	E stres+fx	13.15	0.005
	Tukey	D stres+fx	8.68	E stres+fx	13.15	0.014
	Tukey	D fx	8.24	E stres	12.98	0.008
	Scheffe	D fx	8.24	E stres+fx	13.15	0.041
	LSD	D sf	9.03	E sf	11.5	0.046
	LSD	D fx	8.24	E sf	11.5	0.010
	LSD	D stres+fx	8.68	E sf	11.5	0.024
	LSD	D sf	9.03	E stres	12.98	0.002
	LSD	D stres	9.39	E stres	12.98	0.005
	LSD	D stres+fx	8.68	E stres	12.98	0.001
	LSD	D sf	9.03	E stres+fx	13.15	0.002
LSD	D stres	9.39	E stres	12.98	0.005	
LSD	D stres	9.39	E stres+fx	13.5	0.003	
LSD	D stres+fx	8.68	E fx	11.23	0.040	
LSD	D fx	8.24	E stres+fx	13.5	0.000	
LSD	D stres+fx	8.68	E stres+fx	13.5	0.001	
LSD	D fx	8.24	E sf	11.5	0.010	
LSD	D fx	8.24	E stres	12.98	0.000	
LSD	D fx	8.24	E fx	11.23	0.018	
Bonferroni	D fx	8.24	E stres	12.98	0.011	
Bonferroni	D stres+fx	8.68	E stres	12.98	0.030	
Bonferroni	D sf	9.03	E stres+fx	13.15	0.044	
Bonferroni	D fx	8.24	E stres+fx	13.15	0.007	
Bonferroni	D stres+fx	8.68	E stres+fx	13.15	0.020	
Açil-KoA oksidaz	LSD	E sf	0.9	E stres	0.54	0.023
		D stres	0.5	E sf	0.9	0.016
		E fx	0.96	E stres	0.54	0.010
		D sf	0.6	E fx	0.96	0.027
		D stres	0.5	E fx	0.96	0.007
		D stres+fx	0.6	E fx	0.96	0.025

SPSS'de verilen post hoc testler arasında en basiti LSD (least significance difference) 'dır. Aslında bu test ikişerli t testi yapmaya eşdeğerdir ve bu nedenle oldukça ilkelidir. Bonferroni kısmen modifiye edilmiş en önemsiz fark yöntemidir. Tukey genellikle varyans analizi ile uyumlu sonuçlar verir. Scheffe ikişerli karşılaştırmalar için tercih edilecek bir yöntem değildir. Gruplar ikişerli olarak değil de, grupların bir kısmı birleşik olarak başka grup ya da gruplarla karşılaştırılacaksa kullanılır (91). Bu yüzden daha ziyade Tukey, Bonferroni ve Scheffe testi değerlendirmeleri dikkate alınacaktır.

- Stres+fx grubunda erkek sıçanlarda katalaz düzeyi dişi sıçanlardan yüksektir (p=0.014, sırasıyla ortalamalar E stres+fx:13.15,D stres+fx: 8.68)
- Sf ve fluoksetin alan dişi gruplara göre fluoksetin+stres alan erkek sıçanlarda katalaz düzeyi daha yüksektir.(D Sf alan ortalaması:9.03, D fx ortalaması:8.24, E fx+stres ortalaması:13.15, p=0.03, p=0.005)
- Fx alan dişilere göre stres alan erkek sıçanlarda katalaz düzeyleri indüklenmiştir (D fx ortalaması:8.24, E stres ortalaması:12.98, p=0.008)
- Stres alan erkek sıçanlara göre stres+fx alan dişi sıçanlarda katalaz enzim aktivite düzeyleri daha düşüktür (E stres ortalaması:12.98, D stres+fx ortalaması:8.68, p=0.021)
- Sf alan dişi sıçanlara göre stres alan erkek sıçanlarda katalaz düzeyi artmıştır (D sf ortalaması:9.03, E stres ortalaması:12.98, p=0.043)
- Pearson ve spearman korelasyon analizlerinde kortikosteron, katalaz ve açıl-KoA oksidaz arasında istatistiksel önemi olan bağlantılar saptanmamıştır (Tablo 14)

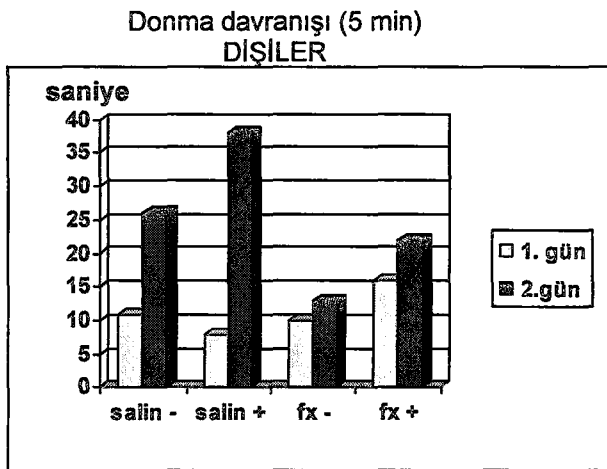
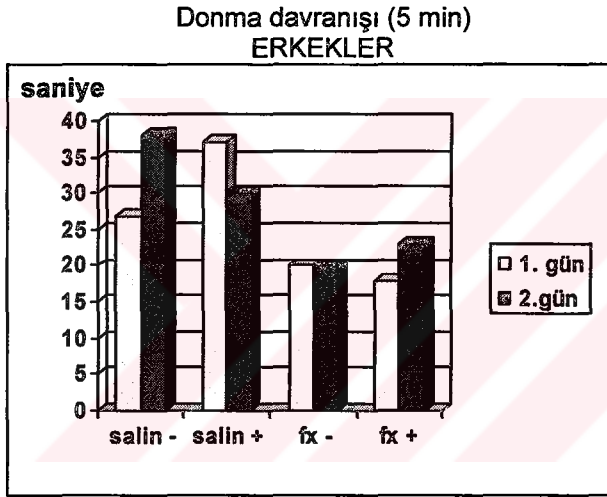
Tablo 14: Korelasyon analizi

		kortikosteron	katalaz	açıl-KoA
kortikosteron	Pearson korelasyon	1	-0.184	0.128
	Sig		0.256	0.431
katalaz	Pearson korelasyon	-0.184	1	0.06
	Sig	0.256		0.715
açıl-KoA	Pearson korelasyon	0.128	0.06	1
	Sig	0.431	0.715	

Porsoft sonuçları (92)

Klasik zorunlu yüzme testinde sıçanlar birinci testte 15dk. , 24 saat sonra yapılan ikinci testte ise 5dk. süre ile kaçamayacakları bir silindirde yüzmeye

zorlanır. Birinci yüzme testinde görülen hareketliliğin; baş sallama, dalma, yüzme gibi kaçma davranışlarının ikinci yüzme testinde anlamlı olarak azaldığı görülür. Bunun ilk test sırasındaki başarısızlığından kaynaklanan bir davranışsal umutsuzluğu yansıttığına inanılır. Bir çok antidepresan ilaç bu etkiyi tersine çevirebilir. Uygulanan bu davranışsal stres modelinde birinci gün ile ikinci gün kıyaslandığında ikinci gün donma davranışı birinci güne oranla daha fazla bulunmuştur. $F(1,70)=4.324$, $p<0.05$ Seks covariate olarak alındığında anti-depresan fluoksetin ile donma davranışı süresi azalmıştır. $F(1,73)=4.168$, $p<0.05$ Buradan oluşturulan stres modelinde stresin sıçanların davranışına yansıdığını ve fluoksetin kullanımının bu olumsuz durumu düzeltmede etkili olduğu sonucunu çıkarabiliriz.

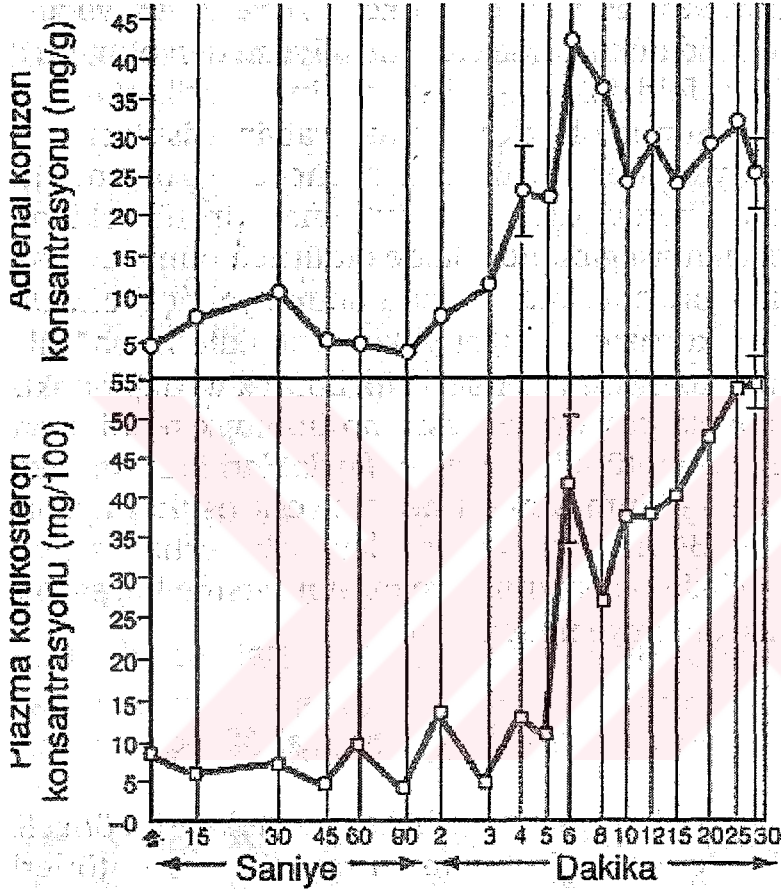


Şekil 16: Donma davranışı porsolt sonuçları

5. TARTIŞMA

5.1. Stres ve kortikosteron ilişkisi

Çok iyi bilinir ki hipotalamo-pitüiter-adrenal aksis (HPA) internal veya eksternal streslerle aktive olduğunda adrenal glikokortikoidlerin hipersekresyonu gerçekleşmektedir (96). Şekil 17'da bir deneyde, sıçanın iki bacak kemiğinin kırılmasını takiben 4-20 dk içinde kortikosteroid oluşumu ve sekresyonunun altı kat arttığı gösterilmiştir.



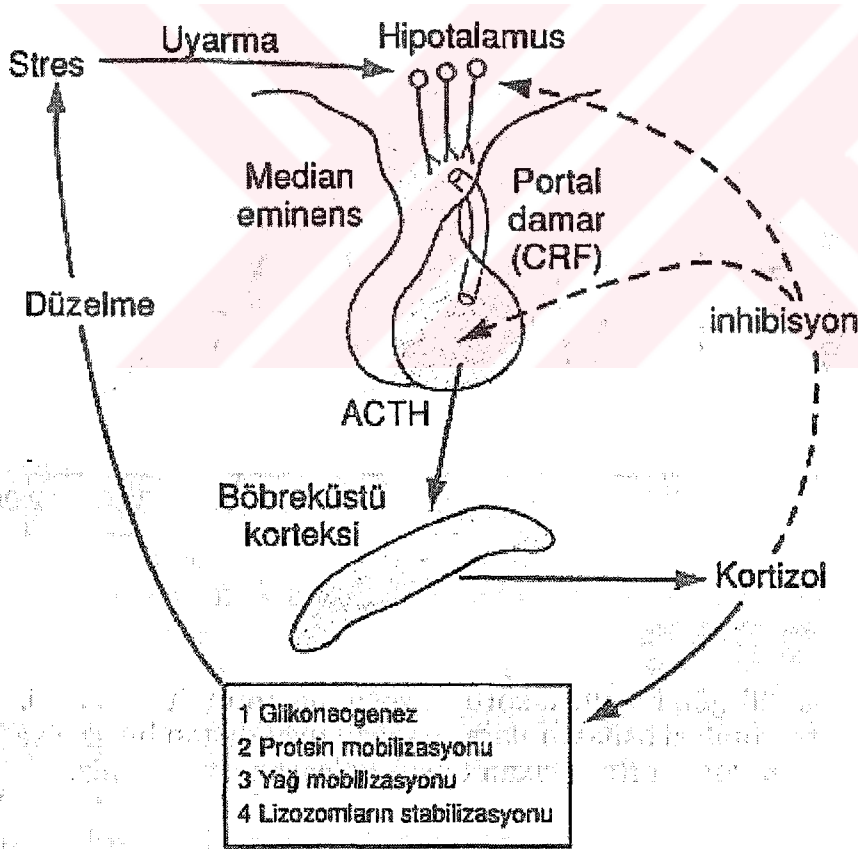
Şekil 17: Tibia ve fibulası kırılan sıçanın adrenal bezinin strese yanıtı

Kortizol salgısını artıran farklı stres tiplerinin bir kısmı şunlardır:

- Hemen her tip travma
- Enfeksiyon
- Aşırı sıcak ve soğuk
- Sempatomimetik ilaçlar
- Cerrahi
- Immobilizasyon
- Dejeneratif hastalıklar

Stres uyarısı ilk olarak yukarı beyin sapına doğru taşınır ve sonunda median eminensiya ulaşır. Buradan hipofizer portal sisteme CRH salgılanır. Dakikalar içinde tüm kontrol ile ilgili olaylar dizisi bol miktarda kortizolün kana verilmesine yol açar. Mental stres aynı zamanda ACTH salgısında da hızlı bir artışa neden olur. Bunun limbik sistemde özellikle amigdala ve hipokampus bölgesindeki aktivite artışından kaynaklandığına inanılmaktadır. Bu bölgeler daha sonra sinyallerini posterior medial hipotalamusa gönderirler.

Kortizol CRF salgısını azaltmak için hipotalamusta ve ACTH oluşumunu azaltmak için ön hipofiz bezinde direk (-) feed back etkiye sahiptir. Her iki feed back sistemi kortizol konsantrasyonunu düzenlemeye yardım eder. Konsantrasyon çok arttığında feed back otomatik olarak ACTH'ı normal düzeyine indirir (Şekil 18) (96).



Şekil 18: Glikokortikoid sentezinin düzenlenme mekanizması

Depresyonda glikokortikoid feed back mekanizma etkilenmektedir. Major depresyonda glikokortikoid düzeylerinin uzun süreli yüksek kalması merkezi glikokortikoid reseptörlerinde desensitizasyona neden olmaktadır ve muhtemelen bu reseptörler makrofajlarda da lokalize olmuştur. Depresyonda hücrel immünite bir çok açıdan aktive olurken (periferde ve beyinde pro-inflamatuvar sitokinler aktive makrofajlardan salınırken, akut faz proteinlerinin de karaciğerde artışı gerçekleşmektedir) bazı açılardan (mesela NK (natural killer) ve T-hücre üretimi) inhibe olmaktadır. Bazı pro-inflamatuvar sitokinlerin HPA-aksisinin güçlü aktivatörleri olduğu bilinmektedir.

Kronik stres hipokampusta geri dönüşümlü hasardan kalıcı nöron kaybına yol açan aralıkta zaman bağımlı nöronal hasarı indüklemektedir. Bu hasar hipokampus bağımlı öğrenme işlevlerini ve bilişsel yetileri bozmaktadır (97).

Bulgular öyle göstermiştir ki glikokortikoidlerin hipersekresyonu ve pro-inflamatuvar sitokinlerin artışı beyinde serotonerjik ve noradrenerjik fonksiyon bozukluğuna neden olarak depresyonun major semptomlarını oluşturmaktadır. Anti-depresanlar glikokortikoidlerin etkisini tersine çevirirken sitokinlerin beyindeki olumsuz etkilerini de azaltmaktadır. Ek olarak bir çok anti-depresan ilaç endojen sitokin antagonisti olan IL-1 ve IL-10 düzeylerini artırmaktadır. Anti-depresanların farklı bir sınıfı siklooksijenaz inhibitörü gibi davranarak beyinde inflamatuvar prostoglandinlerin düzeyini azaltmaktadır. Böylece inflamasyonun nörotransmitter fonksiyonundaki olumsuz etkileri azalmaktadır (98).

5.2. İmmobilizasyon stres modeli ve kortikosteron ilişkisi

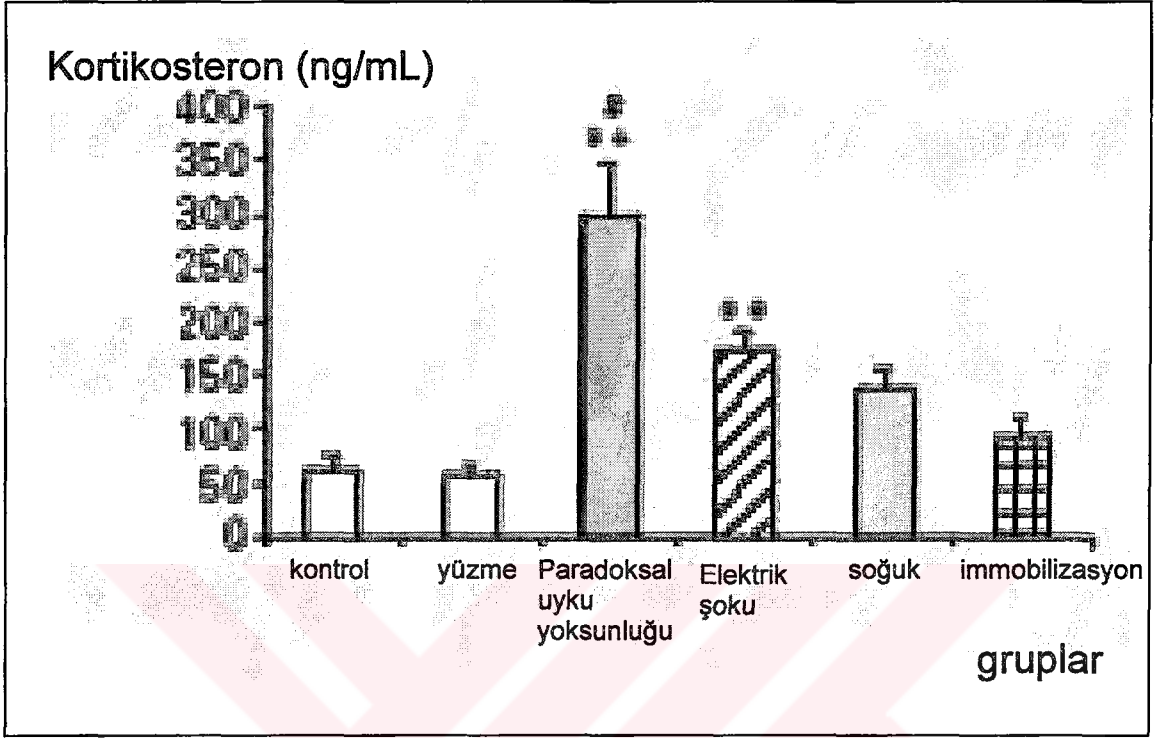
Üresin ve arkadaşlarının çalışmasında; kronik stresin immobilizasyon stresi şeklinde uygulandığı ratlarda kortikosteron düzeyleri kontrol gruplarına göre istatistiksel anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur (99). Ruth ve arkadaşları da kronik immobilizasyon stresin adrenal cevabı artırarak glikokortikoid salınımına neden olduğunu bildirmektedirler (103). Abidin ve arkadaşları aynı şekilde kronik stresle kortikosteron düzeylerinde kontrol gruplarına göre artış saptamışlardır (100). Dabelic ve arkadaşları akut immobilizasyon stresle kortikosteron düzeylerinde artış, kronik stresle ise azalma gözlemlendiğini

kaydetmişlerdir (101). Wood ve arkadaşları ise tekrarlayan immobilizasyon strese maruz bırakılan ratlarla kontrol grubu arasında fark bulamamışlar (104).

Mizoguchi çalışmasında; kronik olarak strese maruz kalan ratlarda hipotalamo-pituiter aksis işleyişinde bozulma olduğunu ve bunun prefrontal kortekste azalmış glikokortikoid cevabından kaynaklandığını bildirmektedir (102). Benzer şekilde Mizoguchi ve arkadaşları depresif insanların yaklaşık yarısında glikokortikoid negatif feed-back sisteminin hasar gördüğünü benzer bir durumun kronik stresle sıçanlarda da indüklenebildiğini bildirmişlerdir. Bu beyinin geri beslenme bölgelerinde glikokortikoid reseptörlerinin (GR) sayısının azalması şeklindedir. Beyindeki bu işlevlerden sorumlu bölge tam olarak belirlenememiştir. Onlar immobilizasyon strese oluşturdukları stres modelinde Western-immunoblot tekniğiyle ratların prefrontal korteks, hipokampus ve hipotalamuslarını incelemişlerdir. Prefrontal kortekste sitozolik GR sayısı azalırken, nükleer GR sayısı değişmemiştir. Hipokampusta sitozolik ve nükleer reseptör sayıları artmıştır. Öyle ki hipotalamusta GR düzeylerinde anlamlı bir değişim izlenmemiştir (105). Jafari ve arkadaşları aynı stresöre tekrar tekrar maruz kalındığında HPA aktivitesinde azalma görüldüğünü kaydederken bunu kortikosteron aracılı HPA aktivitesinin inhibisyonuna bağlamışlardır (106) Gerçi onların çalışmasında stres oluşturmak için dışarıdan subkutan deksametazon kullanılmıştır (107). Aynı sonuca varan Mizoguchi ve arkadaşları glikokortikoidin kronik stresde negatif feed-back düzenlemesinin tamamen anlaşılmadığından bahsetmektedirler. Akut strese maruz bırakılan sıçanlarda stres sonrası 5h yüksek kalan kortikosteron düzeyleri kronik stresde ancak 2h yüksek kaldıktan sonra düşmektedir (108). Bowman ve arkadaşlarının bulgularına göre ise kronik strese maruz bırakılan ratlarda kortikosteron düzeyleri stres sonrası 15. günde bazal düzeylere gerilemiştir (109).

Anderson ve arkadaşlarının çalışmasında; sıçanlara farklı stresörler kronik şekilde uygulayarak kortikosteron ve diğer steroidal hormon düzeylerine (progesteron, testosteron, v.b.) bakılınca, farklı stres modellerinin steroid hormon düzeylerine etkisinin farklı düzeylerde olduğu saptanmıştır (Şekil 19). Bu çalışmada stresörler olarak paradoksal uyku yoksunluğu, immobilizasyon stresi, elektrik şoku, soğuk ve zorlu yüzme testi uygulanmış ve görülmüş ki

kortikosteron sadece paradoksal uyku yoksunluğunda ve daha az olmak üzere elektrik şoku uygulanan ratlarda artmış, diğer stresörlerle artış kaydedilmemiştir (110).



Şekil 19: Kronik strese maruz bırakılan ratlarda kortikosteron düzeyleri (sırasıyla kontrol, yüzme, paradoksal uyku yoksunluğu, elektrik şoku, soğuk ve immobilizasyon stres) (110)

* $p < 0.0001$

Uygulanan stres modelinin tipine, stresin akut veya kronik olarak uygulanmasına bağlı olarak reseptör düzeyinde beyinin farklı bölgelerinde farklı sonuçlar elde edilmektedir.

Stresin dişi ve erkek sıçanlarda farklı etki gösterdiği bu çalışmamız ile bir kez daha kanıtlanmıştır. Bu nedenle stresin etkilerinin ölçüldüğü tüm deney düzenlerinde bu bulguların dikkate alınması gerekmektedir. Tablo 8' den de gözlenebileceği gibi stres ile dişilerde kan kortikosteron düzeyi ortalaması 592.0 ng/mL iken erkeklerde 218.0 ng/mL' dir.

Erkek sıçan grubunda, bir anti-depresan olarak kullanılan fluoksetin stresin oluşturduğu kan kortikosteron düzeylerinin dağılım sınırlarını, ortalama

düzeylelerini daha azaltmakta (ortalama E stres:218 ng/mL, ortalama E stres+fluoksetin:183 ng/mL) ancak nonparametrik değerlendirmede istatistiksel fark bulunmamaktadır. Ortanca değerleri de bu bulguyu desteklemektedir (ortanca E stres:178 ng/mL, ortanca E stres+fluoksetin:218 ng/mL).

Dişi sıçan grubunda da ortalama değerlerine bakıldığında, stres grubunda 592 ng/mL olan kortikosteron düzeyleleri, stres+fluoksetin grubunda 480 ng/mL' ye düşmüştür. Ortanca değerleri de aynı yönde olup 689 ng/mL' den 361 ng/mL' ye azalma göstermektedir ve değer aralığı da aynı yöndedir. Ancak varyans analizi bu değişimlerin istatistiksel önemi olmadığını göstermektedir. Yine de dişi sıçanlarda fluoksetinin stres göstergesi olan kortikosteronu azalttığı yönünde bir yaklaşım yapılabilir.

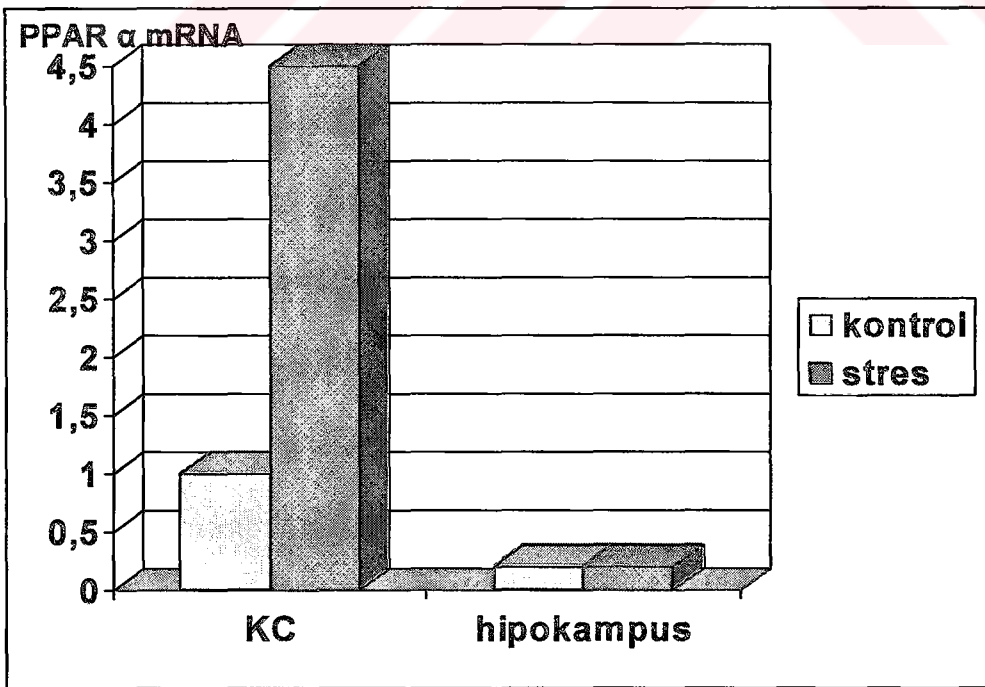
Sadece fluoksetin alan gruplar karşılaştırıldığında erkek sıçanların kortikosteron düzeylelerinin ortalaması:332 ng/mL iken, dişi sıçanların ise 527 ng/mL' dir. Ortanca değerleri de paralel olarak değişmektedir. Ancak değer aralıklarından da görülebileceği gibi (E fluoksetin:600 ng/mL, D fluoksetin 1265 ng/mL) grupların varyansları çok farklıdır. O nedenle de doğal olarak istatistiksel bir önem saptanmamıştır. Bu sonuç; fluoksetinin anti-depresan etkisinin erkek anksiyetesinde daha çok etkin olduğunu düşündürülebilir.

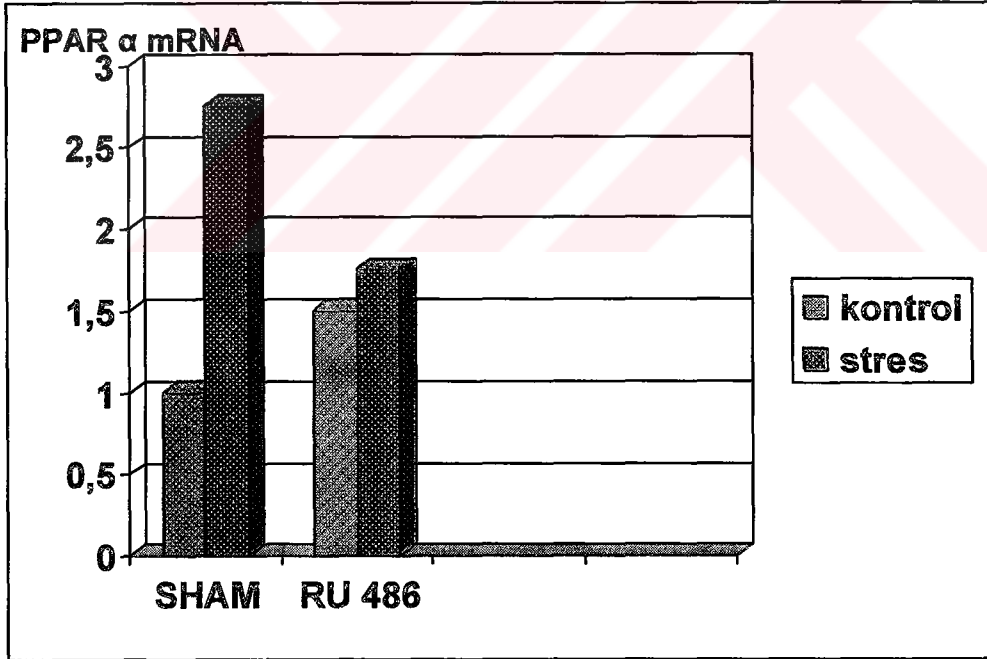
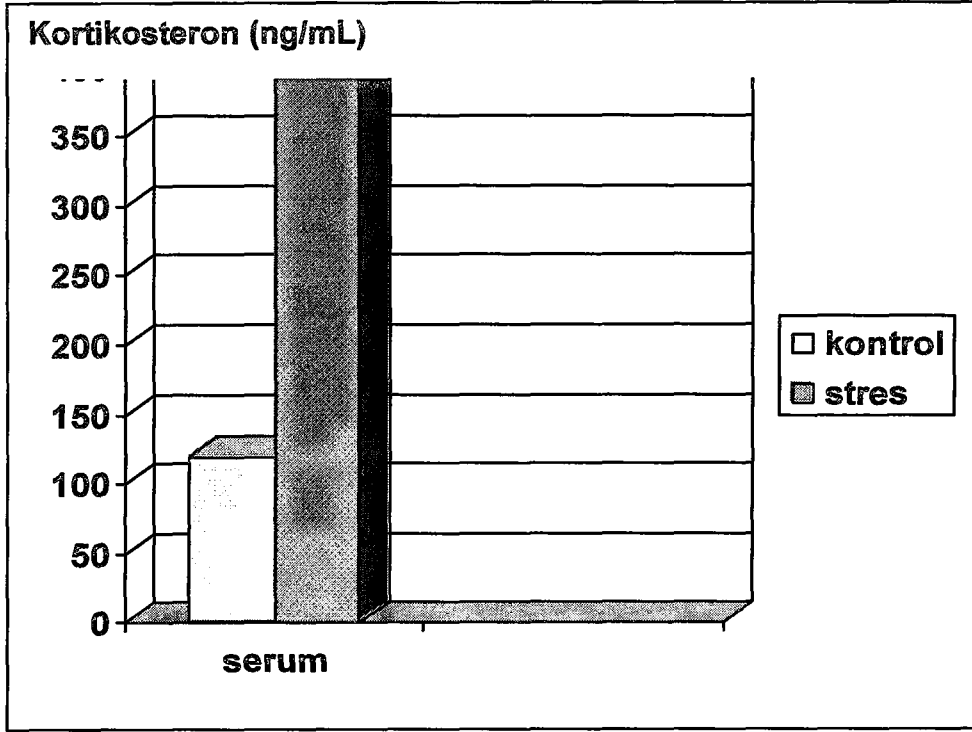
Her ne kadar bu çalışmada stres göstergesi olarak kan kortikosteron düzeyleleri ölçüldüyse de, Ege Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı' nda aynı deney hayvanlarının Porsolt zorunlu yüzme testi de ayrıca stresin göstergesi olarak çalışılmış ve bu grupların immobilizasyon stres ile gerçekten davranışlarının istatistiksel olarak değiştiği kanıtlanmıştır (92).

Biz uyguladığımız kronik stres modelinde kortikosteronu artmış bulmadık. Farklı stres modellerine farklı steroid hormon cevabı olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (118). Dabelic ve Flogel çalışmalarında akut stresin kortikosteron düzeylelerini artırdığını, kronik stresin ise azalttığını bildirmektedirler (98). Kronik stresin akut stresden farklı olarak kortikosteronu artırmamış olması, stresin diğer mekanizmalar üzerinden etkili olabileceği olasılığını düşündürmektedir.

5.3. Stres ve peroksizom proliferasyonu

Son yıllarda, çeşitli çalışmalarda Peroksizom Proliferatörü Aktive edici Reseptör α (PPAR- α) geninin transkripsiyonel düzeyde glikokortikoidler tarafından regüle edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, stresin peroksizom indüksiyonuna neden olduğunu bildiren az sayıda çalışma da mevcuttur. Lemberger ve arkadaşları PPAR α alt grubunun yağ asidi metabolizmasıyla ilgili birçok hedef geni düzenlediğini kaydetmişlerdir. In vitro olarak primer hepatosit kültürlerinde PPAR α gen düzeylerinin glikokortikoidler tarafından düzenlendiğini bildirmişlerdir. Bu hormonal düzenleme sıçanlarda fizyolojik koşullarda oluyor mu sorusuna yanıt aramışlardır. Bu amaçla oluşturdukları immobilizasyon stres ile PPAR α geninin ifade edilmesinin karaciğerde indüklenmesi gerçekleşirken hipokampusta böyle bir değişim izlenmemiştir. Sentetik glikokortikoid deksametazonun erişkin sıçanlara injeksiyonuyla karaciğerde PPAR α geni benzer şekilde indüklenmiştir. Anti-glikokortikoid olan RU 486 kullanımıyla stres bağımlı indüksiyon inhibe olmuştur. Özetle glikokortikoidleri stres yanıtında temel etkenler olarak belirlemişlerdir. Buna ek olarak bulgularına göre; karaciğer PPAR α mRNA ve protein düzeyleri dolaşan kortikosteroid düzeylerine paralel olarak diüurnal bir ritmi takip etmektedir. (Şekil 20)(111)





Şekil 20:a) KC ve hipokampusta PPAR α mRNA düzeylerine stresin etkisi
b) RU 486 kullanımının PPAR α mRNA düzeylerine etkisi

Bu çalışmadan yola çıkarak sıçanlarda oluşturulan stres modelinde karaciğer peroksizomlarında proliferasyon olup olmadığı inceledik. Bu konuda literatur taraması yapıldığında çok az veri ve araştırma olduğu görülecektir.

Strese hormonal yanıt sempatik sinir sistemi tarafından katekolaminlerin, hipotalamo-pituiter-adrenal aksis aktivasyonu üzerinden adrenal medulladan glikokortikoidlerin salınımıdır. Stres sonrası katekolamin piki daha erken oluşurken steroid yanıtı daha gecikmeli olarak oluşmaktadır. Stres durumlarında PPAR- α gen ekspresyonunun sağlanmasında glikokortikoidlerin rolünü gösteren az sayıda çalışma(111, 112) vardır.

Bu çalışmada in vitro primer hepatosit kültürlerinde PPAR- α geninin transkripsiyonal düzeyde glikokortikoidlerle düzenlendiği (112), immobilizasyon stresin sıçan karaciğerlerinde PPAR- α gen ekspresyonuna neden olurken hipokampüste olmadığı belirtilmiştir.

Çalışmamızın temel amacı olan; stres ve peroksizom proliferasyonu ilişkisi, yöntemlerde de ayrıntılı olarak verildiği gibi peroksizomal enzim aktiviteleri KC homojenatlarında ölçülerek araştırılmıştır.

Bu konuda yapılan bazı çalışmalar peroksizom proliferasyon göstergesi olarak katalaz aktivite artışını ileri sürerken, bazı çalışmalar açil-KoA oksidaz aktivitesinin önemli bir gösterge olduğunu ileri sürmüştür. Bu nedenle sunduğumuz çalışmada proliferasyon göstergesi olarak iki enzim aktivitesi de çalışılmıştır. Diğer bir amacımız; açil-KoA oksidaz aktivitesini doğru ölçen bir yöntemi kurmak olmuştur.

Karaciğerde katalazın spesifik aktivitesi açısından grupları karşılaştırdığımızda varyans analizi ile yine cinsiyetin önemli bir faktör olduğu ortaya çıkmaktadır (F:32.089, p=0.000). Buna karşılık stres veya fluoksetin uygulaması katalaz aktivitesi açısından signifikant bir anlamlılık oluşturmamaktadır (Tablo 11).

Box-plot grafiği incelenecek olursa, erkek sıçan grubunda katalaz aktivitesinin stres etkisi ile üst sınırdan yoğunlaştığı (değer aralığı:5.98 U/mg protein' den

1.74 U/mg proteine azalmıştır.), sadece fluoksetin alanlarda, ortanca değerin belirgin azaldığı (12.63 U/mg protein' den 10.89 U/mg proteine) ancak stres+fluoksetin grubunda değişiklik olmadığı ancak, bu eğilimler olsa da farkın istatistiksel bir önem taşımadığı gözlemlenmektedir.

Dişi sıçanlarda stres katalaz aktivitesi dağılımını genişletmektedir (sırasıyla 4.01 U/mg' dan 7.61 U/mg' a). Stres grubuna fluoksetin verilmesiyle bu dağılımın sınırlarının azaldığı (7.61 U/mg' dan 2.95 U/mg' a) gözlenmektedir ancak bu sonuç istatistiksel bir önem taşımamaktadır.

Post-hoc testler incelendiğinde istatistiksel açıdan dikkati çekenler stres+fluoksetin gruplarında dişi sıçan grubunun ortalama katalaz aktivitesi (8.68 U/mg protein), erkek sıçan grubunun ortalama katalaz aktivitesinden (13.15 U/mg protein) istatistiksel önemde ($p=0.014$, Tukey; $p=0.020$ Bonferroni) düşük olmasıdır.

Stres gruplarında erkek sıçanlarda dişi sıçanlara oranla KC katalaz aktivitesinin daha yüksek olması (sırasıyla E ortalama:12.98 U/mg protein, ortanca:13.07 U/mg protein, D ortalama:9.39 U/mg protein, ortanca:7.94 U/mg protein) ve fluoksetin ile de bu farkın korunuyor olması, erkek cinsiyetin stres etkisiyle peroksizom proliferasyonuna daha yatkın olduğunu düşündürülebilir.

Diğer proliferasyon göstergesi olan açıl-KoA oksidaz aktivitesi değerlendirilecek olursa, gruplar arasında katalazdan farklı olarak hem cinsiyet ($F=5.57$, $p=0.025$), hem de stres etkisi ($F=6.326$, $p=0.017$) açısından fark vardır (Tablo 12). Buna karşılık fluoksetin uygulaması açısından fark yoktur.

Post-hoc analizler yapıldığında ise sadece LSD' de önemli bazı istatistiksel veriler saptanmıştır. Bu test ayrıcalığı çok düşük bir test olduğu için dikkate alınmayacaktır.

Kortikosteronun daha ziyade PPAR α reseptörü üzerinden etkili olduğu belirtilmektedir. PP indüklü-DNA sentezi için glikokortikoidlerin olması gerekmektedir. Glikokortikoidlerin varlığı peroksizom proliferatörleri için seçicilik

göstermektedir. Hidrokortizon PPAR α 'yı indüklemektedir. Klasik farmakoloji bilginiz reseptörlerin ligandın biyolojik aktivitesini düzenleyebileceğidir. Benzer durum PPAR α fenomeni için de geçerli olup reseptörlerin düşük düzeyleri peroksizom-proliferasyon-cevabı için yetersiz olabilmektedir (112). Cinsiyet farkı dikkate alınmadığında artan katalaz düzeyleriyle değişmeyen açil-KoA aktivitesinin nedeninin reseptör düzeyinin düşüklüğü olabileceği düşünülebilir. Bir yayında da PP olarak bilinen perfloroktanoik asitin peroksizomal β oksidasyonu indükleyici etkisinin adrenal hormonlardan bağımsız, katalazı indükleyici etkisinin bu hormonların varlığına bağımlı olduğu belirtilmektedir (120).

Acaba benzer yapıdaki diğer steroid ailesi üyeleri için böyle bir etki söz konusu mu? Mastrocola ve arkadaşları; kanda düzeyi yüksek olarak bulunan bir steroid olan DHEA'un tedavisinin farmakolojik dozlarda H_2O_2 'yi artırarak katalazda %30 oranında artışa neden olduğu bildirilirken, yüksek dozlarda da β oksidasyonu artırarak açil -Koa oksidaz enzim düzeylerinde artışa neden olduğu saptanmıştır (113). Khan ve Nyce DHEA kullanımının sıçanlarda katalaz düzeyini 1.8 kat artırdığı bulunmuştur (114). Rao ve Musunuri; sıçanlarda DHEA'un oral kullanımının peroksizom volümünü 5 kat, katalaz düzeyini ise 2 kat artırdığını saptamışlardır. (115). Kemiricilerde DHEA kullanımının peroksizomal enzimleri indüklediği ve hepatosellüler karsinogeneze neden olduğu bildirilmektedir (116). DHEA'un peroksizomları indüksiyonu ile ilgili başka yayınlar da mevcuttur (117).

Sonuç olarak; uyguladığımız immobilizasyon stres modelinde peroksizomal enzimler olan karaciğer katalaz ve açilKoA oksidaz düzeyleri ile serum kortikosteron düzeyleri arasında bir korelasyon saptanmadı. "Stres kortikosteron düzeylerinden bağımsız olarak peroksizom proliferasyonu yapıyor olabilir mi?" sorusuna yanıt ararken stres alan, stres almayan ve (fluoksetin+stres) alan gruplardaki peroksizomal enzim düzeyleri incelendi. Elde ettiğimiz verilere göre cinsiyet farkı dikkate alınmazsa sf ve fx gruplarına göre stres uygulanan gruplarda katalaz düzeylerinde artış izlendi (sırasıyla $p=0.043$, $p=0.008$). Yine cinsiyet farkı dikkate alınmazsa, fx kullanımıyla stres uygulanan

gruba göre katalaz düzeyleri düşüyordu ($p=0.021$). Fakat aynı veriler cinsiyet farkı dikkate alındığında elde edilemedi. Katalaz düzeyleri (stres+ fx) alan grupta erkek sıçanlarda daha yüksekti (sırasıyla ortalamalar:8.68, 13.15, $p=0.014$). Açıl KoA düzeylerinde stres uygulanmasıyla artış saptanmadı.

Farklı stres deney modellerinde, daha farklı sonuçlara varılabileceği dikkate alınarak, bu sıçan immobilizasyon stres modelinde KC' de istatistiksel önemde bir peroksizom proliferasyonu gözlemlenmediği sonucuna varılmıştır.



6. ÖZET

STRESİN PEROKSİZOM PROLİFERASYONUNA ETKİSİ

Peroksizom Proliferasyonunu Aktive edici Reseptörler (PPAR) yağ asitleri ve anti-diyabetik tiazolidinoidler ile aktive olabilen nükleer hormon reseptörleridir. In vitro yapılan hepatosit kültürlerinde, PPAR α geni ifade edilmesi düzeyinde glikokortikoidler tarafından düzenlenmektedir.

Stresin bir peroksizom proliferatörü olup olmadığını ve stres cevabının glikokortikoidler ile düzenlenip düzenlenmediğini araştırdık. 40 Sprague Dawley sıçandan 4 grup oluşturuldu. Kontrol (n=10), fluoksetin (n=10), stres uygulanmış (n=10), fluoksetin+ stres uygulanmış (n=10). Cinsiyet farkı bilindiğinden her grubun yarısı erkek yarısı dişi olarak seçildi. Immobilizasyon stres kullanıldı. Stres göstergesi olarak plazma kortikosteron düzeyi Mattingly fluometrik yöntemiyle kantite edildi ve peroksizom proliferasyonu peroksizomal enzim aktiviteleri (katalaz ve açil-KoA oksidaz) Aebi ile ve fluometrik olarak ölçülerek saptandı.

Kortikosteron ve peroksizomal enzim aktiviteleri arasında bir korelasyon saptanmadı (kortikosteron-katalaz: $p=0.256$, kortikosteron-açil-KoA: $p=0.431$, açil-KoA-katalaz: $p=0.715$). (Stres+fx) grubunda erkek sıçanlarda katalaz düzeyi dişi sıçanlardan yüksekti ($p=0.014$, ortalamalar:13.15, 8.68). Sf ve Fluoksetin alan dişi gruplara göre (fluoksetin+stres) alan erkek sıçanlarda katalaz düzeyi daha yüksekti.(D Sf alan ortalaması:9.03, D fx ortalaması:8.24, E fx+stres ortalaması:13.15, $p=0.03$, $p=0.005$). Fx alan dişi gruba göre stres alan erkek grupta katalaz düzeyleri yüksekti (ortalamaları:8.24, 12.98, $p=0.008$). (Stres+fx) alan dişi sıçanlarda stres alan erkek sıçanlara göre katalaz aktivitesi daha düşüktü (ortalamalar:8.68, 12.98, $p=0.021$). Sf alan dişi sıçanlara göre stres alan erkek sıçanlarda katalaz aktivitesi indüklenmişti (ortalamalar: 9.03, 12.98, $p=0.043$).

Özetlersek sıçanlarda peroksizomal enzim düzeyinde immobilizasyon stres modeliyle peroksizom proliferasyonu oluşmamıştır.

7. SUMMARY

THE EFFECTS OF STRESS ON PEROXISOME PROLIFERATION

Peroxisome-proliferator-activated-receptors (PPARs) are nuclear hormone receptors that can be activated by fatty acids and antidiabetic thiazolidinediones. In hepatocytes cultured in vitro, the PPAR α gene is regulated at the transcriptional level by glucocorticoids.

We investigated if stress is a peroxisome proliferator and stress response is mediated by glucocorticoids or not. Four groups were composed from 40 Sprague Dawley rats control(n=10), fluoxetine (fx)(n=10), stressed(n=10), fluoxetine+stressed(n=10). Because of the sexuality difference is known one half of the each group is selected as male (M) and the other as female (F). Immobilization stress is used. Plasma corticosterone levels were quantified by Mattingly fluorometric method as stress marker and peroxisome proliferation is determined by measuring peroxisomal enzyme activities (catalase and Acyl CoA oxidase) with Aebi and fluorometrically.

A correlation between corticosterone and peroxisomal enzyme activities isn't found (corticosterone-catalase $p=0.256$, corticosterone-acyl-CoA $p=0.431$, acyl-CoA-corticosterone $p=0.715$). In (stres+fx) group male catalase activities were higher than females ($p=0.014$, means 13.5 and 8.68). According to the sf or fx female group catalase activities were higher in male (fx+stress) group (F sf group mean:9.03, F fx group mean:8.24, M fx+stress group mean 13.15, $p=0.03$, $p=0.005$). According to the fx F group catalase activities were higher in M stress group (means 8.24 and 12.98, $p=0.008$). In (stres+fx) F group catalase activities were less than stress M group (means:8.68 and 12.98, $p=0.021$). According to the sf F group catalase activities were induced in stress M group (means : 9.03 and 12.98, $p=0.043$).

We conclude that peroxisome proliferation isn't occurred with immobilition stress model in rats on peroxisomal enzyme levels.

8. KAYNAKLAR

1. Tanyalçın T, Kutay Z.F. Peroksizomların Biyogenezi ve biyokimyası, *Biyokimya Dergisi Cilt XIX*, 2(1994):45-62
2. Houseknecht KL, Cole BM, Steele PJ; PPAR γ and its ligands: A review; *Domestic Animal Endocrinology* 22(2002):1-23
3. Stojkova SD, Bogdanska J, Stojkova Z; Peroxisome Proliferators: Their Biological and Toxicological Effects, *Clin Chemist Lab Med* 2001;39(6):468-474
4. Corton JC, Lapkinskas PJ, Gonzalez FJ; Central role of PPAR α in the mechanism of action of hepatocarcinogenic peroxisome proliferators; *Mutation Research* 448(2000)139-151
5. N. Latruffe, J Vamecq; peroxisome proliferators and PPARs as regulators of lipid metabolism, *Biochimie* 79(1997):81-94
6. A. Benani, P. Kremarik-Bouillaud, A. Bianchi, P. Netter, A. Minn., M. Dauça; Evidence for the presence of both PPAR α and β in the rat spinal cord; *Journal of Chemical Neuroanatomy* 00 (2003) 1-10
7. Grimaldi PA; the roles of PPARs in adipocyte differentiation, *Progress in lipid research* 40(2001):269-281
8. Parker JC; Troglitazone: the discovery and development of a novel therapy for the treatment of Type 2 Diabetes mellitus, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54(2002)1173-97
9. Takano H, Komura I; roles of PPAR γ in cardiovascular disease; *Journal of Diabetes and its Complications* 16(2002):108-114
10. Jihan A. Youssef and Mostafa Z. Badr Aging and enhanced hepatocarcinogenicity by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists *Ageing Research Reviews*, Volume 4(1) 2005:103-118
11. Tanyalçın T, Deveci R, Ak Başıoğlu G, Taşkıran D, Karaçalı S, Kutay FZ The Isolation Of Rat Liver Peroxisomes By Density Gradient Centrifugation Technique And Proofing The Purity By Electron Microscopy And Marker Enzyme Analysis 13th Balkan Biochemical Biophysical Days and Meeting Disorders 12-15 Ekim 2003 Kuşadası Poster

12. Youssef JA, Badr MZ. Aging and enhanced hepatocarcinogenicity by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists. *Ageing Research Reviews*, 4(1):2005:103-118
13. Meirhaeghe A, Amouyel P. Impact of genetic variation of PPAR γ in humans, *REVIEW Molecular Genetics and Metabolism*, 83(1-2), 2004:93-102
14. Theocharis S, Margeli A, Vielh P, Kouraklis G. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands as cell-cycle modulators. *Cancer Treatment Reviews*, 30(6), 2004:545-554
15. Fasshauer M, Paschke R, Stumvoll M. Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease. *Biochimie*. 86(11), 2004:779-84
16. Meirhaeghe A, Amouyel P. Impact of genetic variation of PPAR γ in humans. *REVIEW, Molecular Genetics and Metabolism*, Volume 83(1-2), 2004:93-102
17. Grommes C, Landreth GE, Heneka MT Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *REVIEW The Lancet Oncology*, 5(7); 2004:419-29
18. Toyoda M, Takagi H, Horiguchi N, A ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human liver cancer cells. *Gut* 5(2002):563–67.
19. Mueller E, Smith M, Sarraf P, Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(2000):10990–95.
20. Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 58(1998):3344–52.
21. Hisatake JI, Ikezoe T, Carey M, Downregulation of prostate specific antigen expression by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Cancer Res*, 60(2000):5494–98.
22. Segawa Y, Yoshimura R, Hase T, Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human prostate cancer. *Prostate*, 51(2002):108–16.

23. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science*, 289(2000):1357–60.
24. Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(1997):237–41.
25. Takahashi N, Okumura T, Motomura W, et al. Activation of PPARgamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Lett*, 455(1999):135–39.
26. Sato H, Ishihara S, Kawashina K, Proliferator-activated receptor (PPAR)gamma in gastric cancer and inhibitory effects of PPARgamma agonists. *Br J Cancer*, 83(2000):1394–400.
27. Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, et al. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med*, 4(1998):1053–57.
28. Kulke MH, Demetri GD, Sharpless NE, A phase II study of troglitazone, an activator of the PPARgamma receptor, in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer. *Cancer J*, 8(2002):395–99.
29. Tanaka T, Kohno H, Yoshitani S, Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res*, 61(2001): 2424–28.
30. Sarraf P, Mueller E, Smith WM, Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell*, 3(1999):799–804.
31. Toyota M, Miyazaki Y, Kitamura S, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma reduces the growth rate of pancreatic cancer cells through the reduction of cyclin D1. *Life Sci*, 70(2002):1565–75.
32. Elnemr A, Ohta T, Iwata K, PPAR gamma ligand (thiazolidinedione) induces growth arrest and differentiation markers of human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol*, 17(2000):1157–64.
33. Rumi MA, Sato H, Ishihara S, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 84(2001):1640–47.

34. Toyoda M, Takagi H, Horiguchi N, A ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human liver cancer cells. *Gut*, 50(2002):563–67.
35. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*, 1(1998):465–70.
36. Yin F, Wakino S, Liu Z, Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell-cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun*, 286(2001):916–22.
37. Clay CE, Namen AM, Atsumi G, Influence of J-series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast-cancer cells. *Carcinogenesis*, 20(1999):1905–11.
38. Elstner E, Muller C, Koshizuka K, Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic-acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast-cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(1998):8806–11.
39. Clay CE, Atsumi GI, High KP, Chilton FH. Early de novo gene expression is required for 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2-induced apoptosis in breast-cancer cells. *J Biol Chem*, 276(2001):47131–35.
40. Samid D, Wells M, Greene ME, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a novel target in cancer therapy: binding and activation by an aromatic fatty acid with clinical antitumor activity. *Clin Cancer Res*, 6(2000):933–41.
41. Leonard BE. The immun system, depression and the action of antidepressants. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. and Biol. Psychiat.*, 25(2001):767-80.
42. M.L. Andersen, M. Bignotto, R.B. Machado and S. Tufik Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(2004): 791-797
43. Uresin Y, Erbas B, Ozek M, Ozkok E, Gurol AO. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004, 5(2):93-6.

44. Dabelic S, Flogel M, Maravic G, Lauc G Stress causes tissue-specific changes in the sialyltransferase activity. *Z Naturforsch [C]*. 2004;59(3-4):276-80.
45. Abidin I, Yargicoglu P, Agar A, Gumuslu S, Aydin S, Ozturk O, Sahin E. The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. *Int J Neurosci*. 2004;114(5):683-99.
46. Ruth B. S. Harris, Haiyan Gu, Tiffany D. Mitchell, Endale L, Russo M, Ryan DH. Increased glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained *Physiology & Behavior*, 81(4)2004:557-568
47. Mizoguchi K, Ishige A, Takeda S, Aburada M, Tabira T Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function *J Neurosci*; 24(24)2004:5492-9.
48. K. Mizoguchi, A. Ishige, M. Aburada and T. Tabira. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus *Neuroscience*, 119(3)2003:887-897
49. Jaferi A, Nowak N, Bhatnagar S. Negative feedback functions in chronically stressed rats: role of the posterior paraventricular thalamus *Physiology & Behavior*, 78(3)2003:365-373
50. Wood GE, Young LT, Reagan LP, McEwen BS. Acute and chronic restraint stress alter the incidence of social conflict in male rats *Hormones and Behavior*, 43(1)2003:205-213
51. Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Tabira T. Saiko-ka-ryukotsu-borei-to, an herbal medicine, prevents chronic stress-induced disruption of glucocorticoid negative feedback in rats *Life Sciences*, 72(1)2002:67-77
52. Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats *Psychoneuroendocrinology*, 26(5)2001:443-459
53. Bowman RE, Zrull MC, Luine VN. Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats *Brain Research*, 904(2)2001:279-289
54. C Sandi, J Merino, MI Cordero, K Touyarot, C Venero. Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of

- the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1
Neuroscience, 102(2)2001:329-339
55. Chang TH, Szabo E. Induction of differentiation and apoptosis by ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in nonsmall-cell lung cancer. *Cancer Res*, 60(2000):1129–38.
 56. Tsubouchi Y, Sano H, Kawahito Y, et al. Inhibition of human lung cancer-cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 270(2000):400–05.
 57. Han SW, Greene ME, Pitts J, Novel expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human neuroblastoma cells. *Clin Cancer Res* 7(2001):98–104.
 58. Chattopadhyay N, Singh DP, Heese O, Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) in human astrocytic cells: PPARgamma agonists as inducers of apoptosis. *J Neurosci Res* 61(2000):67–74.
 59. Bailey DB, Wray J. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation Prostaglandins & other Lipid Mediators 71(2003):1–22
 60. Takano H, Komuro I. Roles of peroxisome proliferator-activated receptor y in cardiovascular disease *Journal of Diabetes and Its Complications* 16(2002):108–114
 61. Cuzzocrea S, Peroxisome proliferator-activated receptors gamma ligands and ischemia and reperfusion injury. *Vascular Pharmacology* 41(2005):187–95
 62. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing Inc, New York (1989) 275-340
 63. Van Der Bosch H, Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem*; 61(1992):157-97
 64. Fahimi HD, Sies H, *Peroxisomes in biology and medicine*, (1987) s:1-148, Springer-Verlag, Berlin.
 65. Lazarow PB, de Duve C, A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes: enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Jci. USA* 73(1976):2043-46

66. Mannaerts GP, Van Veldhoven PP, metabolic pathways in mammalian peroxisomes *Biochimie* 75(1993):147-58
67. Schepers L, Van Veldhoven PP, Casteels M, Eysen HJ, Mannaerts GP. Presence of three acyl-CoA oxidase, a non inducible trihydroxy-coprostanoyl-CoA oxidase. *J. Biol. Chem*, 265(1990);5242-46
68. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* 193(1951)265-75
69. Varley H, Gowenlock AH, Bell M; *Practical clinical biochemistry- hormones, vitamins, drugs and poisons, Volume 2, Fifth Edition, William Heinemann Medical Books Ltd. London-1976*
70. Aebi H; *Catalase in vitro. Methods Enzymol.* 1984;105:121-6
71. Latruffe N, Bugaut M. *Peroxisomes, Biochemistry, Moleküler Biology and Genetic Diseases, FEBS advanced course 93-01 Practical session 1993 Bourgogne Universitesi 1993*
72. Keller M, Sommer AM, Pörtner HO, Abele D; *Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (Arenicola marina) mitochondria exposed to acute temperature changes, The Journal of experimental Biology* 2004;207:2529-38
73. Demetri GD, Fletcher CD, Mueller E, et al. Induction of solid-tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3951-56.
74. Debrock G, Vanhentenrijk V, Sciot R, et al. A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *Br J Cancer* 2003; 89: 1409-12.
75. Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, et al. Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon-polyp formation. *Nat Med* 1998; 4: 1058-61.
76. Sarraf P, Mueller E, Jones D, et al. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med* 1998;4:1046-52.
77. Tomita S, Kawamata H, Imura J, et al. Frequent polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in colorectal cancer containing wild-type K-ras gene. *Int J Mol Med* 2002; 9: 485-88.

78. Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, et al. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1998; 58: 3344–52.
79. Motomura W, Okumura T, Takahashi N, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27Kip1 in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5558–64.
80. Eibl G, Wente MN, Reber HA, Hines OJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces pancreatic cancer cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 522–29.
81. Koga H, Sakisaka S, Harada M, Involvement of p21(WAF1/Cip1), p27(Kip1), and p18(INK4c) in troglitazone-induced cell-cycle arrest in human hepatoma cell lines. *Hepatology* 2001; 33: 1087–97.
82. Gimble JM, Pighetti GM, Lerner MR, Expression of peroxisome proliferator-activated receptor mRNA in normal and tumorigenic rodent mammary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 813–17.
83. Pighetti GM, Novosad W, Nicholson C, et al. Therapeutic treatment of DMBA-induced mammary tumors with PPAR ligands. *Anticancer Res* 2001; 21: 825–29.
84. Sasaki H, Tanahashi M, Yukiue H, Decreased peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression was correlated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 36: 71–76.
85. Rohn TT, Wong SM, Cotman CW, Cribbs DH. 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2, a specific ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, induces neuronal apoptosis. *Neuroreport* 2001; 12: 839–43.
86. Burdge GC, Rodway H, Kohler JA, Lillycrop KA. Effect of fatty-acid supplementation on growth and differentiation of human IMR-32 neuroblastoma cells in vitro. *J Cell Biochem* 2000; 80: 266–73.
87. Berge K, Tronstad KJ, Flindt EN, Tetradecylthioacetic acid inhibits growth of rat glioma cells ex vivo and in vivo via PPAR-dependent and PPAR-independent pathways. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1747–55.

88. Kato M, Nagaya T, Fujieda M, Expression of PPARgamma and its ligand-dependent growth inhibition in human brain tumor cell lines. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 660–66.
89. Zhou XP, Smith WM, Gimm O, Overrepresentation of PPARgamma sequence variants in sporadic cases of glioblastoma multiforme: preliminary evidence for common low-penetrance modifiers for brain-tumour risk in the general population. *J Med Genet* 2000; 37: 410–14.
90. Zander T, Kraus JA, Grommes C, Induction of apoptosis in human and rat glioma by agonists of the nuclear receptor PPARgamma. *J Neurochem* 2002;81:1052–60.
91. Hayran M, Özdemir O. Bilgisayar istatistik ve tıp , Hekimler yayın birliği 1995, 320-3
92. O. Donat, O. Gozen, A.S. Gonul, E. Koylu, C. Eker, F. Akdeniz, S. Vahip, S. Pogun The effects of chronic fluoxetine, olanzapine or olanzapine-fluoxetine combination treatment on the expression of brain derived neurotrophic factor levels in chronically stressed rats poster European Congress of Neuropsychopharmacology, 2004
93. Stoltz, R. F, Galassi, J.P., Internal Attributions and Types of Depression in college students: The Learned Helplessness Model Revisited. *Journal of Counseling Psychology*, 3(1989):316-321
94. Uzunöz, A., Depresif ve Depresif olmayan kişilerin çözümlü ve çözümsüz problemleri çözme çabalarının incelenmesi. *Psikoloji Dergisi*, 24(1990)30-41
95. Bootzin, R. R., Acocella, J.R., Alloy, L.B, The Mood Disorders, *Abnormal Psychology*, (1972)241-245
96. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi fizyoloji, 10. baskı, Yüce yayımları a.ş. ve Nobel Tıp kitabevleri Ltd. Şti. 2001, 876-9
97. C. Sandi, J. J. Merino, M. I. Cordero, K. Touyarot and C. Venero. Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1 *Neuroscience*, 2001;102(2); 329-339.
98. Leonard BE. The immun system, depression and the action of antidepressants. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. and Biol. Psychiat.* 2001;25:767-80.

99. Uresin Y, Erbas B, Ozek M, Ozkok E, Gurol AO. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004; 5(2):93-6.
100. Abidin I, Yargicoglu P, Agar A, Gumuslu S, Aydin S, Ozturk O, Sahin E. The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. *Int J Neurosci.* 2004; 114(5):683-99.
101. Dabelic S, Fogel M, Maravic G, Lauc G. Stress causes tissue-specific changes in the sialyltransferase activity. *Z Naturforsch [C].* 2004 ;59(3-4):276-80.
102. Mizoguchi K, Ishige A, Takeda S, Aburada M, Tabira T. Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. *J Neurosci.* 2004;24(24):5492-9.
103. Ruth B. S. Harris, Haiyan Gu, Tiffany D. Mitchell, Liya Endale, Mariano Russo and Donna H. Ryan. Increased glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained. *Physiology & Behavior*, 2004;81(4):557-568
104. Gwendolyn E. Wood, L. Young T, Lawrence P. Reagan, McEwen BS. Acute and chronic restraint stress alter the incidence of social conflict in male rats. *Hormones and Behavior*, 2003;43(1):205-213
105. K. Mizoguchi, A. Ishige, M. Aburada and T. Tabira. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 2003;119(3):887-897
106. Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Hand S, Tabira T. Saiko-ka-ryukotsu-borei-to, an herbal medicine, prevents chronic stress-induced disruption of glucocorticoid negative feedback in rats. *Life Sciences*, 2002;72(1):67-77
107. Jaferi A, Nowak N, Bhatnagar S. Negative feedback functions in chronically stressed rats: role of the posterior paraventricular thalamus. *Physiology & Behavior*, 2003;78(3):365-373
108. Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 2001;26(5):443-459

109. Rachel E. Bowman, Mark C. Zrull and Victoria N. Luine. Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats *Brain Research*, 2001;904(2):279-289
110. M.L. Andersen, M. Bignotto, R.B. Machado and S. Tufik Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004;37:791-797
111. Lemberger T., Saladin R., Vazquez M., Assimacopoulos F., Staels B., Desvergne B., Wahli W., Auwerx J.; Expression of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Gene Is Stimulated by stress and follow diurnal Rhythm; *The Journal of Biological Chemistry*, 1996;271(3):1764-69
112. Plant NJ; Horley NJ; Savory RL; Elcombe CR; Gray TJ; Bell DR; The peroxisome proliferators are hepatocyte mitogens in chemically-defined media: glucocorticoid-induced PPAR alpha is linked to peroxisome proliferator mitogenesis. *Carcinogenesis* 1998;19(5):925-31
113. Mastrocola R., Aragno M., Betteto S., Brignardello E., Catalano G. M., Danni O., Boccuzzi G; Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation; *Life Sciences* 2003;73:289-99
114. Khan SA; Nyce JW.; Effects of ubiquinone and mevalonic acid on hepatic peroxisomal enzymes induced by dehydroepiandrosterone. *Pharmacology & Toxicology* 1997;80(3):118-21
115. Rao MS., Musunuri S., Reddy JK.; Dehydroepiandrosterone-induced peroxisome proliferation in the rat liver; *Pathobiology (Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology.)* 1992;60(2):82-6
116. Prough RA; Webb SJ; Wu HQ; Lapenson DP; Waxman DJ; Induction of microsomal and peroxisomal enzymes by dehydroepiandrosterone and its reduced metabolite in rats; *Cancer Research* 1994;54(11):2878-86
117. Zhou YC; Waxman DJ; Activation of peroxisome proliferator-activated receptors by chlorinated hydrocarbons and endogenous steroids; *Environmental health perspectives* 1998;106(4):4983-8
118. Anderson ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S; Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats; *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(6);791-7

119. Dabelic S, Flogel M, Maravic G, Lauc G; Stres causes tissue-specific changes in the sialytransferase activity; Z Naturforsch [C] 2004;59(3-4):276-
120. Thottassery J.; Winberg L.; Youssef J.; Cunningham M.; Badr M.; Regulation of perfluorooctanoic acid-induced peroxisomal enzyme activities and hepatocellüler growth by adrenal hormones; Hepatology 1992;15(2):316-22
121. Harvey RA, Champe PC, Mycek MJ, Lippincott Farmakoloji, Nobel Tıp Kitabevi 1997 1st 2.baskı:122-23
122. Cuzzocrea S, Peroxisome proliferator-activated receptors gamma ligands and ischemia and reperfusion injury Vascular Pharmacology 41 (2005) 187–195
123. Nakajima, A., Wada, K., Miki, H., Kubota, N., Nakajima, N., Terauchi, Y., Ohnishi, S., Saubermann, L.J., Kadowaki, T., Blumberg, R.S., Nagai, R., Matsuhashi, N., Endogenous PPAR gamma mediates antiinflammatory activity in murine ischemia–reperfusion injury. Gastroenterology 120(2001);460–469.