

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

HOMOSİSTEİNİN YAĞ DOKUSUNDA OKSİDE LDL (OxLDL) RESEPTÖRÜ GEN
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Ahmet MENTEŞE

TRABZON-2011

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

**HOMOSİSTEİNİN YAĞ DOKUSUNDA OKSİDE LDL (OxLDL)
RESEPTÖRÜ GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Ahmet MENTEŞE

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 16.05.2011

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 10.06.2011

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ahmet ALVER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. E.Edip KEHA

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Fahri UÇAR

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Abdulkerim BEDİR

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Mayıs 2011

TRABZON

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma K.T.Ü Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Doktora eğitimimde değerli katkılarından dolayı, başta danışman hocam sayın Doç. Dr. Ahmet ALVER olmak üzere değerli bilgilerinden faydalandığım saygı değer hocalarım Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Ekin ÖNDER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Doç. Dr. Birgül KURAL, Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN, Prof. Dr. Murat ERTÜRK, Doç. Dr. Ersan KALAY, Arş. Gör. Ayřegöl UZUN, Arş. Gör. Selim DEMİR ve Öğrt. Gör. İbrahim TURAN ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki bütün çalışma arkadaşlarıma, ayrıca beni bu günlere getiren kıymetli aileme, güler yüzünü ve desteğini esirgemeyen eşime, beni bütün eğitimim boyunca yetiştiren değerli hocalarıma ve örnek aldığım ağabeylerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ahmet MENTEŞE

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Yağ Dokusu	2
2.1.1. Yağ Dokusu ve Metabolik Özellikleri	2
2.1.2. Yağ Hücresi	3
2.1.2.1. Yağ Hücresi Araştırma Yöntemleri	3
2.1.2.2. 3T3-L1 Yağ Hücresi	4
2.1.2.3. 3T3-L1 Preadipositlerde Farklılaşma Süreci	5
2.1.2.4. 3T3-L1 Preadipositlerin Farklılaşması Esnasında Gen Expresyonu	6
2.1.3. Yağ Dokusunun Endokrin Fonksiyonları	7
2.1.4. Yağ Hücresi Reseptörleri	7
2.2. CD36 Reseptörü	8
2.2.1. CD36 Reseptörünün Protein ve Gen Yapısı	8
2.2.2. CD36 Reseptörünün Biyolojik Önemi	10
2.3. Okside LDL (OxLDL)	14
2.4. Homosistein ve Yapısı	16
2.4.1. Homosisteinin Hücre İçine Alınması ve Metabolizması	17
2.4.2. Plazma Homosistein Düzeyleri ve Hiperhomosisteinemi	19
2.4.3. Hiperhomosisteineminin Etkileri ve Hastalıklarla İlişkisi	20
2.4.4. Homosisteinin Biyolojik Etkileri	21
3. MATERYAL ve METOD	24
3.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	24

	5
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
3.3. 3T3-L1 Hücre Kültürü	26
3.3.1. 3T3-L1 Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması	26
3.3.2. 3T3-L1 Hücrelerinin Pasajlanması	27
3.3.3. 3T3-L1 Hücrelerinin Sayılması ve Canlılık Testi	27
3.3.4. 3T3-L1 Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması	28
3.3.5. Adiposit Farklılaşması	29
3.3.5.1. Çözeltiler	29
3.3.5.2. Farklılaştırma işlemi	30
3.3.6. Adiposit Boyanması	31
3.3.7. MTT Testi	32
3.4. Hcy'nin 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşması Üzerine Etkisinin İncelenmesi	33
3.5. Hcy'nin 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaştırılması Esnasında CD36 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi	33
3.6. RNA İzolasyonu	34
3.7. RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi	35
3.8. Reverse Transcriptase-PCR ile RNA dan cDNA Elde Edilmesi	36
3.9. Real Time PCR	37
3.9.1. Real Time PCR Protokolü	37
3.9.2. Örneklerin Real Time PCR Sonuçlarının Hesaplanması	39
3.10. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi	40
3.11. İstatistiksel Analizler	40
4. BULGULAR	41
4.1. Hcy'nin 3T3-L1 Hücreleri Üzerine Toksik Etkisi	41
4.2. 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşması	42
4.3. 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşması Üzerine Hcy'nin Etkisinin İncelenmesi	43
4.4. 3T3-L1 Hücrelerinden Yağ Hücrelerine Farklılaşmış Olgun Adipositlerde Hcy'nin CD36 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi	44
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	54

	6
7. ÖZET	55
8. SUMMARY	56
9. KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Adiposit farklılaşmasının in vitro modelleri 4	
Tablo 2. Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler	24
Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler	25
Tablo 4. RNA örneklerinin reverse transcriptase-PCR işlemine hazırlanması	36
Tablo 5. Reverse transcriptase-PCR protokolü..	36
Tablo 6. Real Time PCR'da kullanılan primer dizileri.	37
Tablo 7. Örneklerin Real Time PCR için hazırlanması	38
Tablo 8. Real Time PCR protokolü	39
Tablo 9. Homosistein 3T3-L1 hücreleri üzerine toksik etkisi(% canlılık testi)	41
Tablo 10. 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması üzerine homosisteinin etkileri	43
Tablo 11. Yağ hücrelerine farklılaşmış olgun adipositlerde homosisteinin CD 36 gen ekspresyonu üzerine etkileri	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Yağ hücrelerinin oluşum aşamaları	3
Şekil 2. (A) 3T3-L1'in adipositlere dönüşmeden önce faz kontrast mikroskobu görüntüsü (B) oluşan adiposit kolonisinin faz kontrast mikroskobu görüntüsü	5
Şekil 3. 3T3-L1 preadiposit farklılaşma aşamaları	6
Şekil 4. Yağ hücresinin salgı ürünleri.	7
Şekil 5. CD 36 geninin şematik gösterimi.	8
Şekil 6. CD 36 proteininin şematik yapısı	9
Şekil 7. CD 36 reseptörü aracılığıyla OxLDL sinyal mekanizması	11
Şekil 8. Homosisteinden homosistin oluşumu	16
Şekil 9. Total plazma homosistein bileşenleri ve oranları	16
Şekil 10. Homosistein metabolizması	18
Şekil 11. Vasküler düz kas hücrelerinde homosistein uyarımlı MCP-1 ekspresyonunun mekanizması	23
Şekil 12. Mikroskopla bakıldığında hematositometrenin görünümü	28
Şekil 13. MTT testi pleyt görüntüsü	41
Şekil 14. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma sürecinde elde edilen mikroskop görüntüleri	42
Şekil 15. RNA örneklerinin Jel görüntüsü	43
Şekil 16. 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması üzerine homosisteinin etkileri	44
Şekil 17. Deney gruplarındaki PCR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü ve CD 36 gen ekspresyonunun % cinsinden ortalama değerlerinin bar grafiği	45
Şekil 18. Örneklere ait Beta Aktin melting eğrisi	46
Şekil 19. Örneklere ait CD36 melting eğrisi	46
Şekil 20. PCR Standart grafiği	47
Şekil 21. Beta aktin, CD36 amplifikasyon eğrisi	47

KISALTMALAR

ABCA	: ATP-Binding Cassette Transporter
CD 36	: Cluster of Differentiation 36
CBS	: Sistatyonin β -sentaz
C/EBP	: CCAAT/enhancer bağlayıcı protein
DEX	: Dekzametazon
Hcy	: Homosistein
LD	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
MAP	: Mitogen activated protein
MAT	: Metiyonin adenzil tranferaz
MCSF	: Makrofaj koloni-stimüle edici faktör
MCP-1	: Monosit kemotaktik protein-1
MS	: Metiyonin sentaz
MTHFR	: Metilen tetra hidrofolat redüktaz
MIX	: Metilzobütülsantin
NO	: Nitrik Oksid
OxLDL	: Okside LDL
IL	: Interleukin
IL-1Ra	: Interleukin-1 Receptor Antagonist
IP	: Interferon Inducible Protein
PfEMP1	: Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1
PKB	: Protein Kinase B
PKC	: Protein Kinaz C
PMA	: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PPAR	: Peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör
RANTES	: Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed, and presumably Secreted
RXR	: Retinoid X Receptor

SAM	: S-Adonozilmetiyoninin
TG	: Trigliserid
TGF- β	: Transforming Growth Factor Beta
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
WAT	: Beyaz adipoz dokusu
5-MTHF	: 5-metiltetrahidrofolat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

CD 36 (Cluster of Differentiation 36) adipositler, monositler/makrofajlar, plateletler, mikrovasküler endotel hücreler gibi çeşitli hücre ve dokularda sentezlenen sınıf B çöpçü reseptör ailesinin bir üyesidir. CD 36 hücreler tarafından Okside LDL (OxLDL)'nin alınması ve azaltılmasında hayati bir öneme sahiptir. Adipositlerde bol miktarda bulunan CD 36, yağ asitlerinin ve OxLDL'nin bu dokuya girişini sağlar (1,2).

OxLDL aterosklerozlu, tip 2 diyabetli ve obez bireylerin plazmalarında tespit edilmiştir. 3T3-L1 preadipositlerde, OxLDL, hücre çoğalmasını, apoptozu ve farklılaşmasını, etkileyen büyüme ve transkripsiyon faktörleri ile sitokin üretimini düzenler (3).

CD 36, fagositlerde OxLDL'nin endositozuyla ilişkilidir. OxLDL'nin yüksek afiniteli bir reseptördür. CD 36'nın OxLDL'yi bağlama ve içeri alma kapasitesinin makrofajların köpük hücrelerine dönüşümünü düzenlediği düşünülmektedir. CD 36'nın adipositlerde oldukça fazla sentezlendiği görülmüş, ancak adipositlerce OxLDL'nin alınımı ve yıkımı tam olarak aydınlatılamamıştır (1).

Homosistein(Hcy), metiyonin metabolizması sırasında oluşan, protein yapısına katılmayan, yapısında kükürt bulunduran bir aminoasittir. Hiperhomosisteineminin kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. Köpük hücre oluşumuna ve ateroskleroz gelişmesine Hcy'nin katkıda bulunduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiş, ancak mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır(4).

Bu çalışmada kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, inme ve obezite gibi hastalıkların patolojisinde rol oynayan Hcy'nin yine bu hastalıklarda miktarı artan OxLDL'nin yağ hücrelerince alınımını düzenleyen CD 36'nın gen ekspresyonuna olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, yağ dokusunda yapılan in vitro çalışmalarda en çok tercih edilen 3T3-L1 hücreleri kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yağ Dokusu

2.1.1. Yağ Dokusu ve Metabolik Özellikleri

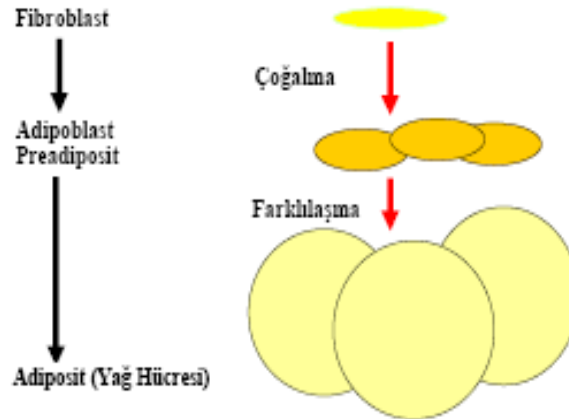
Yağ dokusu, etrafı kan damarları, fibroblastlar, immun hücreler ve kollajen lifleriyle çevrilmiş, içleri lipidlerle dolu hücrelerin oluşturduğu bir tür gevşek bağ dokusudur. Yağ dokusunun esas hücreleri adipositlerdir. Adipositler yağ dokusunda tek başına bulunabildikleri gibi küçük gruplar halinde de bulunabilirler (5). Yağ dokusu hücre yapısı, yerleşimi, rengi, damarlanması ve fonksiyonuna bağlı olarak uniloküler (beyaz) ve multiloküler (kahverengi) yağ dokusu olarak ikiye ayrılır. Beyaz yağ dokusundaki adipositlerde çekirdek kenara itilmiştir ve çekirdeğin yakınında organelleri de içeren ince bir sitoplazmik bölüm bulunur. Bu hücreler tek ve büyük bir lipid damlacığı taşıdıklarından "taşlı yüzük" manzarası oluştururlar. Lipid damlacığı herhangi bir hücre içi organel içermez (6). Beyaz yağ dokusu enerjinin trigliserid(TG) şeklinde depolandığı yerdir. Kahverengi yağ dokusunu oluşturan multiloküler hücreler ise tipik olarak birçok küçük lipid damlacığı içerir. Bu dokunun hücreleri mikroskobik olarak küresel, oval ya da ipliksi formda görülür ve bol miktarda mitokondri taşıdığından, çıplak gözle bakıldığında kahverengi olarak görünür. Kahverengi yağ dokusu ısı üretimi dolayısıyla enerji sarfiyatıyla spesifikleşmiştir. İnsanlarda yeni doğanlarda kahverengi yağ dokusu ısı dengesinin düzenlenmesinde etkilidir (6).

Beyaz yağ dokusu vücuttaki en büyük enerji deposudur. Enerjiyi depolayan(glikojen halinde) diğer organlar ise karaciğer ve kastır. Beslenmenin aralıklı ve glukoz temininin de sınırlı olması yemekler arasında serbest hale getirilecek büyük bir kalori deposuna ihtiyaç göstermektedir. Bu kalori deposu da yağ dokusudur. Triaçilgliserol(TAG) miktarı devamlı değişim içinde olan yağ dokusu besinsel, hormonal ve sinirsel olarak düzenlenir (7). Enerji deposu olmasının yanı sıra vücutta başka görevleri de vardır. Özellikle deri altı yağ dokusu vücut yüzeyinin şekillenmesinde rol oynar. Ellerde avuç içine ve ayaklarda taban altına yastık gibi yayılarak travmaları emer. Isı geçirgenliği az olduğu için vücudun ısı yalıtımını sağlar. Dokular arasında boşlukları doldurarak böbrek

gibi bazı organların yerinin korumasını sağlar. Yağ dokusu bir endokrin doku gibi davranarak enerji dengesinin ayarlanmasında, nöroendokrin ve immun fonksiyonların düzenlenmesinde aktif rol alan proteinleri salgılar (8).

2.1.2. Yağ Hücresi

Yağ hücreleri embriyogenezin 15. haftasından sonra fibroblastların preadipositlere farklılaşmasıyla oluşur (Şekil 1). Yaşamın ilk 2 yılında preadipositlerden yağ hücreleri oluşur, büyüklük ve sayı olarak en çok bu yıllarda değişime uğrarlar (9-11). Puberteye kadar yağ hücre sayısı çoğalarak artmaya devam eder. Ergenlikten itibaren yağ hücresinde mitoz görülmez, hücreler sayıca artmaz, sabit kalır. Sadece hücre büyüklüğü değişir (11, 12). Yağ hücrelerinin çapı 20-200 μm arası büyüklükte olabilmektedir. Böylece hücre çap olarak 20 kat kadar büyüme gösterebilirken, hacim olarak büyüme 1000 kata kadar ulaşabilmektedir (9, 11, 13).



Şekil 1. Yağ hücrelerinin oluşum aşamaları(9)

2.1.2.1. Yağ Hücresi Araştırma Yöntemleri

Özellikle son 20 yıl içerisinde yağ dokusunun diyabet, kanser ve Kardiyo Vasküler Hastalıklar(KVH)'da oynadığı rolün öneminin belirlenmesiyle bu alanda bir çok çalışma yapılmıştır. İn vivo modellerin yanı sıra in vitro olarak primer yağ hücresi kültürü ve yağ hücresine farklılaşabilen çeşitli hücre serileri(hatları) hem olgun yağ hücresinin, hem de yağ hücresine farklılaşma sürecinin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında yoğun olarak kullanılmıştır(tablo 1). Bilinen birçok preadiposit hücre dizileri mevcut olmasına

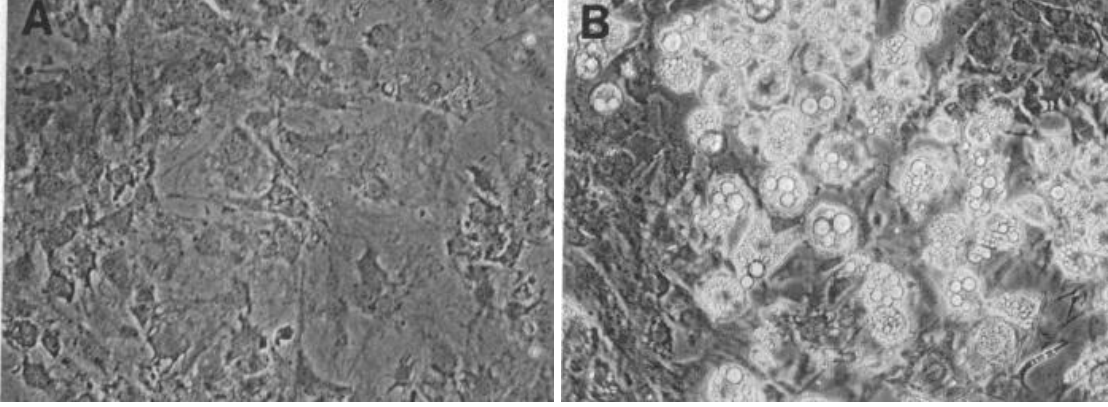
rağmen en iyi şekilde karakterize edilen ve moleküler çalışmalarda en çok kullanılan 3T3-L1 hücre serileridir(14).

Tablo 1. Adiposit farklılaşmasının in vitro modelleri (14).

Hücre Serileri	Kökeni/Gelişim aşaması	Farklılaşma için kullanılan uyarıcı ajan
ES hücreleri	Fare blastositi	Retinoik asit
CH3 10 T1/2	Fare embriyosu	Demetilasyon ajanı 5'-azasitidin
TA1	5'-azasitidin ile muamele edilmiş 10 T1/2 hücreleri	% 10 FBS, insülin ve DEX
3T3-L1	17-19 günlük fare embriyosu	% 10 FBS, DEX, MIX ve insülin(yüksek konsantrasyon)
3T3-F442A	17-19 günlük fare embriyosu	% 10 FBS, insülin
Ob17	Yetişkin ob/ob farenin epididimal yağ dokusu	% 8 FBS, insülin ve T3
Primer Kültürler	Kaynak/Yaş	Farklılaşma için kullanılan uyarıcı ajan
Rat	Subkutan, epididimal, retroperitoneal /yenidoğan (48h), 4hf, veya yetişkin	İnsülin(%10 FBS'de düşük konsantrasyonda, serumsuz ortamda yüksek konsantrasyon)
Fare	Subkutan /8-12 günlük	FBS yok, insülin, HDL,DEX
Tavşan	Perirenal/4haftalık	FBS yok, insülin, DEX
Domuz	Perirenal, Subkutan/fetal, yenidoğan (1-7 günlük)	FBS yok, insülin, glukokortikoidli veya glukokortikoidsiz
İnsan	Subkutan(abdominal)/değişen yaşlarda	FBS yok, insülin ve glukokortikoid

2.1.2.2. 3T3-L1 Fibroblast

3T3-L1 hücreleri Green ve Kehinde tarafından 3T3-Swiss albino faresinden izole edilmiştir. Bu hücreler çoğalırken(sayıca artarken) parental Swiss /3T3 hücrelerinden ayırt edilememektedir. Hücreler konflue olduklarında kontak inhibisyona uğrarlar ve adipositlere farklılaşmaya başlarlar(15). 3T3-L1 hücreleri adipositlere farklılaşmaları esnasında bir takım morfolojik, biyokimyasal ve genetik değişikliklere uğrarlar. L1 hücreleri stoplazmalarında TG biriktirmeye başlarlar ve çubuğumsu fibroblastik hücre görünümünden küresel hücre görünümüne dönüşürler(Şekil 2). Oluşan yağ damlacıkları boyanarak mikroskop altında görülebilmektedir (16).



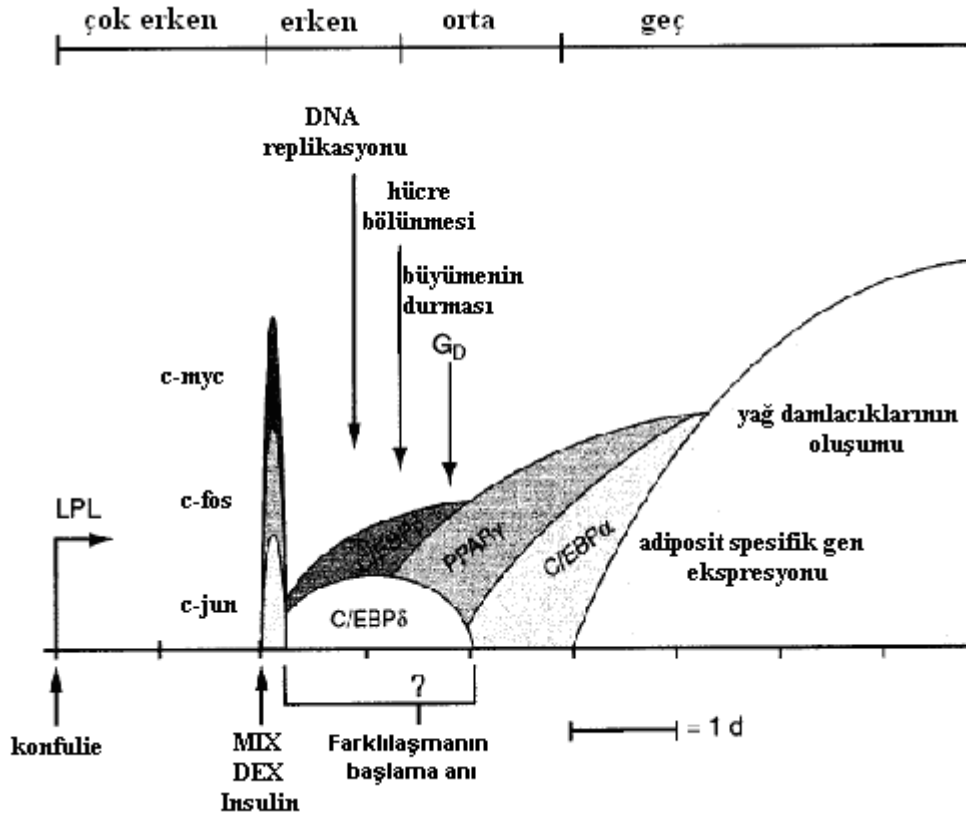
Şekil 2. 3T3-L1'in adipositlere dönüşmeden (A) ve adipositlere dönüştüklerinde (B) faz kontrast mikroskobu görüntüsü (15)

2.1.2.3. 3T3-L1 Preadipositlerde Farklılaşma Süreci

3T3-L1 preadipositleri adipogenik bir karışım ile senkronize bir şekilde farklılaşabilir. Bu karışımın içinde glukokortikoid, intrasellüler cAMP düzeylerini artırıcı bir ajan, insülin ve fetal bovin serum bulunmaktadır(17). İnsülin etkisini IGF-1 reseptörü üzerinden gösterir. IGF-1, adipogenik karışımında insülinin yerine kullanılabilir (18). Dexametazon(DEX) sentetik bir glukokortikoid agonistidir ve glukokortikoid reseptör yolağını uyarıcı olarak kullanılmaktadır. Fosfodiesteraz inhibitörü olan metilizobütilksantin (MIX), cAMP bağımlı proteinkinaz yolağını uyarmada kullanılmaktadır. Adipogenik karışım (MDI: **M**etilizobütilksantin, **D**exametazon, **I**nsulin) ile uyarımdan yaklaşık olarak 24 saat sonra farklılaşan preadipositler postkonfluent bir mitozu uğrarlar ve ardından büyüme gerçekleşir (19). Hücreler en az bir kez DNA replikasyonu ve hücre döngüsü gerçekleştirirler. Farklılaşmanın 2. gününden itibaren hücreler mitozlarını tamamlar ve G_D denilen olağan dışı büyümeyi sonlandırırlar(20). Büyümenin durmasından sonra hücreler adiposit olmaya yönelirler. Büyüme durmuş hücreler 3. günde farklılaşma belirteçlerini salgılamaya başlarlar. Bu belirteçler lipogenik veya lipolitik enzimler olabileceği gibi olgun adiposit fenotipini düzenleyici başka proteinlerde olabilir. Hücreler toplanırlar, yağ damlacıklarını biriktirirler ve son olarak ta 5-7. günde farklılaşmış adipositler haline gelirler (21).

2.1.2.4. 3T3-L1 Preadipositlerin Farklılaşması Esnasında Gen Ekspresyonu

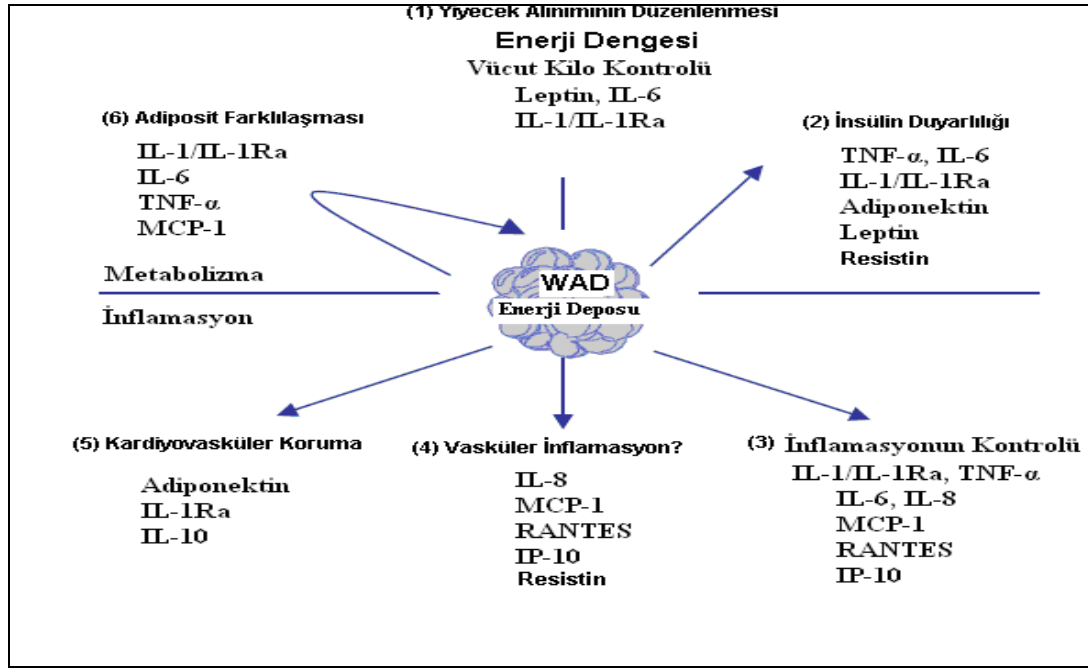
Konfüle haldeki 3T3-L1 hücreleri adiposit farklılaşmasının erken belirteçlerini salgırlar. Hücre hücre teması lipoprotein lipaz ve tip VI kollagen genlerinin ekspresyonunu indükle. MDI'in eklenmesiyle beraber hücreyi mitoz bölünmeye götüren faktörlerin sentezi artar. CCAAT/enhancer bağlayıcı protein (C/EBP) β ve δ 'nın farklılaşma karışımının eklenmesinden sonra sentezlenen ilk hedef transkripsiyon faktörleridir. Bu faktörlerin uyarılmasıyla peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör (PPAR γ) gama C/EBP α ekspresyonları uyarılır ve bu iki faktör adiposit fenotipinin oluşturulmasını ve sürdürülmesini düzenleyen protein ve enzimlerin transkripsiyonunu uyarır. PPAR γ ve C/EBP α daha çok farklılaşmanın ileri düzeylerinde kritik olmalarına rağmen preadipositlerde eksprese olmazlar ve erken dönem gelişiminde etkili değildirler (21).



Şekil 3. 3T3-L1 preadiposit farklılaşma aşamaları (çok erken, erken, orta ve geç dönemde). LPL, lipoprotein lipaz; C/EBP, CCAAT/ enhancer binding protein; PPAR, peroksizom proliferatörlerince aktifleştirilen protein; MIX, metilizobutilksantin; DEX, deksametazon (21).

2.1.3. Yağ Dokusunun Endokrin Fonksiyonları

Yağ dokusu vücutta enerji deposu olmasının yanı sıra, enerji metabolizması, immün sistem ve üreme sistemi üzerine etkisi olan faktörleri de salgılar. Bunların bir kısmı yağ dokusu miktarı ile orantılı olarak salgılanır. Bu faktörlerin dolaşıma geçişi hormonal sinyallerle kontrol edilir. Yağ hücrelerine insülin, adrenalin, noradrenalin ve kortizon gibi maddeler etki ederek fonksiyonunu düzenlerler (11).



Şekil 4. Yağ hücresinin salgı ürünleri. Adipoz doku oldukça aktiftir. Beyaz yağ dokusu (WAD) inflamasyonu ve metabolizmayı düzenleyen birçok protein salgılar(22).

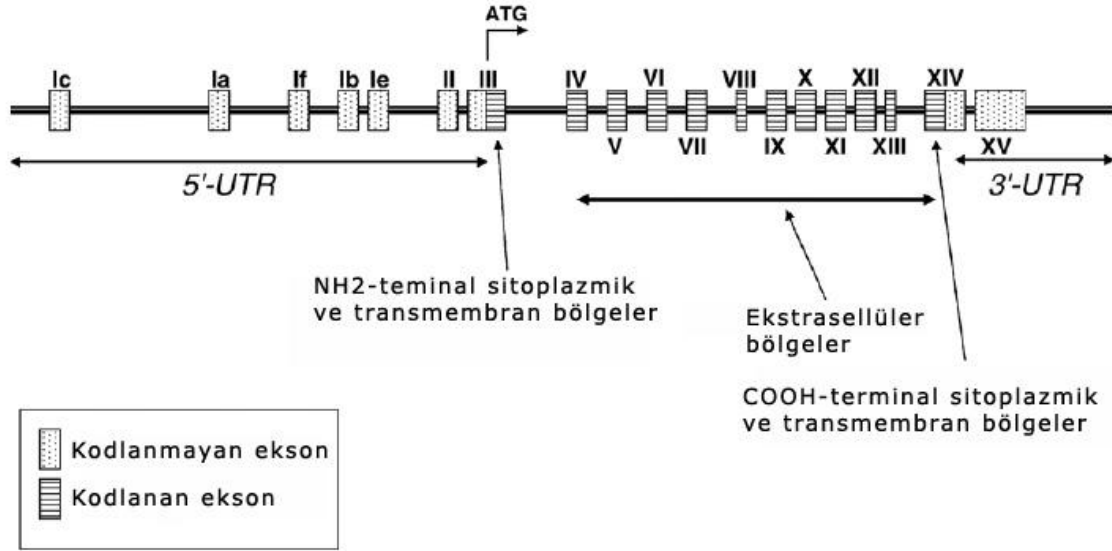
2.1.4. Yağ Hücresi Reseptörleri

Yağ hücresine dışardan hormonlar ve sitokinler aracılığı ile endokrin, parakrin ve otokrin sinyaller gelir. Yağ hücresi membranında ve sitoplazmasında çok değişik hormon ve sitokinlere ait reseptörler bulunur. Yağ hücresi membranında bulunan reseptörler; hormon sitokin reseptörler (örneğin: leptin, insülin, TSH, anjiyotensin II gibi), adrenerjik reseptörler ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ ve $\beta 2$ reseptör gibi), lipoprotein reseptörler (örneğin; VLDL, LDL, HDL gibi), okside LDL çöpçü reseptörü CD 36 gibi ve sitoplazmada bulunan nükleer reseptörler olmak üzere sınıflandırılabilir. Bu reseptörlerin uyarılması ile oluşan sinyaller hücre fonksiyonlarını uyararak veya inhibe ederek düzenlerler (11).

2.2. CD 36 Reseptörü

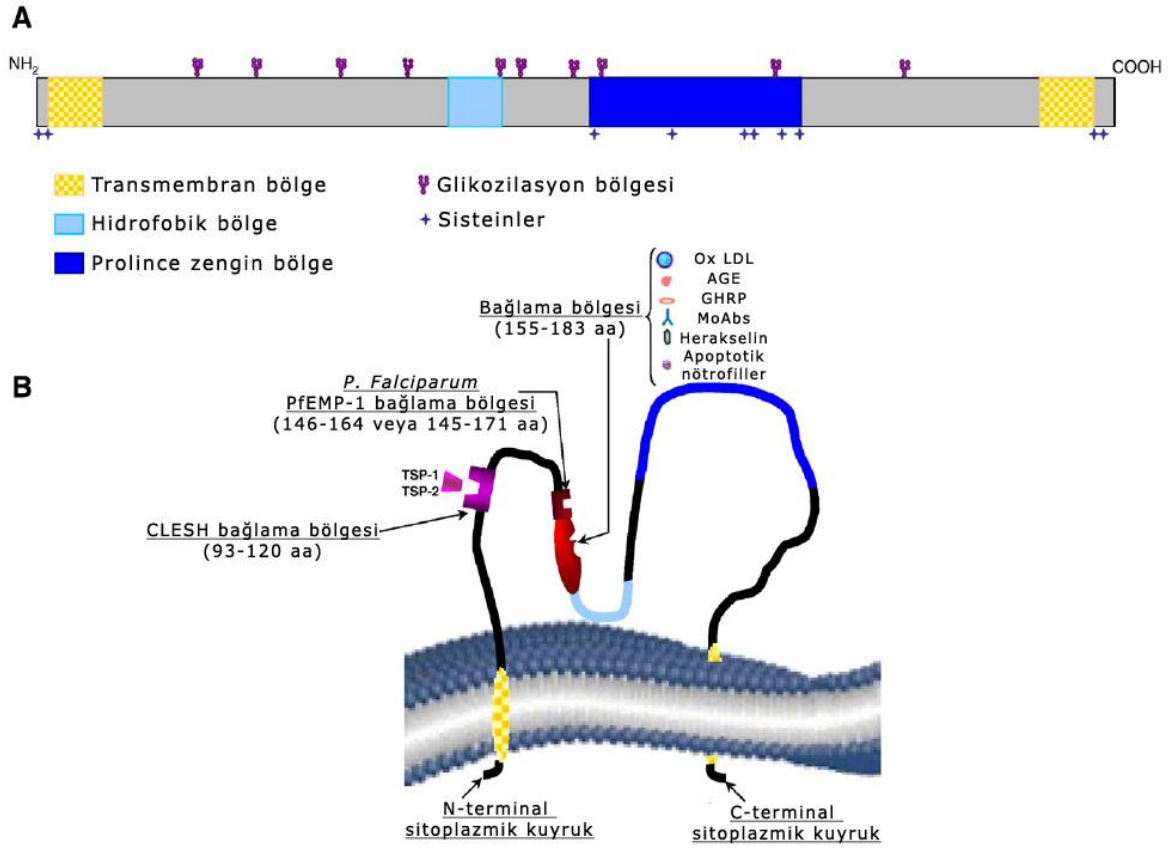
2.2.1. CD 36 Reseptörünün Protein ve Gen Yapısı

CD 36 omurgalı hayvanlarda birçok hücrenin yüzeyinde bulunan transmembran glikoproteindir. CD 36, 10 adet N bağlı glikozilasyon bölgesi içermektedir. Bu glikozillenme sonucu gerçek molekül ağırlığı olan 88 kDa ağırlığına ulaşmaktadır(23). CD 36 geni, insanlarda 7. kromozomun uzun kolunda q11.2 bölgesinde, sıçanlarda 4. kromozom ve farelerde 5. kromozomda yerleşmiştir(şekil 5). CD 36, 471 aminoasitlik, membranı kat eden, 52 kD ağırlığında bir proteindir. CD 36 sınıf B çöpçü reseptör ailesinin bir üyesidir (24).



Şekil 5. CD 36 geninin şematik gösterimi(25)

CD 36'nın primer yapısı oldukça iyi korunmuştur ve memeli türleri arasında dizi homolojileri birbirine çok benzemektedir. CD 36'nın, iki transmembran ve iki sitoplazmik bölgenin birleşmesi sonucu bir ekstrasellüler bölgeden oluşan bir protein olduğu düşünülmektedir(Şekil 6). CD 36 reseptörünün intraselüler bölgeleri çok kısa sitoplazmik kuyruğa sahiptir ve N terminali kuyruğunda bir sinyal peptidi bulunmaktadır. Tek zincirli olan proteinin karboksil ucunun hemen yakınında 27 aminoasitlik hidrofobik transmembran bölge yer almaktadır. Çalışmalar her iki sitoplazmik kuyruk tarafında amino- ve karboksil-uçlarının her ikisinin de palmitoilatlanmış sistein kalıntıları içerdiğini göstermiştir. Bu durum CD 36 reseptörünün kaveol ve lipit tabakası içerisinde yerleşmesinde önemli rol oynamaktadır(26).



Şekil 6. CD 36 proteininin şematik yapısı. (A) CD 36 proteininin primer yapısı. (B) CD 36 reseptörünün hücre zarındaki gösterimi(25).

Ekstrasellüler bölge, N-bağlı glikozilasyon bölgelerince zengindir ve 184-204 amino asitleri arasında lokalize olan hidrofobik bir bölge taşımaktadır. OxLDL, ilerlemiş glikozilasyon son ürünleri (“Advanced Glycation End Products”, AGE) ve büyüme hormonu salgılayıcı peptitler olan heksarelin ve EP80317’nin 155-183 aminoasitleri arasında lokalize olan bir bölgeye bağlandığı saptanmıştır. CD 36 üzerinde bulunan diğer OxLDL bağlanma bölgeleri olarak, 23-93 ve 120-155 arasındaki aminoasitleri içeren bölgelerinde olabileceği rapor edilmiştir (25, 27).

2.2.2. CD 36 Reseptörünün Biyolojik Önemi

CD 36 reseptörü, başlangıçta bir trombosit zar proteini ve trombospondin (TSP-1) reseptörü olarak tanımlanmıştır (28). Daha sonra, makrofajlarda OxLDL ve apoptotik hücrelerin alınmasında, gram pozitif bakteri hücrelerinin komponentlerine karşı immün cevabın başlamasında görevli olduğu, mikroglialarda fibriler amiloid proteinlerin

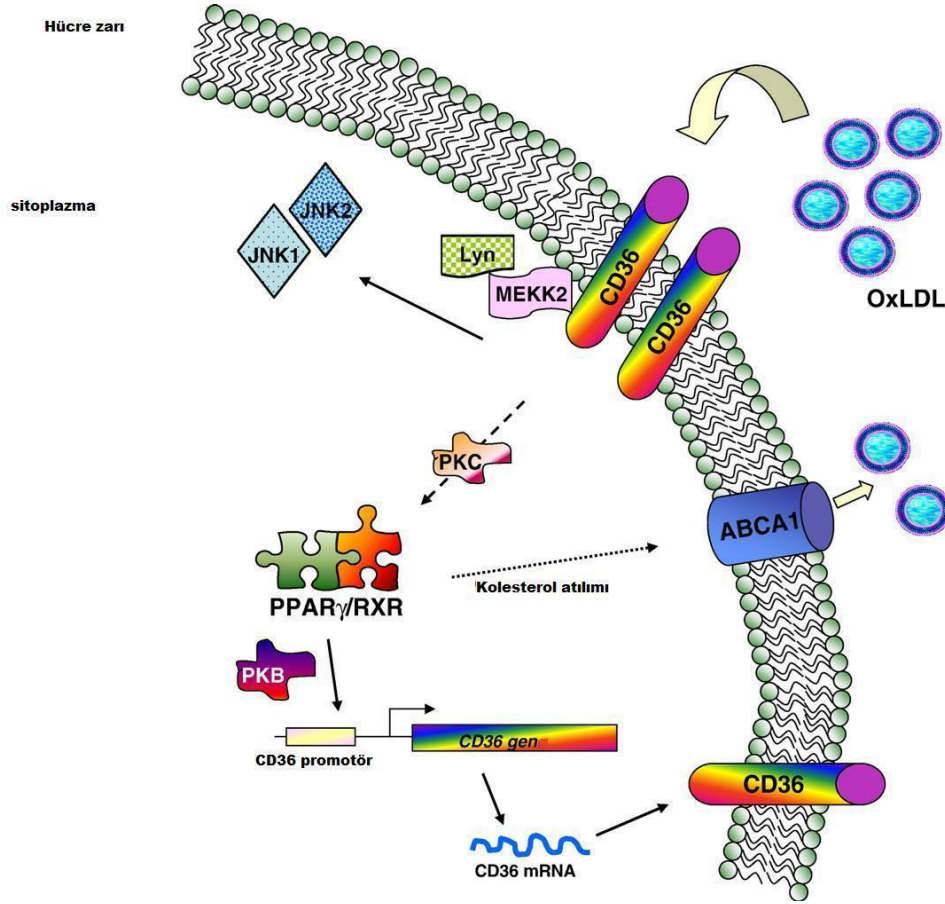
tanınması ve adipositlerde uzun zincirli yağ asitlerinin taşınmasında görev aldığı gösterilmiştir (29, 30, 31, 32, 33).

CD 36 reseptörü, monositler/makrofajlar, plateletler, mikrovasküler endotel hücreler, adipositler, keratinositler, kardiyak ve iskelet kası hücreleri, retikülositler, mikroglia, dendritik hücreler, meme, bağırsak ve retinal pigment endotel hücreleri, böbrek epiteli, çok az miktarlarda karaciğer ve düz kas hücrelerinde olmak üzere oldukça çeşitli hücre ve doku tarafından sentezlenmektedir. CD 36, kardiyovasküler fonksiyon ve hastalıklar, kanser biyolojisi, parazitoloji, Alzheimer hastalığı, inme, lipit metabolizması ve yağ asiti taşınması, adezyon, anjiyogenez, platelet biyolojisi, kas fonksiyonu ve metabolizması, inflamasyonun modülasyonu, “Transforming Growth Factor Beta”, TGF- β 'nın aktivasyonu, diyabet ve kronik böbrek hastalığı ve ayrıca yiyecek seçimi gibi bir çok normal ve patolojik süreçte göze çarpan önemli bir role sahiptir (25, 26, 34).

CD 36 aracılığıyla makrofajlar tarafından OxLDL'nin alınması, insanlarda ateroskleroza yol açan köpük hücre farklılaşmasının başlangıcı ve gelişiminin önemli bir basamağıdır. CD 36 geni aktarılmış insan epitelial böbrek hücreleri ile yapılan bir çalışmada, CD 36'nın özgül olarak OxLDL bağlama kapasitesi ilk defa ortaya koyularak CD 36'nın bir okside lipoprotein reseptörü olduğu gösterilmiştir (29). CD 36 gen polimorfizmi bulunan hastalardan izole edilmiş monosit/makrofajlarda OxLDL bağlanmasının ve birikiminin kontrol hücrelerine göre %40 oranında azaldığı saptanmıştır (35). OxLDL'nin CD 36'ya bağlanması ve hücre içine alınmasını bloke eden özgül bir monoklonal antikor olan OKM5 kullanılarak yapılan çalışmada, OxLDL'nin makrofajlara bağlanmasının %50 oranında azaldığı gösterilmiştir (36). Maloud ve arkadaşları, CD 36'nın C-terminalinde yer alan 6 amino asidin OxLDL nin reseptöre bağlanmasını ve metabolizmasını düzenlediğini göstermişlerdir (37). CD 36'dan yoksun sıçan peritoneal makrofajlarında, OxLDL'nin bağlanmasında ve endositozunda bir zayıflama olduğu gözlenmiştir (36).

CD 36'nın iki kısa sitoplazmik bölgesi olmasına rağmen bir sinyal molekülü olduğu açıkça görülmektedir. Makrofajlarda CD 36 reseptörüne OxLDL bağlanması ile Src protein tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan Lyn kinaz aktifleşir. Lyn kinaz aktivasyonu MEKK2 ve ardından JNK (Jun aminoterminal kinaz “c-Jun aminoterminal kinase”) aktivasyonuna neden olarak proaterojenik OxLDL'nin fagositozuna yol açmaktadır (şekil 7)(38). Mürin modellerinde yapılan bir çalışmada JNK'nın farmakolojik inhibisyonunda

veya makrofajlarda JNK'ya spesifik olan bir delesyonda OxLDL alınımının ve aterosklerozun azaldığı belirtilmiştir (39, 40).



Şekil 7. CD 36 reseptörü aracılığıyla OxLDL sinyal mekanizması (25).

Monosit ve makrofajlarda CD 36 ekspresyonu adhezyon, farklılaşma, nükleer hormon reseptörleri ve sitokinler tarafından düzenlenmektedir. CD 36 ekspresyonunun M-CSF(Monocyte Colony-Stimulating Factor), GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor), doğal ve modifiye LDL'ler, hücrel kolesterol ve IL-4 tarafından transkripsiyonel seviyede düzenlendiği gösterilmiştir. CD 36 ekspresyonu aynı zamanda kortikosteroidler, TGF- β , HDL ve LPS tarafından da baskılanmaktadır (41, 42, 43, 44).3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması esnasında CD 36 aracılığıyla OxLDL'nin hücre içine alınımı ve yıkımında önemli bir artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca CD 36 ligandı olan OxLDL'nin aynı zamanda 3T3-L1 hücrelerinde CD 36 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir(45,46).

CD 36'nın bir sitokin olan IL-4'e ve OxLDL'ye cevap olarak ortak sinyal olan Protein Kinaz C (PKC) ve PPAR γ yolu ile upregüle olduğu gösterilmiştir (Şekil 7), (47). CD 36 ekspresyonunun önemli bir düzenleyicisi, nükleer hormon reseptörü olan PPAR γ 'dır (48, 49). OxLDL'nin CD 36 tarafından hücre içine alınması sonucunda PPAR γ ligandları olan lipit yan ürünleri (9- ve 13-hidroksioktadekadionik asit (HODE), prostaglandinJ2 (PGJ2)) oluşan bu ligandlar PPAR γ 'yı aktive ederek CD 36 ekspresyonunu arttırmaları. TGF- α tarafından PPAR γ 'nın fosforilasyonu ve transkripsiyonel aktivitesinin inhibisyonu sonucunda CD 36 mRNA ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (42, 50). Bir çalışmada fare makrofaj hücrelerinde CD 36 mRNA ekspresyonunun, PKC aracılığıyla uyarılan transkripsiyon faktörü PPAR γ aracılığıyla düzenlendiğini göstermişlerdir. Makrofaj hücrelerinde PKC aktivatörleri olan diaçilgliserol ve ingenol aracılığıyla CD 36 mRNA ekspresyonunun düzenlediği gösterilmiştir. PKC inhibitörleri PPAR γ mRNA ve protein ekspresyonunu azaltırken aynı zamanda CD 36 protein ekspresyonunu bloke etmektedir (47). Bir PPAR γ agonisti olan rosiglitazone ile makrofajlarda yapılan çalışmada CD 36 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (51).

Makrofajlar/monositler tarafından OxLDL'lerin biriktirilmesindeki rolüne ek olarak CD 36, uzun zincirli yağ asitleri için bir zar reseptörü/taşıyıcısı fonksiyonuna sahiptir. Yağ asit taşınmasını kolaylaştırıcı bir bileşenin varlığı ve bu süreçte CD 36'nın önemli bir rolünün olduğunu destekleyen güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Adipositlerin farklılaşması sırasında yağ asitlerine maruz kalmasıyla, CD 36 düzeylerinde ve yağ asit taşınmasında artışların olduğu rapor edilmiştir(34). Adipoz doku, iskelet ve kalp kası gibi CD 36'nın bol miktarda bulunduğu periferik dokularda yağ asitlerinin dokulara alınımında ve metabolizmasında CD 36'nın yüksek afiniteye sahip olduğunu gösterilmiştir. CD 36'dan yoksun farelerin kalp ve adipoz dokusunda yapılan bir çalışmada yağ asit alınımının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir(52). CD 36'dan yoksun farelerde yapılan bir çalışmada yağ asit alınımının azalması sonucunda kalpte farklı enerji substratlarının kullanıldığı gösterilmiştir (53).

Tip 2 diyabet ve insülin direncinde koroner arteriyel hastalık gelişim riskinin üç kat arttığı bilinmektedir. Transgenik hipertansif sıçanlarda CD 36'nın ekspresyonundaki artışın kan trigliserit ve yağ asiti düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, hipertansif sıçanlarda insülin direncinin, defektif yağ asit metabolizmasının ve hipertrigliserideminin altında CD 36 eksikliğinin olduğu öne sürülmektedir (54). CD 36'nın delesyonlu bir varyantına sahiptir hipertansif sıçanlar, defektif yağ asit

metabolizması, insülin direnci ve hipertansiyon ile karakterizedirler. CD 36'nın transgenik olarak ekspresyonunun sağlandığı hipertansif sıçanlarda insülin direnci iyileştiği ve dislipidemi geliştiği ama hipertansiyona etkisi olmadığı gösterilmiştir (55, 56). Glukozun CD 36 ekspresyonuna etkisi konusunda farklı veriler bulunmaktadır. Hiperglisemi geçmişine sahip hastalarda yapılan bir çalışmada, makrofajlarda CD 36 ekspresyonunun artmış olduğu rapor edilmiştir. CD 36'nın ekspresyonu, hiperglisemi geçmişine sahip hastalarda damar lezyonlarını da artırmıştır (57). Tip 2 diyabetli hastaların monositlerinde CD 36 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Monosit CD 36 ekspresyon ortalamasının, diyabetik hastalarda % 34 daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, CD 36 ekspresyonu ile plazma glukoz düzeyleri arasında bir ilişki saptanamamıştır (58). Defektif insülin sinyalinin bir sonucu olarak makrofajların CD 36 proteininde bir artış olduğu gösterilmiş ve sıçan makrofajlarında veya monositlerinde CD 36 ekspresyonunun artışının, glukozun direkt etkisi sonucu olamayacağı açıklanmıştır(59). Deney hayvanlarından elde edilen bulgular farklı çalışmalarla desteklenmiş ve insanda insülin etkisinde, lipid metabolizmasında ve hipertansiyonda CD 36'nın önemli bir role sahip olduğu öne sürülmüştür. Aynı çalışmalarda CD 36 eksikliği olan 26 kişinin yüksek plazma TG ve glukoz düzeyleri, düşük plazma HDL-K düzeyleri ve kontrollerden çok daha yüksek kan basıncına sahip oldukları sonucu elde edilmiştir. İnsülin etkisi, CD 36 eksik kişilerin beşinde, glukoz tolerans testi ile ölçüm yapılarak gösterilmiştir. Beş kişinin tamamında insülin direncine ve aynı zamanda bu beş kişiden dördünün azalmış glukoz toleransına sahip olduklarını saptamışlardır. Bu bilgilerle, CD 36 eksik fenotipteki kişilerle, genel insülin direnci bulunan metabolik ve kardiyovasküler anormallikler arasında çok sıkı bir ilişki olduğunu iddia etmişlerdir (60, 61, 62).

CD 36 aynı zamanda, lipidce zengin besinlerin seçiminde uzun zincirli yağ asitlerinin algılayıcısı gibi önemli bir rol oynamaktadır (63). Bir çalışmada, tat tomurcuk hücrelerinde CD 36'nın apikal ekspresyonu bildirilmiştir (64).

CD 36 birçok fonksiyona sahip bir membran proteindir. Bu çöpçü reseptörün, OxLDL'leri toplaması ateroskleroz sürecinde ve plak oluşumunda önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda yağ asit reseptörü olan CD 36'nın, tip 2 diyabet ve besin seçimine bağlı olarak geliştiği düşünülen obezite ile de bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Greenberg ve arkadaşları, CD 36'nın makrofajlarda apoptotik hücrelerin temizlenmesinde başrol oynadığını ve apoptotik hücrelerin membranında ortaya çıkan

okside fosfatidilserinin CD 36 ile etkileşim yaptığını in vivo çalışmada göstermişlerdir (65).

CD 36 reseptörü, *P. falciparum*-enfekte olmuş eritrositlere karşı sitoadezyon reseptörü gibi davranmaktadır. CD 36 reseptöründe oluşacak bir eksiklikte eritrositlerin *Plasmodium falciparum* ile enfeksiyonunda koruyucu etkinin ortadan kalktığı ve malaria hastalığının daha ağır seyrettiği bulunmuştur. Bu durum makrofajlardaki CD 36 ekspresyonunun parazitli eritrositler ve enfeksiyonların önlenmesinde önemli bir temizleme mekanizması olduğunu göstermektedir (66).

2.3. Okside LDL (OxLDL)

LDL, yoğunluğu 1.019-1.063 g/mL olan, kolesterol, kolesterol esteri, trigliserit ve fosfolipit ihtiva eden bir lipoproteindir. Dış tabakasında B-100 apolipoproteini yer almaktadır. İn vitro LDL, bakır ve demir gibi geçiş metallere varlığında oksidatif olarak modifiye olabilmektedir. LDL'nin yapısında bulunan poliansatüre yağ asitleri serbest radikal hasarı ve oksidasyona karşı çeşitli antioksidanlarla korunmaktadır. Bu antioksidanlar başlıca α -tokoferol olmak üzere az miktarda da karotenoidler, kriptoksantin, ubiquinol-10 ve gamma-tokoferoldür (67, 68).

OxLDL oluşumunun en erken safhası içeriğindeki uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonudur (69) LDL'nin yapısında bulunan uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu malondialdehit (MDA) gibi reaktif ürünleri oluşturmaktadır. Bu ürünler daha sonra proteinlerin lizin kalıntılarıyla etkileşmektedir (70).

Lipoproteinlerin modifikasyonlara uğramasının ateroskleroz patogeneğinde önemli bir rol oynadığı, özellikle aterosklerotik lezyon gelişimini hızlandırdığı, proinflatuar sitokinlerin salınımını indüklediği, vazodilatasyonu azalttığı ve endotel hücrelerde toksisiteye neden olduğu bildirilmektedir. LDL'nin oksidasyonu monositler, makrofajlar, nötrofiller, endotel hücreleri, fibroblastlar ve düz kas hücrelerinde oluşabilmektedir (71, 72, 73).

LDL'nin oksidasyonu arterial intimanın ekstraselüler matriksinde meydana gelmektedir. Daha sonra makrofajlarda bulunan "scavenger" reseptörleri ile içeri alınırlar (74). Makrofajlar, düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) için de reseptör taşırlar. Doğal LDL'ler makrofajlara genellikle bağlanamazken, özellikle OxLDL makrofaj içine alınarak köpük hücrelerini oluşturur (75). Bundan dolayı sadece modifiye LDL'ler makrofajlar

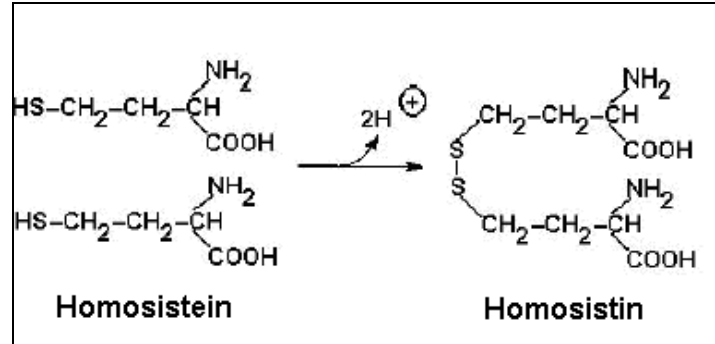
tarafından doğal LDL'den 8-10 kat daha hızlı alınabilmektedir (76). Bu modifiye LDL'ler makrofajlarda LDL reseptörlerinden farklı olarak başta CD 36 olmak üzere 'scavenger' reseptör AI, AII, AIII (SR-AI, SR-AII, SR-AIII), SR-BI, macrophage receptor with collagenous structure (MARCO), lektin benzeri OxLDL reseptörü (LOX 1) ve asetil LDL reseptörleri gibi farklı reseptörler tarafından alınırlar (77). OxLDL doğal LDL'den birçok yönden farklılık göstermektedir. Şöyle ki:

- OxLDL immünojenik ve aterojeniktir.
- Sitotoksisteyi indükler, tümör nekroz faktör salınımını inhibe eder, monosit/makrofajlardan interlökin-1 β salınımını stimüle eder.
- OxLDL, monosit ve T lenfositler için kemoatraktandır.
- Arter duvarlarında makrofajların retansiyonunu artırarak makrofaj motilitesini inhibe eder.
- İlerlemiş lezyonlarda yağ çizgilerinin gelişimini ve endotelial disfonksiyonu artırır.
- Arter duvarında interlökin-1'in salınımını uyarak aterogenezi artırabilmektedir.
- Dolaşımdaki monositler için kemotaktiktir.
- Endotel hücreleri ve makrofajları uyarak monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) ve makrofaj koloni-stimüle edici faktör (MCSF) sentezini indükler.
- Endotel hücrelerde adezyon moleküllerinin ekspresyonuna yol açar.
- NO'nun endotelial üretimini azaltarak, prostasiklin üretimini artırarak, prostaglandin ve prostaglandin prokürsörlerini stimüle ederek platelet adezyonunu ve agregasyonunu stimüle eder.
- Metalloproteinazların oluşumunu ve ROS oluşumunu arttırırken eNOS gen ekspresyonunu azaltmaktadır (78).

2.4. Homosistein Ve Yapısı

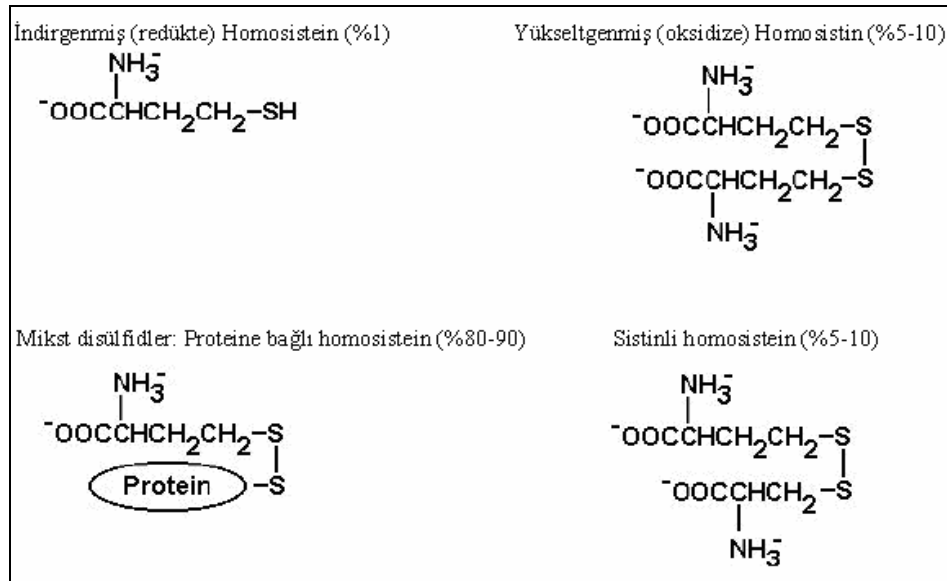
Homosistein (Hcy)(2-amino-4-merkaptobütirik asit), proteinlerin yapısına katılan 20 aminoasit arasında bulunmayan, esansiyel bir aminoasit olan metiyoninin hücre içi demetilasyonu sırasında oluşan ve yapısında kükürt bulunduran esansiyel olmayan bir aminoasittir. İnsan plazmasında Hcy, %70-80'i başta albumin olmak üzere proteinlere disülfid bağları ile bağlı şekilde, % 1 lik bir kısmı serbest Hcy olarak, geri kalan

homosistein ise oksitlenerek dimerler (homosistin) veya sisteinle birleşerek karışık disülfidler şeklinde bulunur (Şekil 8).



Şekil 8. Homosisteinden homosistin oluşumu(79).

Total plazma homosistein bileşenleri ve oranları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (79).



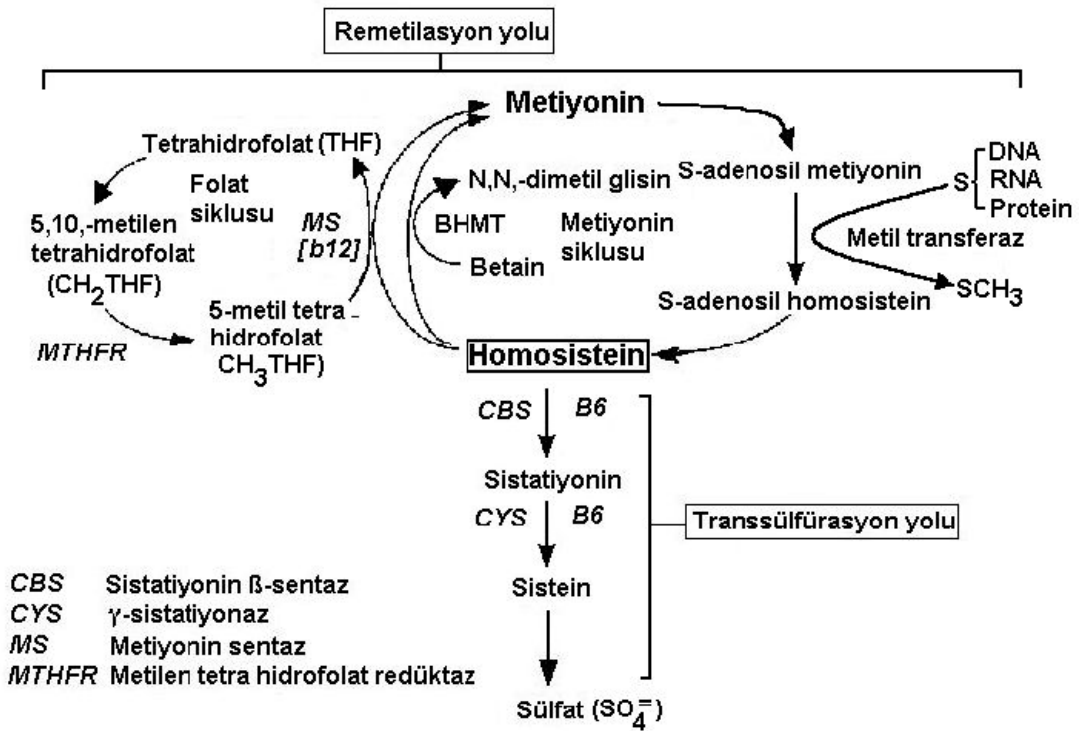
Şekil 9. Total plazma homosistein bileşenleri ve oranları(78).

2.4.1. Homosisteinin Hücre İçine Alınması ve Metabolizması

Homosisteinin hücre içine alınması ile ilgili mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamakla beraber sisteinin de transportunda görev alan taşıma sistemleri üzerinde durulmaktadır. Na^+ bağımlı glutamat ve aspartat taşıyıcısı (X_{AG}), alanin,serin ve sistein taşıyıcısı (ASC) ve alanin taşıyıcısı(A) sistemleri ile Na^+ bağımsız L (büyük dallı

zincirli amino asit) transport sisteminin homosisteinin hücre içine alınmasında rol oynadığı yapılan hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir(80).

Homosistein remetilasyon yoluyla tekrar metiyonine dönüşerek ya da transsülfürasyon yoluyla sistein, metilmalonik ve 2-metilsitrik aside dönüşerek metabolize edilir (81).Tüm hücrelerde bulunan metiyonin, hem protein sentezi hem de S-Adonozilmetiyoninin (SAM) oluşmasını sağlayan bir moleküldür. Metiyoninin ihtiva ettiği metil grubu, SAM'e dönüşümü sırasında aktive olur. Metiyoninin kükürt atomuna ATP'den bir adenozil grubunun bağlanmasıyla SAM molekülü meydana gelir. SAM biçimlenmesi, adenzin 3-fosfat (ATP) ve metiyonin adenozil tranferaz enzimleri (MAT I, II, III) aracılığıyla gerçekleşir. Bu reaksiyonlarla hücre içi SAM miktarı düzenlenir. Adenozil grubunun aktarılmasıyla kükürt atomu pozitif yük ile yüklenir. Bu durum sonucunda kükürt oldukça reaktif bir duruma geçerek içerdiği metil grubu akseptör, substratlarca kolayca transfer edilir. Metil grubu fosfatidil etanolamin (sefalin) akseptör olarak iş gördüğünde alınır ve S-Adenozil homosistein (SAH) oluşur. Bu molekül de daha sonra adenzin ve homosisteine hidrolizlenir (82).Remetilasyon yolunda homosistein kofaktör olarak vitamin B12 (kobalamin)'nin substrat olarak da N⁵-metiltetrahidrofolatın (5-MTHF) kullanıldığı ve metiyonin sentaz enziminin görev yaptığı bir reaksiyonla metillenir ve tekrar metiyonine dönüşür. Bu metabolik yolun substratı olan N⁵-MTHF termolabil MTHFR enziminin katalizlediği bir reaksiyonla N⁵-N¹⁰-metilentetrahidrofolat (MTHF)'tan sentezlenir (83). Karaciğer ve böbreklerde remetilasyon için metil verici olarak betain de kullanılabilir. Betain/Hcy metiltransferaz enziminin katalizlediği reaksiyonla homosistein remetillenerek de metiyonine dönüştürülebilir (84). Transsülfürasyon yolunda ise homosistein, kofaktör olarak vitamin B6'yı (pidoksin) kullanan sistationin beta sentaz (CBS) enzimi aracılığıyla sistationine çevrilir. Sistationin ise vitamin B6'nın kofaktörlüğünde sistationinaz enzimi ile sistein ve α - ketobutirata çevrilir, α -ketobutirat ise 2-metilsitrik asit ve metilmalonik asite parçalanır (85). Homosisteinden metiyonin dönüşümünün ve SAM miktarının azalması, metilasyon reaksiyonlarının isleyişini bozabilir. Nitrik oksit geri dönüşümsüz olarak metiyonin sentaz (MS)'i metilkobalamin (aktif koenzim)'in içerdiği kobaltı okside ederek inaktive eder. Böylece SAM'in biyosentezi engellenir (86). Şekil 10'da homosistein metabolizması şematik olarak gösterilmiştir.



Şeki1 10. Homosistein metabolizması (78).

Homosistein metabolizması, karışık görünmesine rağmen oldukça düzenli bir feed back mekanizmasına sahiptir. Eğer metiyonin dengesi bozulmuşsa ve SAM düşük konsantrasyonda bulunuyorsa, homosistein öncelikle metiyonin oluşumu için MS'nin görev aldığı remetilasyon yoluna yönelir. Homosistein düzeyi yükseldiğinde S-Adenosil homosistein miktarı artar. Çok sayıda metabolik etkilere sahip olan SAH, farklı bağlanma bölgelerinde SAM ile rekabet içindedir ve bu özelliği ile metilasyonu engelleyebilir. Bu nedenle araştırmacılar, SAM/SAH oranı metilasyon döngüsünde indikatör olarak görev alabileceğini düşünmüşlerdir (87). MTHFR enziminin katalizlediği bir reaksiyon sonucu oluşan metiltetrahidrofolat, metiyoninin homosisteine dönüşümünde MS için substrat olması nedeniyle önemli bir işleve sahiptir. Bu yüzden MTHFR'nin, homosistein remetilasyonu üzerinde kuvvetli bir etkisi vardır (88). Plazmadaki homosistein hücreler tarafından salınmaktadır. Farklı hücre tipleri değişik oranlarda homosistein salgılamaktadır. Hepatositler yüksek oranda homosistein salgılamakta, fibroblastlar ve lenfositlerin katkısı daha azdır (89). Homosisteinin katabolizması, sistatyonin sentezi dahil primer olarak ince barsak, karaciğer, böbrek ve pankreasta meydana gelen dönüşümsüz bir yoldur (4).

2.4.2. Plazma Homosistein Düzeyleri ve Hiperhomosisteinemi

Plazmada, total homosisteinin %70'i proteinlere bağlanarak, %25'i disülfid bağı ile birbirlerine bağlanarak (disülfid homosistein) ve %5'i de homosistein tiolacton halinde bulunur. Plazma homosistein düzeyi standardize edilememiş olmakla birlikte, genellikle 5-15 µmol/L düzeyi normal olarak kabul edilmekte ve 16 µmol/L üzerindeki değerler hiperhomosisteinemi olarak kabul edilmektedir (90).

Homosistein metabolizmasında görev alan enzimlerden özellikle CBS, MTHFR ve MS enzimlerinin hatalı veya eksik sentezlenmesi homosisteinemi ve homosisteinüriye neden olmaktadır (91, 92). Kronik böbrek yetersizliği olan hastalarda kreatinin yükselmesine bağlı olarak plazma homosistein konsantrasyonu ortalamanın 4 kat üstüne çıkabilir (93, 94). Homosistein metabolizması için gerekli olan koenzim görevi yapan ve besinle alınan vitamin B12, vitamin B6 ve folat eksikliğinde hiperhomosisteinemiye neden olabilir. Normal kişilerde serum vitamin B12, folat, vitamin B6 konsantrasyonları ile plazma homosistein konsantrasyonu arasında negatif bir ilişki vardır(93, 95, 96). Plazma homosistein konsantrasyonu ile yaş ve cinsiyetin yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (97, 98). Sağlıklı kişilerde homosistein düzeyi yaşamın ilk 40 yılı süresince sabittir. Ancak bu yaştan sonra (özellikle 70 yaşlarında) hızlıca yükselir. Erkeklerde homosistein düzeyi bayanlara göre az da olsa yüksektir. Postmenopozal dönemdeki kadınlarda östrojen destek tedavisinde homosistein düzeyi önemli oranda düşer (99, 100, 101). Metotreksat 6-azauridin, tamoksifen, antikonvulsanlar gibi ilaçlarda plazma homosistein konsantrasyonunu arttırıcı etkiye sahiptir. Ayrıca, sigara kullanımı piridoksal fosfat (vitamin B6) kullanımını antogonize ederek hiperhomosisteinemiye yol açmaktadır (99, 102, 103, 104).

2.4.3. Hiperhomosisteineminin Etkileri ve Hastalıklarla İlişkisi

Homosisteik asit gibi homosistein metabolitleri, glutamaterjik N-metil-D-aspartat reseptörleri üzerinde ekzototoksik etki gösterir. Bu etki, glutamatın etkisinden daha fazla olup, hücre içi Ca^{+2} 'nin artmasına ve proapoptotik proteinlerin aktivasyonu ile de apoptoza neden olur. Homosistein ayrıca SAH metabolize olur. SAH'da, metilasyon reaksiyonlarının inhibisyonu ile nörotoksik bir etki oluşturur. Bu nedenle homosistein düzeyinin artması, nörodejeneratif etkiler için potansiyel bir kaynak olmaktadır (105).

Hiperhomosisteineminin etkilediği birçok aterojenik mekanizmalar vardır. Bunlara; damar duvarının intima tabakasının kalınlaşması, damar intima tabakasındaki düz kas hücre proliferasyonunun uyarılması, damar duvarındaki lipid birikiminin artması, endotelial hücrelerin kopmasının zorlaşması, trombosit ve lökositlerin aktivasyonu, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunun artışı, platelet trombaksan sentezinin aktivasyonu, homosistein oksidasyonu sırasında oluşan oksidatif hasarın artması örnek olarak verilebilir (106).

Mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, homosisteinin çeşitli düzeylerde damar endotel fonksiyon bozukluğuna neden olduğu kabul edilmektedir. Homosistein, faktör V, X ve XII'nin aktivitelerini hızlandırıp, protein C'nin aktivasyonunu baskılayarak, endotelin normal antitrombotik özelliğini değiştirir. Aynı zamanda, endotelde trombomodulin ve heparin sülfat salınımını baskılayarak, doku plazminojen aktivatörleri salınımını uyarır. Böylece protrombotik bir ortam yaratarak trombin oluşumunu hızlandırır (87).

Bunlara ilaveten homosisteinin etkilerini oksidatif hasar yaratarak gösterdiğini ortaya koyan kanıtlar da giderek artmaktadır(107). Homosistein plazmaya katılınca hızlıca disülfid homosistein veya homosistein tiolactona okside olur. Bu reaksiyon sırasında hidrojen peroksit ve süperoksit radikali gibi reaktif oksijen ürünleri oluşur. Oluşan hidrojen peroksit (hidroksil radikali ile), damar endotelinde hasara neden olurken süperoksit radikalleri de, hem endotel hem de LDL partiküllerini etkileyerek lipid peroksidasyonunu başlatır (93, 107, 108). Normal endotel hücreleri, homosisteinin toksik etkilerini ortadan kaldırmak için homosisteini bağlayan NO salgılar. NO'nun bu koruyucu etkisi, endotelin uzun dönemli hiperhomosisteinemiye maruz kalması sonucunda bozulur. Çünkü Hcy, lipid peroksidasyonuna neden olarak endotelial NO salınımını azaltır. Sonuçta, NO'nun endotelial üretimindeki bozulma, endoteli, homosistein kökenli oksidatif hasara maruz bırakır ve endotel fonksiyon bozukluğu ortaya çıkar (93, 108, 109).

Hcy'nin, endotelial hasar oluşturarak ateroskleroza hızlandırmasına ek olarak, damar düz kas hücrelerinin aşırı çoğalmasına neden olduğu da açıklanmıştır (93, 110, 111).

Yapılan çalışmalarda plazma homosisteinin orta derecede artışıının, serebral, koroner ve periferal damar hastalıkları ile ilişkisi olduğu açıklanmıştır (112). Serebrovasküler hastalıklar yanında, homosistein, nörodejeneratif hastalıklarda da önemli rol oynamaktadır (103). Ciddi hiperhomosisteinemi (100 $\mu\text{mol/L}$ 'den daha yüksek düzeyler), inme oluşumuna neden olan tromboembolik ve aterosklerotik olayların erken

ortaya çıkmasına neden olur (113, 114). İnmeli hastalarda plazma homosistein konsantrasyonu ile yaş, kreatinin ve folat konsantrasyonları arasında bir ilişki vardır. Yapılan çalışmalarda plazma homosistein değeri, total anterior sirkülasyon infarktli hasta grubunda, diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur (115, 116).

Bir çalışmada artan Hcy konsantrasyonunun psikoz, ataksi, nöropati ve demanslı hastalarda güç farkedilen vitamin B12 eksikliğinin önemli bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür (103).

Hcy'nin kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olduğu ve her 5 µmol/L'lik artışın kardiyovasküler hastalık riskini erkeklerde 1.35, kadınlarda ise 1.42 kat arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca bu değerler, sigara içen ve hipertansif hastalarda daha yüksek bulunduğundan, özellikle bu hastalarda hiperhomosisteinemi tedavisinin gerektiği vurgulanmıştır (87).

2.4.4. Homosisteinin Etki Mekanizmaları

Hiperhomosisteinemi aterosklerotik damar hastalığı ve aterotrombozis için bağımsız bir risk faktörüdür. Hcy endotelial fonksiyon bozukluğu, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu, lipoprotein oksidasyonunun artışı, platelet aktivasyonu, monosit kemoatraktant protein-1 ve vasküler endotelial büyüme faktörü ekspresyonu, protein kinaz C (PKC)/c-fos sinyal yolunun uyarılmasına sebep olduğu gösterilmiştir.

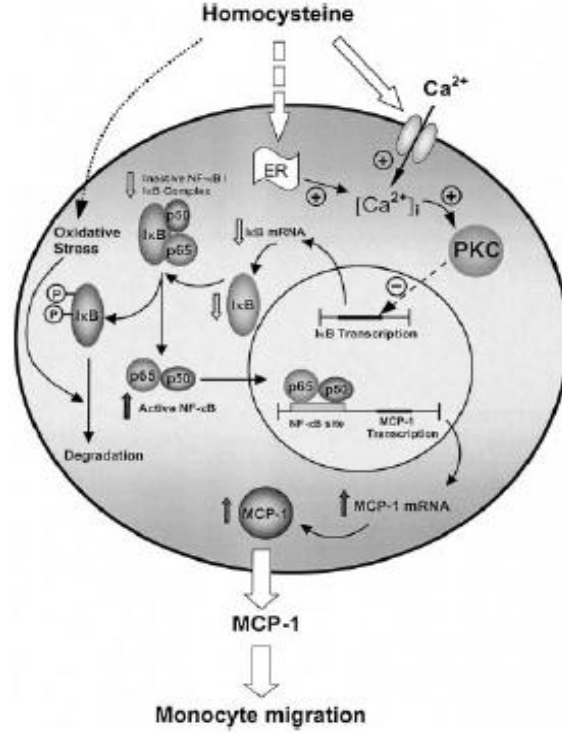
İn vitro çalışmalar Hcy'nin reaktif oksijen türlerinin üretimini ve LDL'nin bakır aracılıklı oksidasyonunu artırdığını göstermektedir. Thampi ve arkadaşları Hcy ile beslenen fareleri normal diyetle beslenen farelerle karşılaştırdıklarında Hcy ile beslenen apoE -/- farelerde plazma OxLDL seviyelerinde artışa bağlı olarak aterosklerotik lezyonlarda ve CD 36 ekspresyonunda bir artış olduğunu gördüler. İn vitro analizler makrofajlarda Hcy'nin 25-50 µM konsantrasyon aralığında LDL oksidasyonunu artırdığını göstermiştir. Diyetle alınan Hcy dolaşımdaki OxLDL seviyesini artırarak aterosklerotik lezyonların oluşumunu tetikler ve artan OxLDL, CD 36 ekspresyonunu düzenler. Üstelik Hcy'nin intrasellüler antioksidan bir enzim olan glutatyon peroksidazı inhibe ettiği ve glutatyon gibi antioksidanların miktarını azalttığı rapor edilmiştir. Bu in vitro raporlar Hcy ile beslenen apoE -/- farelerde reaktif oksijen türlerinin üretiminde anahtar bir rol oynayan NADPH oksidazın arttığını gösteren raporları desteklemektedir. Bu bulgular in vivo olarak NADPH oksidaz aracılığıyla üretilen reaktif oksijen türlerinin, OxLDL üretimine katkıda

bulunabileceğini desteklemektedir. Ayrıca Hcy ile aktifleşmiş endotel hücreleri ile monositlerin etkileşimi monositlerde CD 36 upregülasyonuna sebep olmaktadır(89).

Hcy güçlü bir proinflamatuvar faktördür ve inflamasyonu hem in vivo hem de in vitro olarak tetikler. Li ve arkadaşları insan monositlerinde Hcy'nin oksidatif stres aracılığıyla proinflamatuvar faktörler olan MCP-1 ve IL-8'in ekspresyonunu ve salınımını uyardığını göstermişlerdir. Epidemiyolojik litaretürler sağlıklı ve normal ağırlıklı bireyler ile diyabetik ve obez bireyler karşılaştırıldığında plazma Hcy ve insulin seviyeleri arasında önemli bir ilişki olduğunu bildirmektedir. İn vitro çalışmalar Hcy aracılığıyla uyarılan oksidatif stresin rat hepatoma hücre line'ında insülin sinyallerini bozduğunu göstermiştir. Li ve arkadaşları ilk kez hem in vivo hem de in vitro Hcy'nin adipositlerden resistin ekspresyonunu ve salınımını ROS-PKC-NF-κB yolu aracılığıyla artırdığını ve insülin direncini güçlendirdiğini bulmuşlar. Aynı çalışmada farklılaşmış adipositlerde Hcy'nin insülin direncini uyardığını göstermişler. Hcy ile muamele edilen adipositlerden elde edilen hücre vasatı farklı adiposit ortamına ilave edilmiş ve insülin uyarımlı glukoz alınımında önemli bir azalma görülmüş. Bu da Hcy'nin uyardığı adipokinler aracılığıyla insülin direncini ilerlettiğini göstermektedir. Çeşitli çalışmalarda Hcy'nin endotel hücreler, vasküler düz kas hücreleri ve monosit hücre line ları gibi çoğu hücre tiplerinde kemokin oluşumunu uyardığı gösterilmiştir. Li ve arkadaşları adipoz dokuda plazma konsantrasyonunun 3,1 katı kadar yüksek Hcy biriktiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda Hiper homosisteinemi farelerde oksidatif stresin bir göstergesi olarak hem plazma hem de adipoz doku MDA seviyelerinde bir artış görülmüş. Adipositlerde Hcy'nin intrasellüler ROS'ni artırdığı ve antioksidanlar aracılığıyla inhibe edilen resistin ekspresyonunu uyardığı görülmüş. Primer kültürlenmiş rat adipositleri PKC-γ hariç bütün PKC izoformlarını eksprese ederler. Li ve arkadaşları adipositlerde hem in vivo hem de in vitro şartlarda Hcy'nin PKC'lerin aktivasyonunu önemli bir şekilde uyardığını göstermişlerdir. Süperoksit radikalleri redoks duyarlı proinflamatuvar transkripsiyon faktörü NF-κB'yi aktifleştirir. NF-κB çoğu proinflamatuvar genlerin transkripsiyonunu artırır. Hcy endotel hücrelerinde oksidatif stres aracılığıyla NF-κB'yi aktifleştirir. 3T3-L1 hücrelerinde Hcy rezistin ekspresyonunu artırır. Bu hücrelerde rezistinin aşırı ekspresyonu TNF-α, MCP-1 ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını artırır (4).

Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Hcy'nin vasküler düz kas hücrelerinde MCP-1 ekspresyonunu uyardığını, oksidatif stres aracılığıyla NF-κB'yi aktifleştirdiğini göstermişlerdir. Ayrıca,hücre membranında bulunan kalsiyum (Ca) kanalı aracılığıyla

hücre içine Ca^{+2} girişini uyararak PKC'nin aktifleşmesine katkı sağlandığını ve aktifleşen PKC nin I κ B α ekspresyonunda bir azalmaya sebep olduğunu belirtmişlerdir (117).



Şekil 11. Vasküler düz kas hücrelerinde homosistein uyarımlı MCP-1 ekspresyonunun mekanizması

Yapılan çalışmalarda PPAR'nın proantioksidant olduğu bildirilmiş. PPAR süperoksid dismutaz(SOD), katalaz ve plazminojen aktivatör inhibitörünün mRNA'sını artırır. NADH/NADPH oksidazı azaltır. PPAR agonistleri oksidatif stres, metaloproteinaz aktivitesi ve plazminojen aktivitesini artırır. Yüksek homosistein seviyesiyle PPAR ekspresyonu arasında negatif bir korelasyon olduğu göstermiştir (118).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve malzemeleri üretici firmaları ile birlikte Tablo 2’de listelenmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar, aletler ve malzemeler

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	Marka / Model
Derin dondurucu, -20°C	Vestel
Derin dondurucu, -80°C	Thermo Electron Corporation
Dalga boyu ayarlanabilir ELISA okuyucusu	VERSAmax Molecular Devices
Etüv	Heraeus
Çalkalayıcı	Eppendorf Thermo Mixer Comfort
Hassas analitik terazi	Metler Toledo AB204-S
Manyetik karıştırıcı	Termal
Çeşitli hacimlerde otomatik pipet kullanıldı	Eppendorf
Aspiratörlü pipet	JetPip Pipette Aid
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321
Mikro santrifüj	Thermo EC Micromax Eppendorf 5810
Spektrofotometre	Shimadzu, UV – 1601
Vorteks (Karıştırıcı)	IKA Genius 3
Membran filtreleri	Agilent Econofilter 0.2µm
Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow
İnvert mikroskop	Nikon Eclipse TS100
CO ₂ inkübatör	Thermo Forma 381
Mikro dalga fırın	Altus ALMD 17I
Standart T-25 ve T-75 hücre kültür flaskları	Greiner Cellstar
Hücre kültür pleyti(6 kuyucuklu)	Nulcolone
15 mL’ lik ve 50 mL’ lik steril falkon tüpler	TPP, Greiner
10 mL’ lik steril disposable pipetler	Grenierbio-one, 607 180
Steril DNAaz, RNAaz free pipet uçları	Greiner (0,5-10, 1-200, 100-1000 µL)
Neubauer lamı ve lameli	
0.5 ve 1.5 mL’ lik eppendorf tüpler	Greiner

Tablo 2'nin devamı

Elektroforez tankı	Thermo EC320
Elektroforez güç kaynağı	Thermo EC250-90
Thermocycle	Aplied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
Real Time PCR Cihazı	Roche Light cycler 480 II
Eppendorf Marka mikro küvet okuyucu	Eppendorf Biophotometer
Otoklav	Tuttnauer 3150 ELV
Gel Görüntüleme Sistemi	Gel Logic 200 Imaging System Carestream Health

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 3'te bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmalar, ürün kodları ve bazılarının saflık düzeyleri verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Satın Alındığı Firma, Kodu ve Saflığı
Oil Red O	Sigma, O0625
Formaldehit	Labkim, F.13.93300.21, % 35-40
[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromid(MTT)	Sigma, M2128-1G
Etanol	Merck, 1.00986, absolute
Hidroklorik asit	Carlo Erba, , 7647-01-0, % 37
Metanol	J.T.Barker
Dimetil sülfoksit (DMSO)	ATCC, Cat. No. 4-X-5
Penisilin+Streptomisin	Gibco 15140
Fetal Bovine Serum	Biochrom S0113
Tripsin/ EDTA çözeltisi	ATCC 30-2101
Tripan Blue	Sigma, T8154
DMEM	ATCC, 30-2003
Agaroz	Serva, 11404-250G
Etidyum Bromür	Sigma, E7637-1G
PBS Tablet	Medicago, 09-2051-100
2-Propanol	J.T.Baker, casno: 67-63-0, %99,5
Kloroform	Merck, 1.02431. 2500, ekstra saf
DPEC	Sigma, D5758
İnsulin, from bovine pancreas	Sigma, I6634-50MG
Deksametazon(DEX)	Sigma, D4902-25MG
3-İzobütül-1-metilksantin(IBMx)	Sigma, I5879-250MG
Biotin	Sigma, B4501
DL-Homosistein, minimum 95% titration(Hcy)	Sigma, H4628-1G
Tripure RNA İsolation Reagent	Roche, Cat. No.: 11 667 165 001(200mL)
Reverse Transcription System	Promega, Cat: A3500

3.3. 3T3-L1 Hücre Kültürü

Bütün hücre kültürü çalışmaları hücre kültürü kabininde (air flow kabin) steril ortamda gerçekleştirildi. Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce kabin % 70'lik etil alkol ile silindi. UV ışıktan etkilenmeyen ve kabin içerisinde kullanılacak olan malzemeler kabin içerisine bırakılarak 15 dakika UV ışığa maruz bırakıldı. Çalışma sonunda kabin % 70'lik etil alkol ile tekrar silindi. Kabinin kapağı kapatıldı. Kabin ve hücre kültürü odası 1 saat UV ışığa maruz bırakıldı.

3.3.1. 3T3-L1 Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

3T3-L1 hücrelerinin elde edilmesi ve çoğaltılması deneyinde kullanılan çözeltiler şöyle hazırlandı.

PBS (Phosphate Buffer Solution), 0.01 M, pH 7,4: Beher içerisine 900 mL kadar saf su dolduruldu ve 10 tane PBS tableti behere konularak çözüldü. pH metre ile çözeltininin pH' sı 7,4 e ayarlandı. Çözelti balon jöjeye aktarılarak, saf su ile son hacim 1 L' ye tamamlandı. Otoklavlandıktan sonra hücre kültüründe kullanıldı.

Kullanıma Hazır DMEM: 445 mL DMEM (glukoz içeren) üzerine 50 mL FBS ve 5 mL penisilin eklendi. 50 mL'lik falkon tüplere bölündü. +4 °C'de saklandı.

Çalışmada ATCC (American Type culture collection)'den temin edilen 3T3-L1 embriyonik fibroblast hücreleri (LOT: 58078556) kullanıldı.

1. Kriyovial içinde bulunan 1 mL 3T3-L1 hücreleri azot tankından çıkarıldıktan sonra 37 °C su banyosunda tamamen çözüldü.

2. 3T3-L1 hücreleri (1 mL) 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve hacmi L-Glutaminli, % 10 FBS, % 1 penisilin + streptomisin içeren yüksek oranda (4,5 g/dL) glukoz içeren DMEM besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı.

3. Hücre süspansiyonu 400 g de 5 dakika santrifüj edildi.

4. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı ve hücre çökeleği tüpün ucuna parmak ucuyla vurularak hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırıldı.

5. Sulandırılan hücrenin üzerine istenilen miktarda taze DMEM besiyeri eklendi ve % 5 CO₂ ortamında, 37 °C' de, T-25 ve T-75' lik flasklarda, inkübatörde çoğaltıldı.

3.3.2. 3T3-L1 Hücrelerinin Pasajlanması

Çoğalan hücreler flask yüzeyinin % 70-80' lik kısmını kapladıktan sonra hücre pasajlaması yapıldı.

1. Pasajlama için öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı.

2. 5 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra 25cm² lik flaslara, 1 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Eklenen tripsin 1 dakika hücreler üzerinde gezdirildi ve flaslaklar inkübatörde 2 dakika bekletildi(PBS ile hücrelerin yıkanma amacı ortamdakı tripsinin inhibitörü olan FBS'yi uzaklaştırmaktır).

3. İnkübasyon sonrası 5'er mL % 10 FBS içeren DMEM ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 400 g' de 5 dakika santrifüjlendi.

4. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırılarak sayıldı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra T-25 flaslara uygun sayıda (2 x 10⁵) hücre aktarıldı ve toplam besiyeri hacmi de 5 mL' ye tamamlandı.

3.3.3. 3T3-L1 Hücrelerinin Sayılması ve Canlılık Testi

1. Tripsinizasyon sonrası falkon tüplere toplanan hücrelerin 10 µL' si 10 µL tripan blue ile karıştırılarak karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

2. Karışım pipet ile tekrar karıştırılarak 10 µL alınarak neubauer hematositometre camına aktarıldı.

3. Işık mikroskobu altında 10x objektif kullanarak canlı ve ölü hücreler sayıldı. Ölü hücrelerde işlev görmeyen Na⁺-K⁺ ATPaz pompası nedeniyle boya membran tarafından absorblanmakta ve dışarı atılamamakta, dolayısıyla hücreler mavi renkte görülmektedir. Tripan blue ile boyanan hücrelerden canlı olanlar sarı-yeşil renkte, ölü olanlar mavi renkte görüldü.

4. Mikroskopla bakıldığında hematositometrede 16 küçük karenin dört köşede bulunduğu görülür. Çapraz köşelerde bulunan hücreler sayılır ve mililitredeki canlı ve ölü hücre sayısı sayılan hücre sayısı X seyreltme oranı X 10⁴ bağıntısı kullanılarak hesaplandı (119).

1	1	1	1	0	0	0	0
1	1	1	1	0	0	0	0
1	1	1	1	0	0	0	0
1	1	1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	1	1

Şekil 12. Mikroskopla bakıldığında hematositometrenin görünümü

3.3.4. 3T3-L1 Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması

1. Hücreleri dondurmak için öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı.
2. 5 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra flasklara, 1 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Eklenen tripsin 1 dakika hücreler üzerinde gezdirildi ve flasklar inkübatörde 2 dakika bekletildi.
3. İnkübasyon sonrası 5' er mL % 10 FBS içeren DMEM ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 400 g' de 5 dakika santrifüjlendi.
4. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırılarak sayıldı.
5. Hücre sayısı mililitrede 1.10^6 olacak şekilde %20 FBS içeren DMEM ile seyreltildi ve kriyoviallere 900 μ L bölüştürüldü.
6. Buz üzerine alındı ve son hacminin %10'u olacak şekilde DMSO damla damla eklendi. DMSO eklenirken parmak ucuyla kriyovialler karıştırıldı.
7. Kriyoviallerin kapakları kapatıldıktan sonra 1 saat + 4 °C buzdolabının buzluğunda daha sonra 1 gece - 80 °C de bekletildi. Kısa süre içinde kullanılacak hücreler - 80 °C de saklanmaya devam edildi. Uzun süre kullanılmayacak hücreler azot tankının buharında saklandı.

3.3.5. 3T3-L1 Hücrelerinin Adiposit Farklılaşması

3.3.5.1. Çözeltiler

3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması deneyinde kullanılan çözeltiler şöyle hazırlandı.

DEX Stok Çözeltisi (0,25 M): 49 mg DEX tartıldı, bir miktar DMSO'da çözüldü. Son hacmi DMSO ile 0,5 mL'ye tamamlandı ve ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı.

IBMX Stok Çözeltisi (0,5M): 111,12 mg IBMX tartıldı, bir miktar DMSO'da çözüldü. Son hacmi DMSO ile 1 mL'ye tamamlandı ve ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı.

İnsülin (1 mg/mL): 10 mg insülin bir miktar HCl (pH 2-3) çözeltisinde çözüldü. Son hacmi HCl (pH 2-3) çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlandı ve ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı.

Biotin Stok Çözeltisi (1 mg/mL):20 mg biotin tartıldı, bir miktar 0,1M NaOH çözeltisinde çözüldü. Son hacmi 0,1M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlandı. Ardından 1mg/mL konsantrasyondaki biotin çözeltisinden 200µL alındı ve hacmi 0,1M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlanarak 100 kat seyreltildi. Böylece 10 µg/mL konsantrasyonda ara stok hazırlandı. Hazırlanan her iki biotin stok çözeltileri ependorflara bölünerek -20°C'de saklandı.

Farklılaştırma DMEM'i (2X): 20 µL stok DEX çözeltisi(0,25M) az miktarda %10 FBS içeren DMEM'e eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Üzerine 20 µL stok IBMX çözeltisi(0,5M) eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Karışımın üzerine 200 µL stok insülin çözeltisi(1mg/mL) eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Son olarak 200 µL ara stok biotin çözeltisi(10µg/mL) eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Son hacim %10 FBS içeren DMEM ile 10 mL'ye tamamlandı. Elde edilen farklılaştırma DMEM'i (2X) 0,5 µM DEX, 1 mM IBMX, 20 µg/mL insülin ve 200 ng/mL biotin ihtiva etmektedir.

Konfülie Sonrası DMEM'i (2X): az miktarda %10 FBS içeren DMEM üzerine 200 µL stok insülin çözeltisi(1mg/mL) eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Elde edilen Konfülie Sonrası DMEM'i (2X) 20 µg/mL insülin ihtiva etmektedir.

Olgunlaştırma DMEM'i (2X): 200 µL stok insülin çözeltisi(1mg/mL) 10mL %10 FBS içeren DMEM'e eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Karışımın üzerine 200 µL ara stok biotin çözeltisi(10µg/mL) eklendi ve zaman kaybetmeden hızla vortekslendi. Elde edilen Olgunlaştırma DMEM'i (2X) 20 µg/mL insülin ve 200 ng/mL biotin ihtiva etmektedir.

3.3.5.2. Farklılaştırma işlemi

1. Hücreler sayıldıktan sonra 6 kuyucuklu hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 4 mL besiyeri içinde 1.10^5 hücre ekildi.

2. Kuyucuklarda çoğalan hücreler kuyucuk yüzeyinin % 100' ünü kaplayana kadar besiyeri 2 günde bir değiştirildi. Besiyerlerinin değişimi esnasında kuyucuklardan 2 mL eski besiyeri uzaklaştırıldı(besiyerinin tamamını uzaklaştırmak kuyucuk yüzeyine yapışan hücrelerin kopmasına neden olabileğinden kuyucuk yüzeyine değmeden besiyerinin yarısının uzaklaştırılması tercih edildi. Buna bağlı olarak besiyeri içeriğinin son konsantrasyonu ayarlandı). Üzerine 2 mL yeni besiyeri eklendi. Bu süre yaklaşık 6 gün sürdü.

3. Altıncı günün sonunda kuyucuklardan 2 mL eski besiyeri uzaklaştırıldı. Farklılaştırma yapılacak kuyucuklara son konsantrasyonu 10 µg/mL olacak şekilde insülin içeren konfulie sonrası DMEM'i, farklılaştırma yapılmayacak olan kuyucuklara sadece %10 FBS içeren DMEM eklenerek 48 saat 37 °C' de inkübe edildi.

4. İnkübasyon sonunda (48 saat) 2 mL eski besiyeri uzaklaştırıldı. Yağ hücrelerine farklılaştırılacak hücreleri içeren kuyucuklara 2 mL farklılaştırma DMEM'i, yağ hücrelerine farklılaştırılmayacak hücreleri içeren kuyucuklara 2 mL %10 FBS içeren DMEM eklendi. 48 saat 37 °C' de inkübe edildi. (Not: Farklılaştırma DMEM'i son konsantrasyonları 0,25 µM Dexamethasone, 0,5 mM IBMX, 10 µg/mL insülin ve 100 ng/mL biotin olacak şekilde hazırlandı. 2 mL taze DMEM 2 mL eski DMEM'in üzerine ekleneceğinden konfulie sonrası, farklılaştırma ve olgunlaştırma DMEM'leri hazırlanırken içerikleri 2 kat konsantre hazırlandı.)

5. İnkübasyonunun sonunda (48 saat) 2 mL eski besiyeri uzaklaştırıldı. Yağ hücrelerine farklılaştırılacak hücreleri içeren kuyucuklara 2 mL olgunlaştırma DMEM'i (20 µg/mL insülin ve 200 ng/mL biotin içeren) yağ hücrelerine farklılaştırılmayacak

hücreleri içeren kuyucuklara da 2 mL %10 FBS ihtiva eden DMEM eklendi. Yağ hücrelerinin olgunlaşması işlemi yaklaşık 6 gün sürdü.

3.3.6. Adiposit Boyanması

Olgun adipositlerin boyanması deneyinde kullanılan çözeltiler şöyle hazırlandı:

Oil Red-O Stok Çözeltisi: 0,7 g oil red-o az miktarda 2-propanolde çözüldü. Hacmi 2-propanolle 200 mL'ye tamamlandı ve 1 gece magnetik karıştırıcıda bekletildi. 0,22 µm membran filtreden süzüldü ve + 4 °C de saklandı.

Oil Red-O Çalışma Çözeltisi: 6 mL oil red-o stok çözeltisi 4 mL steril destile su ile karıştırıldı. 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 0,22 µm membran filtreden süzüldü.

% 10 Formaldehit çözeltisi: 27 mL %37'lik formaldehit + 73 mL PBS ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı

% 60 2-propanol Çözeltisi: 60 mL 2-propanol + 40 mL steril saf su ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Çözeltiler hazırlandıktan sonra farklılaşma işlemi uygulanmış hücrelerde TG birikimini görmek için aşağıdaki işlemler sırası ile yapıldı.

1. Olgun adipositlerin bulunduğu kuyucuklardaki besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldı.

2. % 10 luk 2,4 mL formaldehit ile 5 dakika muamele edildi. Eski formaldehit ortamdan uzaklaştırıldı. Yeni % 10 luk 2,4 mL formaldehit ortama eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında bekletildi(bu miktarlar 6 kuyucuklu pleyt için geçerlidir).

3. İnkübasyon sonunda formaldehit uzaklaştırıldı, kuyucuklar % 60'luk 2,4 mL 2-propanol ile yıkandı.

4. Pleytler 37 °C etüvde kuruyana kadar bekletildi.

5. kuyucuklara 1 mL oil red-o çalışma çözeltisi eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

6. Oil red-O ortamdan uzaklaştırıldı ve kuyucuklar dört kez saf su ile yıkandı.

7. Pleytler 37 °C etüvde kurutuldu.

8. 3,6 mL %100 lük 2-propanol kuyucuklara eklendi ve pipetaj yapılarak hücreler tarafından tutulan oil red-o nun 2-propanol fazına geçmesi sağlandı.

9. 1 mL çözelti küvete alındı ve spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda absorbans okundu.

3.3.7. MTT Testi

Homosistein Stok Çözeltisi(10 mM): 67,595 mg Hcy tartıldı, FBS ihtiva etmeyen 5 mL DMEM’de çözüldü ve üzeri DMEM ile 50 mL’ye tamamlandı ve -20°C saklandı. Hcy stok çözeltisi kullanılarak 0, 10, 50, 100, 500, 750 ve 1000 µM konsantrasyonda Hcy çözeltileri DMEM ile seyreltilerek hazırlandı.

MTT([3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)]-2,5-difeniltetrazolyum bromid) Çözeltisi (5 mg/mL): Hcy’nin hücreler üzerine toksik etkisi MTT testi ile değerlendirildi(120). Bu yöntemde canlı hücreler tarafından tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının indirgenmesi özelliğinden yararlanılır. Canlı hücreler mitokondriyal enzimleriyle MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayarak sarı renkli MTT boyası mor renkli formazan ürününe dönüştürülür (Şekil 13). Hücre içerisinde tutulan formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözüldürüldüğünde oluşan renk yoğunluğu 570 nm de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Renk yoğunluğu ortamdaki canlı hücre sayısı ile orantılıdır. MTT testi için aşağıdaki işlemler sırası ile yapıldı.

1. Hücreler sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 200 µL besiyeri içinde 1.10^4 hücre ekildi.
2. Başlangıçtan 24 saat sonra pleyt inkübatörden alındı, içeriği uzaklaştırıldı ve homosisteinin her konsantrasyonu için (0, 10, 25, 50, 100, 500, 750 ve 1000 µM) ayrılmış olan üç welle 200 µL farklı konsantrasyonlarda Hcy eklendi. 72 saat 37 °C’ de inkübe edildi.
3. inkübasyondan sonra sonra pleyt içeriği uzaklaştırıldı ve kağıt peçete üzerine ters çevrilerek vuruldu ve kalan besiyerinin uzaklaştırılması sağlandı.
4. Her kuyucuğa 200 µL DMEM eklendi ve üzerine son konsantrasyonu 0.25 mg/mL olacak şekilde her kuyucuğa 10 µL MTT boyası eklendi.
5. 2 saat 37 °C’ de inkübe edildi.
6. Pleyt içeriği uzaklaştırıldı ve kağıt peçete üzerine ters çevrilerek vuruldu ve kalan içerik uzaklaştırıldı.
7. Her kuyucuğa 200 µL DMSO eklendi ve pleyt 20 dakika çalkalayıcıda bekletildi.
8. İvert mikroskop altında kristallerin tamamen çözünüp çözünmediği kontrol edildi.

9. Mor renk şiddetinin absorbanı ELISA okuyucusunda 570 nm dalga boyunda 620 nm referans dalga boyuna karşı okundu. Her homosistein konsantrasyonu için elde edilen absorban değerinin kontrol absorban değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı hesaplandı.

3.4. Hcy'nin 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşması Üzerine Etkisinin İncelenmesi

3.3.4.2. farklılaştırma işlemi başlığı altındaki ilk dört madde aynen tekrarlandı. Daha sonra aşağıdaki işlemler uygulandı.

5. Hcy'nin 0, 10, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında çözeltileri olgunlaştırma çözeltisi içerisinde hazırlandı.

6. Hcy her konsantrasyonu için farklılaştırma başlatılan üçer kuyucuk, farklılaştırma başlatılan ancak ilaç uygulanmayan üç kuyucuk ve farklılaştırma DMEM'i kullanılmayan yani farklılaştırılmayan üç kuyucuk kullanıldı. Farklılaştırma İnkübasyonunun sonunda (48 saat) 2 mL besiyeri uzaklaştırıldı. Hcy için ayrılan kuyucuklara farklı konsantrasyonda 2 mL Hcy içeren olgunlaştırma DMEM'i, Hcy uygulaması yapılmayan üç kuyucuğa 2mL olgunlaştırma DMEM'i ve farklılaştırma yapılmayan (kontrol) kuyucuğa 2mL % 10 FBS içeren DMEM eklendi.

7. 48 saat sonra 2 mL besiyeri uzaklaştırıldı. Farklılaştırma başlatılan kuyucuklara olgunlaştırma DMEM'i, kontrol kuyucuğuna 2 mL % 10 FBS içeren DMEM eklendi. Yağ hücrelerinin olgunlaşması işlemi yaklaşık 6 gün sürdü. Olgunlaştırma işlemi süresince besiyerleri iki günde bir değiştirildi.

8. İnkübasyon sonunda wellere adiposit boyama protokolü uygulandı ve absorbanlar ölçüldü.

3.5. Hcy'nin 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaştırılması Esnasında CD 36 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi

3.4. Hcy'nin 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması üzerine etkisinin incelenmesi başlığı altındaki ilk yedi madde aynen tekrarlandı. İnkübasyon sonunda RNA izolasyonu yapıldı.

3.6. RNA İzolasyonu

Olgun adipositlerden RNA izolasyonu TriPure Isolation Reagent (Roche) kullanılarak yapıldı. Bu işlemlerde kullanılan malzemeler sterilildi ve DPEC'li su ile yıkandı.

1. Kuyucuklardan besiyerleri uzaklaştırıldı.
2. Kuyucuklara 1mL TriPure Isolation Reagent eklendi ve pipetajla iyice karışması sağlandı.
3. Elde edilen içerik hacminin iki katı hacme sahip polipropilen santrifüj tüpüne alındı.
4. Homojenize örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek nükleoproteinlerin ayrılması sağlandı.
5. Her örneğin üzerine 0,2 mL kloroform eklendi, ağzı kapatıldı. 15 saniye karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
6. Çözelti 12000 g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Üç faza ayrıldı.
7. En üstteki faz ayrı polipropilen tüpe alındı ve üzerine 0,5 mL izopropil alkol eklendi, ağzı kapatıldı ve 10-20 s vortekslendi.
8. Oda sıcaklığında 7 dakika bekletilerek RNA çökeleği oluşması sağlandı.
9. Çökeleğin ayrılması için 12000 g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi ve ardından süpernatant atıldı.
10. 1 mL %75'lik etanol tüpe eklendi ve vortekslendi.
11. 7500 g'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
12. Tamamen kurumasına müsade edilmeden fazla etanol uzaklaştırıldı.
13. RNA pelleti Dietil piro karbonatlı (DPEC) su ile pipetaj yapılarak tekrar çözüldü ve 55°C'da 10-15 dakika bekletildi.
14. Elde edilen RNA örnekleri 1/25 oranında (2µL RNA + 48 µL DPEC'li su) DPEC'li su ile seyreltilerek 260/280 nm'de konsantrasyonları ve absorban oranları belirlendi. (Elde edilen RNA'nın saflığı 260/280 absorban oranına bağlıdır ve iyi bir RNA izolasyonu için bu oranın 1.6-1.9 arasında olması gerekir.)
15. RNA örnekleri % 0,8'lik agaroz jelde yürütüldü.
16. RNA örneklerinden Reverse Transkripsiyon ile cDNA elde edildi.

3.7. RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

RNA izolasyonu sonunda elde edilen RNA örnekleri % 0,8'lik agaroz jelde yürütüldü ve elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı ve görüntü kaydedildi. Jel hazırlanmasında kullanılan çözeltiler şöyle hazırlandı:

1N NaOH çözeltisi: 4g NaOH 70-80 mL deiyonize suda çözüldü ve hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı. TAE elektroforez tamponunun pH ayarlanmasında kullanıldı.

Stok TAE (Tris-asetikasit-EDTA) elektroforez tamponu: 242 g Tris, 37,2 g Na₂EDTA.2H₂O₂ bir miktar deiyonize suda çözüldü ve üzerine 57,1 asetik asit ilave edildi. 1N NaOH ile pH 8,5'a ayarlandı ve son hacim 1L'ye tamamlandı. Bu çözelti 50 kat seyreltilerek, hem elektroforez tamponu olarak, hem de agaroz jelin hazırlanmasında kullanıldı.

Etidium Bromür Çözeltisi: 100 mg etidium bromür 10 mL deiyonize suda çözüldü (10mg/mL). Işıktan korunarak buzdolabında saklandı.

% 0,8'lik agaroz jel hazırlanması: 0,4 g agaroz 50 mL TAE (tris-asetikasit-EDTA) tamponunda kaynatılarak çözüldü. Elde edilen jel biraz soğutulduktan sonra 10 µL etidium bromür eklendi ve tarak yerleştirilmiş jel kabına döküldü. Jel tamamen donduktan sonra jel elektroforez tankına yerleştirildi.

% 2'lik agaroz jel hazırlanması: 0,8 g agaroz 40 mL TAE (tris-asetikasit-EDTA) tamponunda kaynatılarak çözüldü. Elde edilen jel biraz soğutulduktan sonra 10 µL etidium bromür eklendi ve tarak yerleştirilmiş jel kabına döküldü. Jel tamamen donduktan sonra jel elektroforez tankına yerleştirildi.

RNA numunelerinin Jele Yüklenmesi: Her bir örneğe ait 5 µL RNA numunesi 2,5 µL yükleme tamponu ile karıştırıldı ve elektroforez tankındaki jele kuyucuklara zarar vermeden yüklendi ve 80 voltta 1 saat jelde yürütüldü. Yürütme işleminin sonunda elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı ve kaydedildi (şekil 15).

3.8. Reverse Transcriptase-PCR ile RNA dan cDNA Elde Edilmesi

cDNA elde etmek için Promega (catalog no: A3500, promega corporation, Madison, WI,USA) ticari RT-PCR kiti kullanıldı ve aşağıdaki işlemler sırası ile uygulandı. Oligo (dT) 15 primer kullanıldı.

1. Aşağıda listelenen reaktifler belirtilen miktarlarda eklenerek 20 μL 'lik reaksiyon ortamı hazırlandı.

Tablo 4. RNA örneklerinin reverse transcriptase-PCR işlemine hazırlanması

Reaktifler	Hacim	50 örnek için hacim
25 mM MgCl_2	4 μL	200 μL
RT 10x tampon	2 μL	100 μL
dNTP karışımı 10mM	2 μL	100 μL
Recombinant RNAaz inh.	0,5 μL	25 μL
Enzim(AMV) Rev.Tr.	0,7 μL	35 μL
Oligo(dT) ₁₅ primer	1 μL	50 μL
Son konsantrasyonu 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ toplam RNA	2 μL	
Nükleaz free su	7,8 μL	380 μL

2. Hazırlanan reaksiyon ortamına aşağıdaki protokol uygulandı. Elde edilen cDNA örnekleri -80 $^{\circ}\text{C}$ Real-Time PCR yapılana kadar saklandı.

Tablo 5. Reverse transcriptase-PCR protokolü

Sıcaklık $^{\circ}\text{C}$	Dakika	Amacı
42	15	
95	5	
4	5	Alfalfa mozaik alfavirus(AMV) Rev.Tr. inaktive etmek ve cDNA'ya bağlanmasını engellemek

3.9. Real Time PCR

PCR ürünlerinin üretimi SYBR Green floresans sinyalinin ölçülmesi ile tayin edildi. SYBR Green DNA çift sarmalındaki küçük ve büyük oyuklara girer. Çözeltideki bağlanmamış boya çok düşük floresans ışımaya yapar. Ancak SYBR Green'in DNA'ya bağlanması arttıkça 530 nm dalga boyunda floresans ışımaya yükselmektedir. PCR süresince SYBR Green floresans ışımadaki artış direkt olarak üretilen çift zincirli DNA oranına bağlı olarak artmaktadır(121). Real Time PCR işlemi Roche LightCycler 480 II marka cihazda katalog no: 11782-200/01K olan invitrogen Universal EXPRESS SYBR GreenER qPCR SuperMixes and Two-Step qRT-PCR kiti kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda yapıldı. Bu kit yüksek performans, güvenilir, verimlilik ve düşük kontaminasyon riskine sahiptir. Bu kit kullanılırken ek olarak cDNA ve PCR primerlerine ihtiyaç vardır. Tablo 6 da Real Time PCR'da kullanılan primer dizileri verildi.

Tablo 6. Real Time PCR'da kullanılan primer dizileri(122).

Primer adı	Primer sırası	Ürün	
β-aktin	forward	5'-GAG ACC TTC AAC ACC CC- 3'	199 bp
	reverse	5'-GTG GTG GTG AAG CTG TAG CC- 3'	
CD 36	forward	5'- GAT GTG GAA CCC ATA ACT GGA TTC AC- 3'	98 bp
	reverse	5'- GGT CCC AGT CTC ATT TAG CCA CAG TA- 3'	

3.9.1. Real Time PCR Protokolü

1- Amplifikasyonun(Büyütme) başlangıcında, reaksiyon karışımı denatüre DNA'yı, primerleri ve SYBR Green boyasını içerir.

2- Primerlerin annealingi(PCR'da DNA'ların çoğaltılması aşamasında kullanılan termo cycle'daki birinci aşama). Bu aşamada primerlerin ortamda bulunan hedef DNA komponenti ile birleşmesi ve tekrar ayrışması olayı sonrasında, çok az boya molekülü çift zinceye bağlanabilir. DNA'ya bağlanma sonucunda uyarıya bağlı olarak SYBR Green moleküllerinin ışığı yaymasında önemli bir artış olur.

3- Elongasyon (Uzama) sürecinde, daha çok boya yeni sentezlenen DNA'ya bağlanır. Gelecek ısıtma döngüsü için DNA denatürasyonuna bağlı olarak boya molekülleri salınırlar ve flouresans ışıma sinyali düşer.

4- Her PCR döngüsünün elongasyon basamağının sonunda flouresans ışık şiddeti ölçümü amplifiye olmuş DNA'nın miktarındaki artışı monitörden izleyebilmek için yapılır. Sadece istenen PCR ürününün amplifiye olduğundan emin olmak için erime eğrisi analizi PCR'dan sonra yapılabilir. Erime eğrisi analizinde reaksiyon karışımı yavaşça 95 C⁰'ye kadar ısıtarak çift zincirli DNA eritilir ve SYBR Green I flouresansındaki sürekli azalış tespit edilir. Flouresans ışık şiddetindeki bu azalış erime piki olarak monitörden görülebilir. Her bir erime piki DNA ürün partikülünün karakteristik erime sıcaklığını(T_m) gösterir. T_m sıcaklığında DNA'nın %50'si çift zincirli %50'si tek zincirlidir.

cDNA'ları oluşturulan her bir örnek için Tablo 7'deki gibi pipetlemeler 96 kuyucuklu LightCycler pleyte yapıldı. 5 s'lik spindown işlemi gerçekleştirildikten sonra LightCycler 480 II (Roche, Germany) cihazında Tablo 8'deki program eşliğinde Real Time PCR yapıldı (121).

Tablo 7. Örneklerin Real Time PCR için hazırlanması

Eklenecek Reaktifler	1 örnek için hacim	40 örnek için hacim
SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal	10 µL	400 µL
10 µM forward primer (500 nM final)	1 µL	40 µL
10 µM reverse primer (500 nM final)	1 µL	40 µL
Nükleaz free su	3 µL	120 µL
cDNA(her örnek için)	5 µL	

Tablo 7'de verilen miktarlar kullanılarak beta aktin, CD 36 için ayrı ayrı reaksiyon karışımı hazırlandı. Roche LightCycler 480 II marka qPCR cihazının özel pleytine her bir örnek için beta aktin, CD 36 PCR karışımı üç farklı kuyucuğa 15 µL pipetlendi. Beta aktin, CD 36 kuyucuklarına her örneğe ait cDNA örneklerinden 5 µL ilave edilerek toplam hacim 20 µL'ye tamamlandı. Her örneğe ait cDNA yüklendikten sonra pleytin üzeri özel cover ile iyice kaplandı. Pleyt kısa süreli santrifüjlendikten sonra Roche LightCycler 480 II marka

qPCR cihazına yerleştirildi. Aşağıdaki tabloda verilen üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda qPCR programı cihaza programlandı ve PCR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 8. Real Time PCR protokolü

Program	Döngü	Analiz Modu	
Ön inkübasyon	1	-	
Amplifikasyon	50	Kantifikasyon	
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrileri	
Soğutma	1	-	
Hedef Sıcaklık (°C)	Elde Etme Modu	Süre(hh:mm:ss)	Sıcaklık Artış Hızı (°C/s)
Ön inkübasyon			
95	-	00:05:00	4.4
Amplifikasyon			
95	-	00:00:10	4.4
Primer Tm	-	00:00:10	2.2
dakikada 5 °C			
72	Tek	00:00:10	4.4
Erime Eğrisi			
95	-	00:00:05	2.0
65	-	00:01:00	2.0
97	Devamlı (5–10 acquisitions per °C)		
Soğuma			
40	-	00:00:10	2.0

3.9.2. Örneklerin Real Time PCR Sonuçlarının Hesaplanması

Real-Time PCR işlemi esnasında pozitif kontrol örneğine ait beş farklı konsantrasyonda (1.10^6 , 1.10^5 , 1.10^4 , 1.10^3 , 1.10^2) cDNA örneği beta aktin primeri ile PCR

işlemine tabi tutuldu. Bir standart grafiği oluşturuldu. Her kuyucuktaki örneğin konsantrasyonları standart grafiğinden faydalanılarak hesaplandı. Her örneğin CD 36 gen ekspresyonu konsantrasyonu değeri aynı örneğin beta aktin konsantrasyonuna oranlandı. Elde edilen değerler 100 ile çarpılarak her örnek için CD 36 gen ekspresyonu yüzdesi hesaplandı ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

3.10. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

Real-Time PCR sonunda elde edilen PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütüldü ve elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına atıldı ve görüntü kaydedildi. Jel ve kullanılan çözeltiler 3.7.'de verildiği gibi hazırlandı.

Real Time PCR ürünlerinin jele yüklenmesi: Her bir örneğe ait 5 µL PCR ürünü 2,5 µL yükleme tamponu ile karıştırıldı ve elektroforez tankındaki jele kuyucuklara zarar vermeden yüklendi ve 80 voltta 1 saat jelde yürütüldü. Yürütme işleminin sonunda elde edilen jel görüntüsü dijital görüntüleme sistemi kullanılarak bilgisayar ortamına aktarıldı ve görüntü kaydedildi.

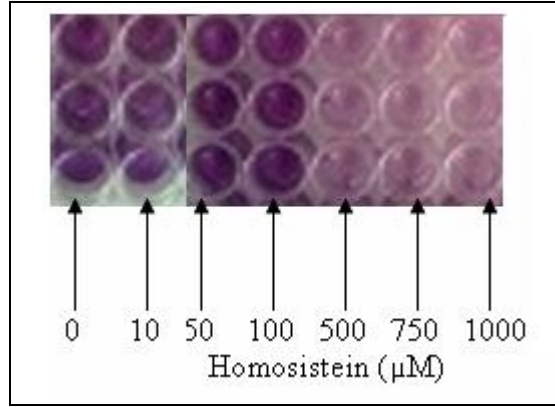
3.11. İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler ortalama \pm SD cinsinden verildi. Gruplar arasındaki farklılık eşleştirilmiş örnekler t testi kullanılarak tespit edildi. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hcy'nin 3T3-L1 Hücreleri Üzerine Toksik Etkisi

Hücre kültürü deneyinde kullanılacak Hcy için en uygun dozların belirlenmesi için MTT testi yapıldı (Şekil 13).



Şekil 13. MTT testi pleyt görüntüsü

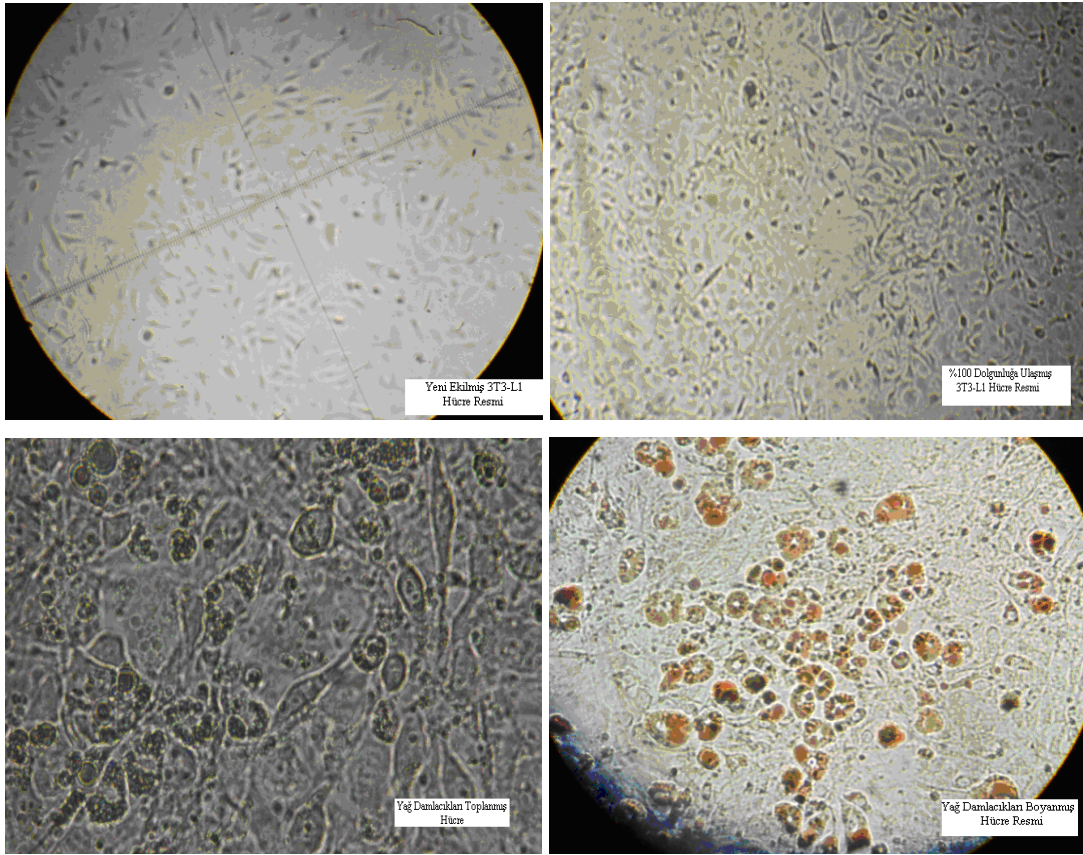
MTT testi sonunda farklı homosistein konsantrasyonlarına karşılık elde edilen % canlılık sonuçları tablo 9'da verildi. Elde edilen bu sonuçlara göre deneylerde 0, 10, 50, 100 µM konsantrasyonlarda homosistein kullanılmasına karar verildi.

Tablo 9. Homosisteinin 3T3-L1 hücreleri üzerine toksik etkisi(% canlılık testi)

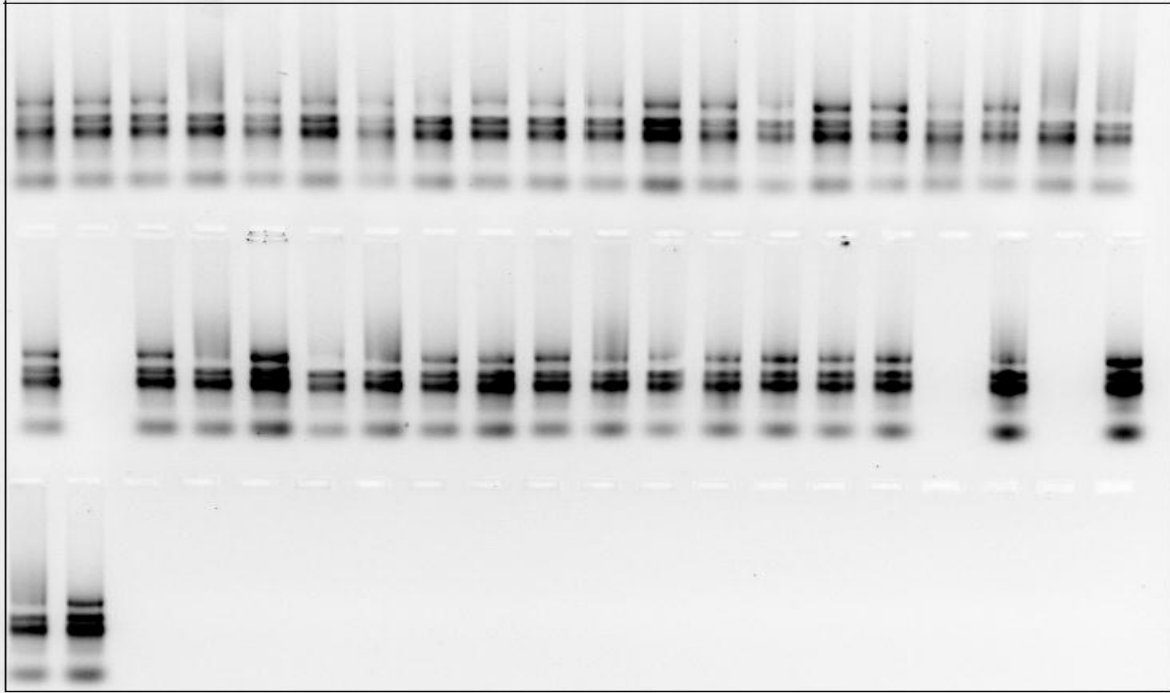
n	3	3	3	3	3	3	3
Hcy(µM)	0	10	50	100	500	750	1000
% canlılık	100	97	116	84	54	40	53

4.2. 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşması

Deneylere başlamadan önce standart protokol uygulanarak 3T3-L1 hücre serisinin yağ hücrelerine dönüşümünün belirlenmesi için yaptığımız deneylerde, farklılaşmanın %80 civarında gerçekleştiği tespit edildi. Hücrenin ekiminden 24 saat sonra, konflue olduğunda, yağ hücrelerine dönüştüğünde ve yağ hücrelerinin Oil Red O ile boyandığı zamanlara ait mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 14’de verildi.



Şekil 14. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma sürecinde elde edilen mikroskop görüntüleri



Şekil 15. RNA örneklerinin Jel görüntüsü

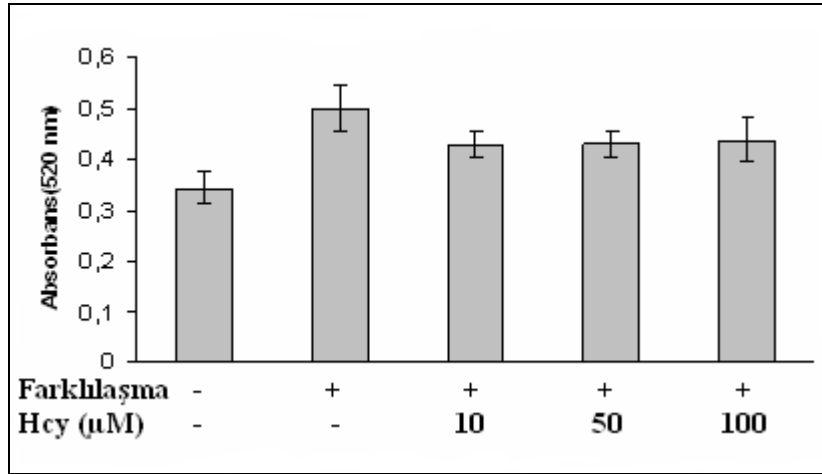
4.3. 3T3-L1 Hücrelerinin Yağ Hücrelerine Farklılaşması Üzerine Hcy'nin Etkisinin İncelenmesi

Homosisteinin 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla deney sonunda her kuyucukta bulunan yağ hücresine farklılaşmamış hücreler ve farklılaşmış olgun yağ hücreleri Oil Red O boyası ile boyandı ve 520nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri ortalama±standart sapma (ort±SD) şeklinde tablo 10'de verildi. Ort±SD değerleri aynı zamanda şekil 16'da bar grafiği şeklinde gösterildi.

Tablo 10. 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması üzerine homosisteinin etkileri.

n	4	4	4	4	4
Farklılaşma	-	+	+	+	+
Hcy(μ M)	-	-	10	50	100
Absorbans (Ort±SD)	0,344±0,031	0,500±0,047	0,428±0,026	0,429±0,026	0,438±0,043

Yağ hücrelerine farklılaşmamış hücreler ile farklılaşmış olgun yağ hücreleri Oil Red O boyası ile boyandıktan sonra elde edilen ortalama absorbans değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,05$). Farklı konsantrasyonlarda Hcy uygulanan hücreler Hcy uygulanmayan hücrelerle karşılaştırıldığında Hcy'nin farklılaşmayı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı bulunmuştur ($P<0,05$). Ortalama absorbans değerlerine ait bar grafiği şekil 16'de verilmiştir.



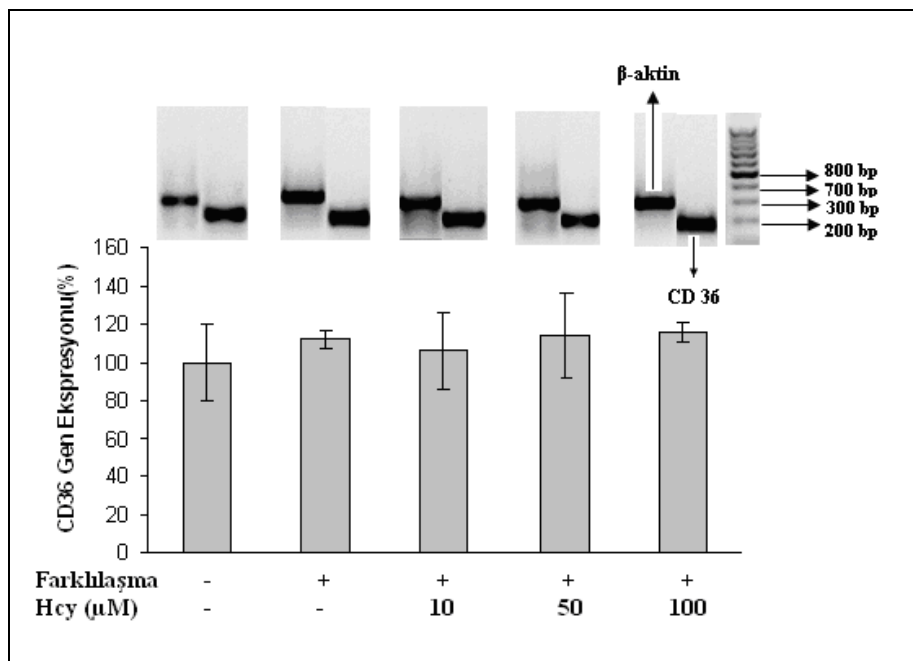
Şekil 16. 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması üzerine homosisteinin etkileri

4.4. 3T3-L1 Hücrelerinden Yağ Hücrelerine Farklılaşmış Olgun Adipositlerde Hcy'nin CD 36 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Homosistein ile muamele edilen 3T3-L1 hücre serisinde olgun adipositlerde her örneğin CD 36 gen ekspresyonu aynı örneğin beta aktin ekspresyonu ile oranlandı. Elde edilen değerler 100 ile çarpılarak her örnek için CD 36 gen ekspresyonu yüzdesi hesaplandı ve CD 36 gen ekspresyonu % cinsinden ifade edildi.

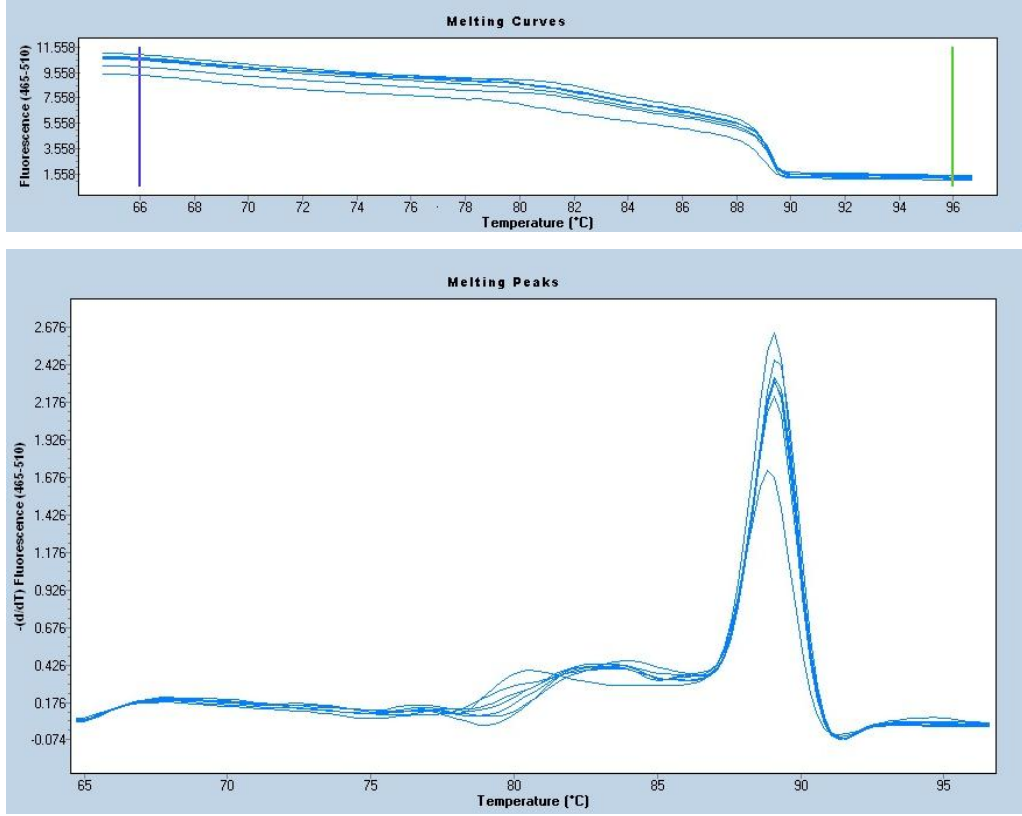
Tablo 11. Yağ hücrelerine farklılaşmış olgun adipositlerde homosisteinin CD 36 gen ekspresyonu üzerine etkileri

n	3	3	3	3	3
Farklılaşma	-	+	+	+	+
Hcy(μ M)	-	-	10	50	100
Artış Oranı	0	11	6	14	16
Alt değerler	83,60	106,43	85,73	94,43	112,37
Üstdeğerler	123,70	116,77	126,29	139,25	121,79

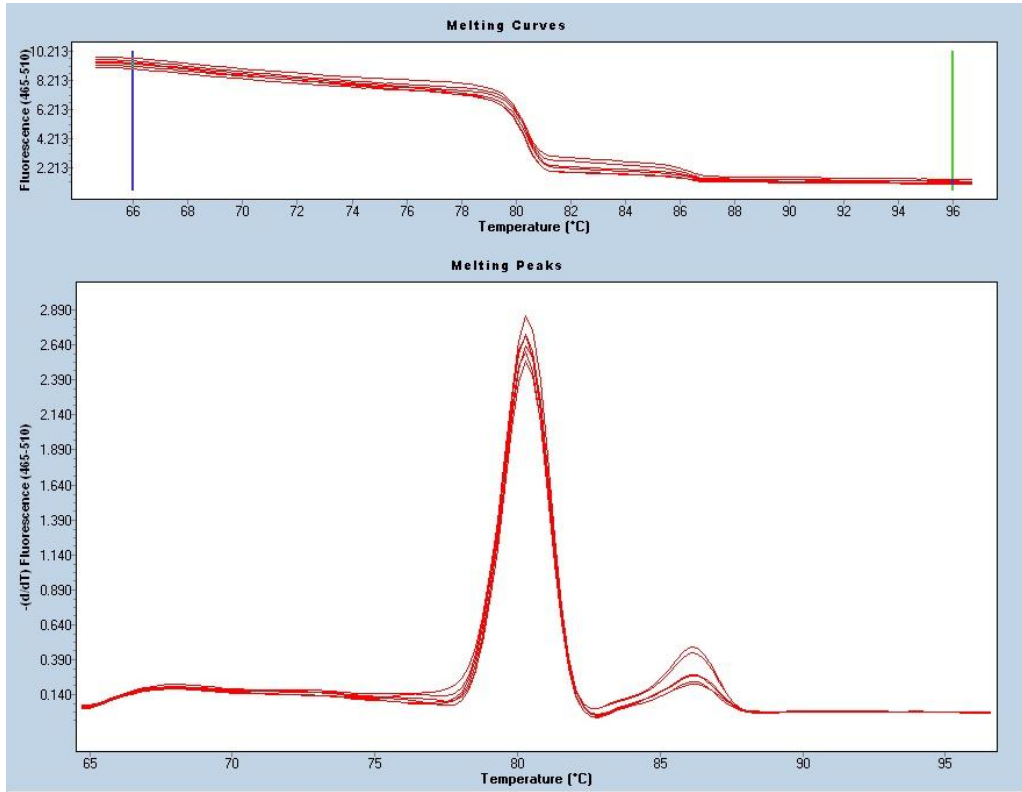


Şekil 17. Deney gruplarındaki β -aktin ve CD 36 PCR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü ve CD 36 gen ekspresyonun % cinsinden ortalama değerlerinin bar grafiği

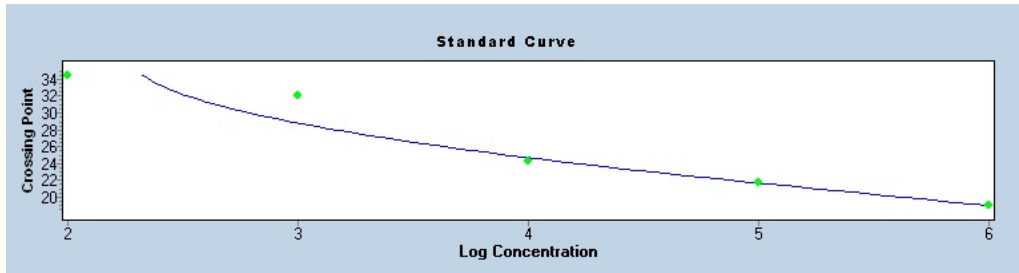
Yağ hücrelerine farklılaşmamış 3T3-L1 hücreleri ile Hcy uygulanan farklılaşmış olgun yağ hücreleri real-time PCR sonrası % CD 36 gen ekspresyonu açısından karşılaştırıldı. % CD 36 gen ekspresyonunda az miktarda bir artış görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Farklı konsantrasyonlarda Hcy uygulanan yağ hücrelerine farklılaşmış olgun yağ hücreleri kendi içinde karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). CD 36 gen ekspresyonu değerleri $\% \pm SD$ cinsinden tablo 10'da verilmiştir. Ayrıca deney gruplarındaki PCR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü ve CD 36 gen ekspresyonun % cinsinden ortalama değerlerinin bar grafiği şekil 17'de verilmiştir.



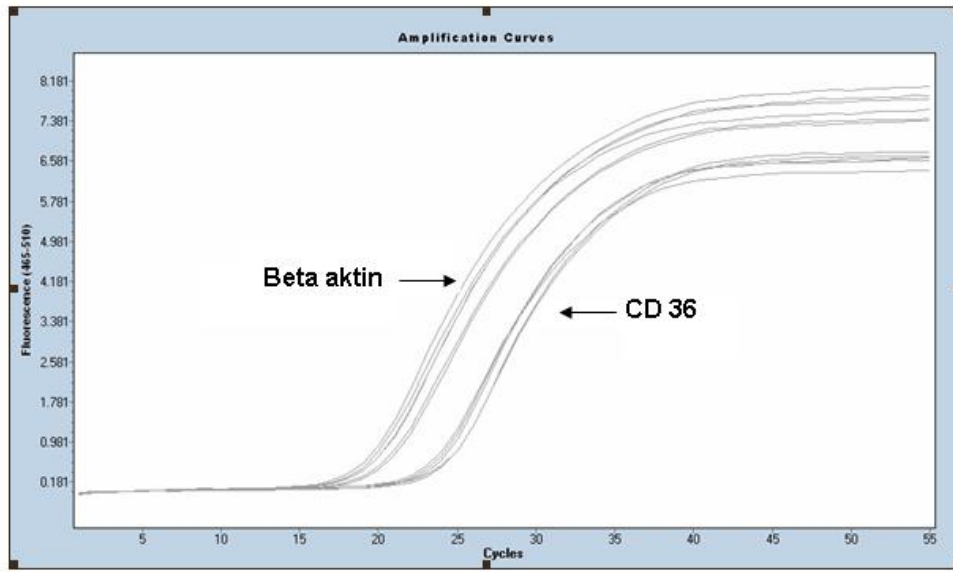
Şekil 18. Örneklere ait Beta Aktin melting eğrisi



Şekil 19. Örneklere ait CD 36 melting eğrisi



Şekil 20. PCR Standart grafiği



Şekil 21. Beta aktin, CD 36 amplifikasyon eğrisi

5. TARTIŞMA

Adipoz doku adipokinler olarak adlandırılan biyoaktif peptidlerin sentezlendiği ve salgılandığı, fazla enerjinin trigliseridler şeklinde depolandığı vücudun en büyük enerji deposudur. Enerji metabolizmasını düzenleyen fizyolojik ve patolojik proseslerin bir kısmında aktif bir rol oynar. Bu nedenle adipositler obezite, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar için potansiyel terapötik hedef gösterilmektedir(123).

İn vivo modellerin yanı sıra in vitro olarak primer yağ hücresi kültürü ve yağ hücresine farklılaşabilen çeşitli hücre serileri hem olgun yağ hücresinin, hem de yağ hücresine farklılaşma sürecinin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında yoğun olarak kullanılmıştır. Bilinen birçok preadiposit hücre dizileri mevcut olmasına rağmen en iyi şekilde karakterize edilen ve moleküler çalışmalarda en çok kullanılan 3T3-L1 hücre serisidir (11).

Sınıf B çöpçü reseptörü olan CD 36, 88 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. CD 36 plateletlerde, monositlerde, makrofajlarda, kapiller endotel hücrelerinde ve adipositlerde sentezlenir. CD 36 aktarılmış insan epitelial böbrek hücreleri ile yapılan çalışmalarda, CD 36'nın özgül olarak OxLDL bağlama kapasitesini ilk defa ortaya koyarak CD 36'nın bir okside lipoprotein reseptörü olduğunu göstermişlerdir (29).

Adipositler hiperkolesterolemik koşullar altında CD 36 aracılığıyla dolaşımdan OxLDL'leri alır ve azaltırlar. Bu özelliğinden dolayı adipoz doku dolaşımdaki kolesterol için bir 'tampon havuzu (buffering pool)' olarak düşünülmektedir. Bu durum çoğu araştırmacı tarafından adipositlerin aterosklerozun tedavisinde potansiyel bir hedef olarak görülmesine neden olmuştur (124).

Homosistein kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörüdür. Homosisteinin endotelial fonksiyon bozukluğu, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu, lipoprotein oksidasyonunun artışı, platelet aktivasyonu gibi olaylarda rol oynadığı gösterilmiştir. Obez insanlarda serum Hcy seviyelerinin arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (125). Ancak Hcy ile yağ dokusundaki CD 36 arasındaki

ilişkiyi inceleyen çalışma henüz yapılmamıştır. Yaptığımız bu çalışmada birçok patolojik olayla ilişkisi olan Hcy'nin yağ dokusuna OxLDL alınımını düzenleyen CD 36 ekspresyonuna etkisi hücre kültürlerinde incelenmiştir. Bir çalışmada human monocytes/macrophages (THP-1) hücrelerinin 200 μ M Hcy ile 72 saat inkübasyonu sonucu CD 36 ekspresyonunun kontrol grubuna göre % 141.2 arttığı bulunmuştur(88). Başka bir çalışmada Hcy ile beslenen fareleri normal diyetle beslenen farelerle karşılaştırdıklarında Hcy ile beslenen apoE -/- farelerde plazma OxLDL seviyesinin arttığını buna bağlı olarak da aterosklerotik lezyonlarda ve CD 36 ekspresyonunda bir artış olduğu görülmüştür. İn vitro analizler makrofajlarda Hcy'nin 25-50 μ M konsantrasyon aralığında LDL oksidasyonunu artırdığını göstermiştir. Diyetle alınan Hcy dolaşımdaki OxLDL seviyesini artırarak aterosklerotik lezyonların oluşumunu tetikler ve artan OxLDL, CD 36 ekspresyonunu düzenler. Ayrıca Hcy ile aktifleşmiş endotel hücreleri ile monositlerin etkileşimi monositlerde CD 36 upregülasyonuna sebep olmaktadır(89).

Çalışmamızda ATCC'den temin edilen 3T3-L1 hücreleri (LOT: 58078556) kullanıldı. Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin uygun sayıda ekilmesi önemli bir noktadır. Örneğin 25cm² lik bir flaska ATCC tarafından 70.10³ 3T3-L1 hücre ekilmesi tavsiye edilmektedir. Eğer bu sayının iki üç katı hücre ekersek hücrelerin beklenenden daha kısa bir zamanda konfüliye olduğu görülür. Konfüliye olan 3T3-L1 hücreleri çoğalma özelliğini kaybederler. Bu hücreler bir sonraki pasajlanmalarında buldukları ortamın zeminine tutunamaz ve ayrılırlar. Dolayısıyla 3T3-L1 hücreleri ekimi esnasında hücrelerin doğru sayılmasına ve hücrelerin temin edildiği firmanın tavsiyesi doğrultusunda uygun sayıda hücre ekilmesine özen gösterilmelidir.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan malzemelerin mümkün mertebe çalışmanın bütün aşamalarında aynı lot numaralı ve aynı firmaya ait olmasına dikkat edilmeli. Bu durum çalışmanın standardizasyonu için çok önemlidir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan su steril, deiyonize ve 17.800-18.100 M Ω -cm arasında özdirence sahip olmalıdır. Besiyerinin değiştirilmesi esnasında hücrelere rahatsızlık verilmemeli. Örneğin kullandığımız pipetin ucunu hücrelere dokundurmamalıyız. Besiyerini pipetlerken kuyucukların yan cidarından yavaş yavaş eklemeli ve hücrelerin zeminden ayrılmasına müsaade etmemeliyiz. Farklılaşmış yağ hücrelerinin boyanması esnasında boya çözeltisinin hücre yüzeyini kaplaması ve pleytin yan cidarının boya maddesi ile temas etmemesine özen gösterilmelidir. Daha önce yapılan bir çalışmada 100 ng/mL konsantrasyonda biotinün adiposit farklılaşması süresini kısalttığı gösterilmiş (126). Bizde yaptığımız bu çalışmada

farklılaşma süresini kısaltmak amacıyla ortama katalizör olarak 100 ng/mL konsantrasyonda biotin ekledik. Bunların yanı sıra ortama farklılaştırma ajanı olarak IBMX, DEX ve insülin ilave ettik. Ortama ilave edilen bu farklılaştırma kokteyli farklılaşmanın daha kısa süre içerisinde gerçekleşmesini sağlar.

Hücre kültürü deneyinde kullanılacak homosistein için en uygun dozların belirlenmesi amacıyla MTT testi yapıldı (Şekil 11). MTT testi sonunda farklı homosistein konsantrasyonlarına karşılık elde edilen % canlılık sonuçları tablo 9'da verildi. MTT testi sonucu 0, 10, 50, 100 μ M konsantrasyondaki homosisteinin 3T3-L1 hücreleri için toksik etki göstermediğini ancak 100 μ M'ın üzerindeki Hcy dozlarının 3T3-L1 hücrelerinde toksik etki yaptığı bulundu. Elde edilen bu sonuçlara göre deneylerde 0, 10, 50, 100 μ M konsantrasyonlarda homosistein kullanılmasına karar verildi.

Farklılaşmanın gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için Oil Red O boyası ile boyamak, Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz aktivitesini ölçmek ve insülin bağlama metodu gibi çeşitli yöntemler mevcuttur(126). Biz bu yöntemlerden literatürde en fazla kullanılan Oil Red O boyası ile boyama yöntemini tercih ettik. Güvenilir, ucuz, kolay olmasının yanı sıra mikroskop altında lipit damlacıklarını kolayca görebildiğimiz için bu yöntemi tercih ettik. 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması üzerine homosisteinin etkisini değerlendirmek için deney sonunda her kuyucukta bulunan (yağ hücrelerine farklılaşmamış hücreler ve farklılaşmış olgun yağ hücreleri) hücreler Oil Red O boyası ile boyandı ve 520nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Boyama sonrası mikroskop görüntüleri ve elde edilen absorbans değerleri farklılaşmanın başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini gösterdi. Elde edilen absorbans değerleri ortalama \pm standart sapma (ort \pm SD) şeklinde Tablo 11'de verildi. Ort \pm SD değerleri aynı zamanda şekil 14'de bar grafiği şeklinde gösterildi. Yağ hücrelerine farklılaşmamış 3T3-L1 hücreleri ile farklılaşmış olgun yağ hücreleri Oil Red O boyası ile boyandıktan sonra elde edilen ortalama absorbans değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($P<0,05$). Bu sonuç 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine başarıyla farklılaştırıldığını göstermektedir. Farklı konsantrasyonlarda Hcy uygulanan hücreler Hcy uygulanmayan hücrelerle karşılaştırıldığında Hcy'nin farklılaşmayı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı bulunmuştur ($P<0,05$). Adiposit farklılaşması incelendiğinde, PPAR γ ve C/EBP α 'nın farklılaşmanın erken evrelerinde sentezlendiği bilinmektedir (21). PPAR γ adiposit farklılaşması için gereklidir ve adipogenezin temel transkripsiyonel düzenleyicisidir. Aynı zamanda adiposit lipid depolamasıyla ilişkili birçok geni direkt aktive eder. Beyaz yağ dokusunda yüksek

seviyede sentezlenmektedir (127). Yüksek homosistein seviyeleriyle PPAR γ ekspresyonu arasında negatif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (118). Yaptığımız çalışmada, Hcy ile muamele edilen 3T3-L1 hücrelerinde artan Hcy konsantrasyonunun farklılaşmayı azalttığını gördük. Bu sonuca bağlı olarak Hcy'in PPAR γ ekspresyonu azaltarak adiposit farklılaşmasını azaltmış olabileceği kanaatine vardık.

PCR ürünlerinin üretimi SYBR Green floresans sinyalinin ölçülmesi ile tayin edildi. Real Time PCR işlemimi Roche LightCycler 480 II marka cihazda katalog no: 11782-200/01K olan invitrogen Universal EXPRESS SYBR GreenER qPCR SuperMixes and Two-Step qRT-PCR kiti kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda yapıldı. Bu kit yüksek performans, güvenilir, verimlilik ve düşük kontaminasyon riskine sahiptir. Homosistein ile muamele edilen 3T3-L1 hücre serisinde olgun adipositlerde her örneğin CD 36 gen ekspresyonu konsantrasyonu aynı örneğin β -aktin konsantrasyonuna oranlandı. Elde edilen değerler 100 ile çarpılarak her örnek için yüzde CD 36 gen ekspresyonu hesaplandı. CD 36 gen ekspresyonu % cinsinden ifade edildi. CD 36 gen ekspresyonu değerleri $\% \pm SD$ cinsinden Tablo 11'de verilmiştir. Ayrıca Deney gruplarındaki PCR ürünlerinin jel elektroforezi görüntüsü şekil 14 ve şekil 15'de verilmiştir. Yağ hücrelerine farklılaşmamış 3T3-L1 hücreleri ile Hcy uygulanan farklılaşmış olgun yağ hücreleri real-time PCR sonrası CD 36 gen ekspresyonu açısından karşılaştırıldı. Farklılaştırma işlemi uygulanan hücrelerin CD 36 gen ekspresyonunda farklılaştırma uygulanmayan hücrelere oranla % 11'lik bir artış görülmesine rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p > 0,05$). Farklılaştırma işlemi uygulanan ve farklı konsantrasyonlarda Hcy ile muamele edilen olgun yağ hücreleri kendi içinde CD 36 gen ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$). Adipositler kolesterol dengesinde çok önemli fonksiyona sahiptir. Adipoz doku vücudun en geniş serbest kolesterol havuzuna sahiptir. Normal bireylerde vücut kolesterolünün % 25 i yağ dokusunda bulunurken bu oran obez hastalarda % 50 ye artmaktadır. Adipositlerde kolesterol sentez yolunun düşük aktivitesinden dolayı adipositlerin temel kolesterol kaynağı dolaşımdaki serbest lipoproteinlerdir. Ayrıca hiperkolesterolemik şartlarda yağ dokusunda bulunan CD 36, OxLDL'leri alır ve dolaşımdaki miktarını azaltır (4). CD 36 ekspresyonu PPAR γ yolu aracılığıyla düzenlenmektedir. Monositlerde Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), IL-4, makrofaj koloni uyarıcı faktör, PPAR γ 'nın aktivasyonu aracılığıyla CD 36 ekspresyonunu uyarırlar. PMA gibi PKC agonistleri mitogen activated protein (MAP) kinaz sinyal yolunu

aktifleştirirler. Hcy makrofajlarda PKC'nin aktifleşmesini düzenler. Hcy serbest radikallerin üretimini uyarır. Böylece reaktif oksijen türlerinin aşırı üretilmesine ve PPAR γ aktivasyonu aracılığıyla PKC-MAP kinaz yolunun aktifleşmesine sebep olan oksidatif stres, Hcy'nin CD 36 aktivasyonunu ve OxLDL alınımını artırdığı anlaşılır (118). Bir çalışmada Hcy'in PKC'yi artırdığı ve PPAR γ 'yı azalttığı gösterilmiştir (4). Başka bir çalışmada makrofajlarda OxLDL 'nin CD 36 gen ekspresyonunu PKC ve PPAR γ aracılığıyla artırdığını göstermişlerdir(88). Biz çalışmamızda Hcy'nin adipositlerde CD 36 gen ekspresyonu üzerine etkisinin olmadığını bulduk. Bunun sebebi Hcy'nin PKC aktivitesini artırırken PPAR γ aktivitesini azaltması sonucu her iki mediatörün sinyal yolağında birbirinin etkisini dengelemesi olabilir. Dolayısıyla ortamda Hcy bulunduğu durumlarda CD 36 gen ekspresyonuna PKC'nin ve PPAR γ 'nın etki etmediği sonucu çıkmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda makrofajlarda CD 36 gen ekspresyonunu Hcy'den ziyade OxLDL'nin artırmış olabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır.

CD 36 gen polimorfizmi bulunan hastalardan izole edilmiş monosit/makrofajlarda OxLDL bağlanması ve birikiminin kontrol hücrelerine göre %40 oranında azaldığı saptanmıştır. Erken aterosklerotik lezyonların oluşumu süresince, CD 36 ekspresyonu makrofajlarda OxLDL alınımında ve köpük hücre oluşumunda hayati bir öneme sahiptir. Bir çalışmada 3T3-L1 hücrelerinin yağ hücrelerine farklılaşması esnasında CD 36 aracılığıyla OxLDL'nin hücre içine alınması ve yıkılmasında önemli bir artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca başka bir çalışmada 3T3-L1 hücrelerinde CD 36 ligandı olan OxLDL'nin aynı zamanda CD36 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (45, 46).

Bu bilgiler adipositlerin makrofajlar gibi fagositler olarak fonksiyon gösterebileceğini göstermektedir. Kandaki OxLDL düzeyleri ile akut koroner sendromların ciddiyeti arasında pozitif korelasyon olduğuna dair oldukça fazla kanıt mevcuttur. Hepatik kulpfer hücreleri OxLDL'nin kandan temizlendiği temel bir yer olarak bilinmektedir. CD 36 monositlerde, adipositlerde, dendritik hücrelerde ve retinal pigment epitelyumunda apoptotik hücrelerin fagositozuna aracılık eder. Adipoz doku vücutta bol miktarda bulunduğu için OxLDL'nin CD 36 aracılığıyla adipositik fagositozu, aterogenez riskini ve ciddiyetini azaltan muhtemel fizyolojik bir mekanizma olabileceği düşünülmektedir. Obezite koroner kalp hastalıkları için bağımsız bir risk faktör olduğu görüşü oldukça fazla kabul görmektedir. Ancak obezite ve ateroskleroz arasındaki bağlantı tam olarak açıklanamamıştır. Adipositler tarafından OxLDL'nin bol miktarda alınımı aşırı lipid birikimine yol açar. Buna bağlı olarak adipoz doku ateroskleroz ve insülin direnci ile

ilişkili olan TNF- α , resistin ve PAI-1 gibi sitokinleri bol miktarda salgılar. Sonuç olarak bu durum obeziteye, insülin direncine ve ateroskleroza yol açabilir. İlginç bir hipotez olarak adipositlerde CD 36'nın hasarlanmaya yaklaşmış, yaşlanmış ya da apoptotik adipositlerin tanınmasına ve temizlenmesine de iştirak ettiği düşünülmektedir. Lezyon gelişiminin erken evrelerinde OxLDL monosit ve makrofajlar tarafından bol miktarda alınmaktadır. Bu durum makrofajlarda CD 36 ekspresyonunun aterosklerozun patogenezindeki önemini göstermektedir (45).

Sonuç olarak, 3T3-L1 hücrelerinde yapılan çalışmada Hcy'nin adiposit farklılaşmasını azalttığı ancak CD 36 gen ekspresyonu üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. Ancak hücre kültürü çalışmaları in vivo ortamlardan farklı olduğu için OxLDL'nin yağ dokusu tarafından uzaklaştırılmasına Hcy'nin etkinliği in vivo olarakta incelenmelidir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. MTT testi sonucu 0, 10, 50, 100 μ M konsantrasyondaki homosisteinin 3T3-L1 hücreleri için toksik etki göstermediği bulunmuştur
2. Yağ hücrelerine farklılaşmamış 3T3-L1 hücreleri ile farklılaşmış olgun yağ hücreleri Oil Red O boyası ile boyandıktan sonra elde edilen ortalama absorbans değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p < 0,05$).
3. Farklı konsantrasyonlarda Hcy uygulanan hücreler Hcy uygulanmayan hücrelerle karşılaştırıldığında Hcy'nin farklılaşmayı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı bulunmuştur ($p < 0,05$).
4. Yağ hücrelerine farklılaşmamış 3T3-L1 hücreleri ile Hcy uygulanan farklılaşmış olgun yağ hücreleri real-time PCR sonrası % CD 36 gen ekspresyonu açısından karşılaştırıldı. % CD 36 gen ekspresyonunda az miktarda bir artış görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).
5. Farklı konsantrasyonlarda Hcy uygulanan yağ hücrelerine farklılaşmış olgun yağ hücreleri kendi içinde karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).
6. İn vitro olarak elde edilen bu sonuçların in vivo olarak da desteklenmesi gerekmektedir.
7. Diğer OxLDL reseptörleri üzerine Hcy'nin etkileri inceleyen farklı çalışmalar yapılabilir.

7. ÖZET

CD 36 (Cluster of Differentiation 36) adipositler, monositler/makrofajlar, plateletler, mikrovasküler endotel hücreler gibi çeşitli hücre ve dokularda sentezlenen sınıf B çöpçü reseptör ailesinin bir üyesidir. CD 36 yağ hücreleri tarafından Okside LDL (OxLDL)'nin alınması ve azaltılmasında önemli bir rol oynar.

Homosistein kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörüdür. Homosisteinin endotelial fonksiyon bozukluğu, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu, lipoprotein oksidasyonunun artışı, platelet aktivasyonu gibi olaylarda rol oynadığı ifade edilmiştir. Ayrıca obez insanlarda serum Hcy seviyelerinin arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak Hcy ile yağ dokusundaki CD 36 arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma yapılmamıştır. Yaptığımız bu çalışmada birçok patolojik olayla ilişkisi olan Hcy'nin 3T3-L1 hücre serisinde adiposit farklılaşması ve yağ dokusuna OxLDL alınımını düzenleyen CD 36 ekspresyonuna etkisi hücre kültürlerinde incelenmesi amaçlanmıştır.

Hcy'nin 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşmasına ve CD 36 ekspresyonuna etkisinin incelendiği çalışmamızda, Hcy uygulanan hücrelerde farklılaşmanın istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldığı tespit edildi ($p < 0,05$). CD 36 gen ekspresyonunda az miktarda bir artış görülmesine rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ($p > 0,05$).

Sonuç olarak Hcy'nin 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşmasını azalttığı ancak yağ dokusunda CD 36 ekspresyonuna etkisinin olmadığı kanaatine varıldı.

8. SUMMARY

Effect of Homocysteine on Oxidized LDL Receptor Gene Expression in Adipose Tissue

CD 36 (Cluster of Differentiation 36) is a member of class B scavenger receptor family, expressed in cells and tissues including monocytes/macrophages, platelets, microvascular endothelial cells. CD 36 also functions as uptake and in degradation of oxidized low density lipoprotein (OxLDL) in adipocytes.

Homocystein is an independent risk factor for cardiovascular diseases. It was reported that homocystein plays important role in endothelial dysfunction, vascular smooth muscle proliferation, increased lipoprotein oxidation and platelet activation. High serum homocystein levels were also noticed in obese subjects by several studies. Relationship between Hcy and CD 36 in adipose tissue has not been studied. In this study investigation of the effect of Hcy, involved in many pathological cases, on adipocyte differentiation and CD 36 expression in 3T3-L1 cell lines was aimed.

It was determined that adipocyte differentiation was decrease significantly in cells treated with homocysteine ($p < 0,05$). Gene expression of CD 36 increased but this was not statistically significant ($p > 0,05$).

It was concluded that Hcy reduces adipocyte diffentation in 3T3-L1 cell lines but has no significant effect on CD 36 gene expression in adipose tissue.

9. KAYNAKLAR

1. Zhao S-P, Wu J, Zhang D-Q, Ye H-J, Liu L, Li J-Q: Fenofibrate enhances CD36 mediated endocytic uptake and degradation of oxidized low density lipoprotein in adipocytes from hypercholesterolemia rabbit, *Atherosclerosis*, 177: 255–262, 2004.
2. Hassan M, El Yazidi C, Landrier JF, Lairon D, Margotat A, Amiot MJ: Phloretin enhances adipocyte differentiation and adiponectin expression in 3T3-L1 cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 361(1): 208-13, 2007.
3. Masellaa R, Vari`a R, D'Archivioa M, Santangeloa C, Scazzocchia B, Maggiorellab M T, Sernicolab L, Tittib F, Sanchezc M, Mariod UD, Letod G, Giovanninia C: Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation: *FEBS Letters*, 580: 2421–2429, 2006.
4. Li, Y., Jiang, C., Xu, G., Wang, N., Zhu, Y., Tang, C., Wang, X.: Homocysteine upregulates resistin production from adipocytes in vivo and in vitro. *Diabetes*, 57(4):817-27, 2008.
5. Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, O.R: *Temel Histoloji*(Çev. Y. AYTEKİN). Barış kitapevi.150-158,1993.
6. Gimble, J.M.: Adipose tissue-derived therapeutics:Review. *Expert Opin Biol Therapy*, 3(5): 705-13, 2003.
7. Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, O.R: *Temel Histoloji*(Çev. Y. AYTEKİN). Barış kitapevi.150-158,1993, Ek ref: Ahima, R.S. and Flier, J.S.: Adipose Tissue As An Endocrine Organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11:327-332, 2000.
8. Ahima, R.S. and Flier, J.S.: Adipose Tissue As An Endocrine Organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11:327-332, 2000.
9. Stepan, C.M., Lazar, M.A.: Resistin and Obesity-Associated İnsulin Resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13:18-23,2002.

10. Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, F.C., Burrell, M.A.: The adipocyte: A model for integration of endocrine and metabobolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280:827-847,2001.
11. Ergün, A.: Adipose Tissue and The Adipocyte: Review. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 25: 412-420, 2005.
12. Warden, N.A.S., Warden, C.H.: Biological influences on obesity. *Pediatric Clinics of North America*, 48:879-891,2001.
13. Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, F.C., Burrell, M.A.: The adipocyte: A model for integration of endocrine and metabobolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280:827-847,2001.
14. Gregoire, F.M., Smas, C.M., Sul, H.S.: Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiol Rev*, 78(3):783-809, 1998.
15. Green, H. and Kehinde, O.: Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell*, 1:113-116,1974.
16. Novikoff, A. B., Novikoff, I. M., Rosen, O.M., and Rubin, C. S.: Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J. Cell Bid*, 87,180-196, 1980.
17. Student, A. K., Hsu, R. Y., Lane, M. D. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.*, 255:4745-4750,1980.
18. Smith, P. J., Wise, L. S., Berkowitz, R., Wan, C., Rubin, C. S.: Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 263:9402-9408,1988.
19. Bernlohr, D. A., Bolanowski, M. A., Kelly, T. J., Jr Lane, M. D.: Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.*, 260:5563-5567,1985.
20. Scott, R. E., Florine, D. L., Wille, J. J., Yun, K.: Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle: G_D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79:845-849,1982.
21. Ntambi, J. M.,and Kim, Y.C.: Adipocyte Differentiation and Gene Expression. *J. Nutr*, 130: 3122-3126, 2000.
22. Cristiana, E.J.A., Elvire, H., Christoph A.M.: Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 19:4, 547-566, 2005.
23. Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J., Seed, B.: CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. *Cell*, 58:95-101, 1989.

24. Febbraio, M., Hajjar, D. P., Silverstein, R. L.: CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, 108: 785-91, 2001.
25. Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDermott-Roe, C., Poston, R., McGregor, J.L.: CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 75:468–477, 2007.
26. Silverstein, R. L., Febbraio, M.: CD36 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 11:483-91, 2000.
27. Armesilla, A.L., Vega, M.A.: Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *J Biol Chem*, 269: 18985-91, 1994.
28. Tandon, N.N., Lipsky, R.H., Burgess, W.H., Jamieson, G.A.: Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36). *J Biol Chem*, 264:7570-5, 1989.
29. Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T., Protter, A.A.: CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 268:11811–11816, 1993.
30. Savill, J., Hogg, N., Ren, Y., Haslet, C.: Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest*, 90: 1513-1522, 1992.
31. Stuart, L.M., Deng, J., Silver, J.M., Takahashi, K., Tseng, A.A., Hennessy, E.J.: Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol*, 170:477–485, 2005.
32. Bamberger, M.E., Haris, M.E., McDonald, D.R., Husemann, J., Landreth, G.E.: A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci*, 2003(23):2665–2674, 2003.
33. Abumrad, N.A., el-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E., Grimaldi, P.A.: Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation homology with human CD36. *J Biol Chem*, 268:17665-8, 1993.
34. Febbraio, M., Silverstein, R.L.: CD36: Implications in cardiovascular disease. *Int Biochem Cell Biol*, 239:2012–2030, 2007.
35. Kashiwagi, H., Tomiyama, Y., Honda, S., Kosugi, S., Shiraga, M., Nagao, N., Sekiguchi, S., Kanayama, Y., Kurata, Y., Matsuzawa, Y.: Molecular basis of CD36 deficiency. Evidence that a 478C→T substitution (proline90→serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency. *J. Clin. Invest*, 95: 1040–1046, 1995.
36. Nozaki, S., Kashiwagi, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Kostner, B., Tomiyama, Y., Nakata, A., Ishigami, M., Miyagawa, J., Kameda-Takemura, K., et al.: Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J. Clin. Invest*, 96: 1859–1865, 1995.

37. Malaud, E., Hourton, D., Giroux, L.M., Ninio, E., Buckland, R., McGregor, J.L.: The terminal six amino-acids of the carboxy cytoplasmic tail of CD36 contain a functional domain implicated in the binding and capture of oxidized low-density lipoprotein. *Biochem J*, 364: 507-15, 2002.
38. Rahaman, S.O., Lennon, D.J., Febbraio, M., Podrez, E.A., Hazen, S.L., Silverstein, R.L.: A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab*, 4:211–221, 2006.
39. Ricci, R., Sumara, G., Sumara, I., Rozenberg, I., Kurrer, M., Akhmedov, A.: Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis. *Science*, 306:1558–1561, 2004.
40. Chen, K., Febbraio, M., Li, W., Silverstein, R.L.: A Specific CD36-Dependent Signaling Pathway Is Required for Platelet Activation by Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Circ Res*, 102:1512-1519, 2008.
41. Huh, H.Y., Pearce, S.F., Yesner, L.M., and Schindler, J.L. and Silverstein, R.L.: Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood*, 87:2020-2028, 1996.
42. Han, J., Hajjar, D.P., Tauras, J.M., Feng, J., Gotto, A.M., Nicholson, A.C.: Transforming growth factor-beta1(TGF-beta1)and TGF-beta2 decrease expression of CD36, the typeB scavenger receptor, through mitogen activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem*, 275:1241-1246, 2000.
43. Hammad, S.M., Twal, W.O., Barth, J.L., Smith, K.J., Saad, A.F., Virella, G., Argraves, W.S., Lopes-Virella, M.F.: Oxidized LDL immune complexes and oxidized LDL differentially affect the expression of genes involved with inflammation and survival in human U937 monocytic cells. *Atherosclerosis*, 202:394–404, 2009.
44. Helming, L., Winter, J., Gordon, S.: The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion. *J Cell Sci*, 122:453-459, 2009.
45. Kuniyasu, A., Hayashi, S., Nakayama, H.: Adipocytes recognize and degrade oxidized low density lipoprotein through CD36. *Biochem Biophys Res Commun*, 295(2):319-23, 2002.
46. D'Archivio, M., Scazzocchio, B., Filesi, C., Vari, R., Maggiorrella, M.T., Sernicola, L., Santangelo, C., Giovannini, C., Masella, R.: Oxidised LDL up-regulate CD36 expression by the Nrf2 pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *FEBS Lett*, 582(15):2291-8, 2008.

47. Feng, J., Han, J., Pearce, S.F.A., Silverstein, R.L., Gotto, A.M., Hajjar, D.P., Nicholson, A.C.: Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J Lipid Res*, 41:688-696, 2000.
48. Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H., Evans, R.M.: OxLDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR gamma. *Cell*, 93:229-240, 1998.
49. Nicholson, A.C.: Expression of CD36 in Macrophages and Atherosclerosis The Role of Lipid Regulation of PPARg Signaling. *Trends Cardiovasc Med*, 14:8-12, 2004.
50. Silverstein, R.L.: Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: Role of the scavenger receptor.:CD36. *Cleve Clin J Med*, 76(2):27-30, 2009.
51. Zhao, M., Liu, Y., Wang, X., New, L., Han, J., Brunk, U.T.: Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL. *APMIS*, 110:458-468, 2002.
52. Coburn, C.T., Knapp, F.F., Jr. Febbraio, M., Beets, A.L., Silverstein, R.L., Abumrad, N.A.: Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem*, 275: 32523-9, 2000.
53. Kuang, M., Febbraio, M., Wagg, C., Lopaschuk, G.D., Dyck, J.R.: Fatty acid translocase/CD36 deficiency does not energetically or functionally compromise hearts before or after ischemia. *Circulation*, 109:1550-1557, 2004.
54. Aitman, T.J., Glazier, A.M., Wallace, C.A., Cooper, L.D., Norsworthy, P.J., Wahid, F.N., Al-Majali, K.M., Trembling, P.M., Mann, C.J., Shoulders, C.C., Graf, D., St Lezin, E., Kurtz, T.W., Kren, V., Pravenec, M., Ibrahimi, A., Abumrad, N.A., Stanton, L.W., Scott, J.: Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet*, 21: 76- 83, 1999.
55. Pravenec, M., Landa, V., Zidek, V., Musilova, A., Kren, V., Kazdova, L., Aitman, T.J., Glazier, A.M., Ibrahimi, A., Abumrad, N.A., Qi, N., Wang, J.M., St Lezin, E.M., Kurtz, T.W.: Transgenic rescue of defective CD36 ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Nat. Genet*, 27: 156-158, 2001.
56. Pravenec, M., Landa, V., Zidek, V., Musilova, A., Kazdova, L., Qi, N., Wang, J., St Lezin, E., Kurtz, T.W.: Transgenic expression of CD36 in the spontaneously hypertensive rat is associated with amelioration of metabolic disturbances but has no effect on hypertension. *Physiol. Res*, 52: 681-688, 2003.
57. Griffin, E., Re, A., Hamel, N., Fu, C., Bush, H., McCaffrey, T., Asch, A.S.: A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nat Med*, 7: 840-6, 2001.

58. Sampson, M.J., Davies, I.R., Braschi, S., Ivory, K., Hughes, D.A.: Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 167: 129–134, 2003.
59. Liang, C.P., Han, S., Okamoto, H., Carnemolla, R., Tabas, I., Acilci, D., Tall, A.R.: Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages. *J. Clin. Invest*, 113: 764– 773, 2004.
60. Miyaoka, K., Kuwasako, T., Hirano, K., Nozaki, S., Yamashita, S., Matsuzawa, Y.: CD36 deficiency associated with insulin resistance. *Lancet*, 357: 686-7, 2001.
61. Aitman, T. J.: CD36, insulin resistance, and coronary heart disease. *Lancet*, 357: 651-2, 2001.
62. Iizuka, Y., Gotoda, T., Ishibashi, S., Yamada, N.: CD36 deficiency and insulin resistance. *Lancet*, 358: 243, 2001.
63. Abumrad, N. A.: CD36 may determine our desire for dietary fats. *J Biol Chem*, 115: 2965-7, 2005.
64. Fukuwatari, T., Kawada, T., Tsuruta, M., Hiraoka, T., Iwanaga, T., Sugimoto, E., Fushiki, T.: Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett*, 414: 461-4, 1997.
65. Greenberg, M.E., Sun, M., Zhang, R., Febbraio, M., Silverstein, R., Hazen, S.L.: Oxidized phosphatidylserine–CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med*, 203(12):2613–2625, 2006.
66. Serghides, L., Smith, T.G., Patel, S.N., Kain, K.C.: CD36 and malaria: Friends or foes?. *Trends Parasitol*, 19:461–469, 2003.
67. Mertens, A., Holvoet, P.: Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J*, 15:2073–2084, 2001.
68. Jialal, I., Deveraj, S.: Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clinical Chemistry*, 42(4):498-506, 1996.
69. Weinbrenner, T., Cladellas, M., Isabel Covas, M., Fitó, M., Tomás, M., Sentí, M., Bruguera, J., Marrugat, J.: High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 168: 99-106, 2003.
70. Shaw, P.X., Hörkkö, S., Tsimikas, S., Chang M.K., Palinski, W., Silverman, G.J., Chen, P.P., Witztum, J.L.: Human-Derived Anti-Oxidized LDL Autoantibody Blocks Uptake of Oxidized LDL by Macrophages and Localizes to Atherosclerotic Lesions In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21:1333-1339, 2001.

71. Luoma, J.S., Kareinen, A., Narvanen, O., Viitanen, L., Laakso, M., Herttuala, S.Y.: Autoantibodies against oxidized LDL are associated with severe chest pain attacks in patients with coronary heart disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 39:1660 – 1665,2005.
72. Shen, L., Sevanian, A.: OxLDL induces macrophage delta-GCS-HS protein expression: a role for oxLDL-associated lipid hydroperoxide in GSH synthesis. *J. Lipid Res*, 42:813–823,2001.
73. Young, I.S., McEneny, J.: Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(2):358-362,2001.
74. Fredrikson, N.G., Hedblad, B., Berglund, G., Nilsson, J.: Plasma oxidized LDL: a predictor for acute myocardial infarction?.*Journal of Internal Medicine*, 253:425–429,2003.
75. Violi, F., Micheletta, F., Luliano, L.: Antioxidants and atherosclerosis. *Eur Heart J Supplements*, 4(B):17–21,2002.
76. Baykal, Y., Tüzün, A., Kocabalkan, F.: Aterosklerozun Patogenezi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*,18:360-368,1998.
77. Murphy, J.E., Tedbury, P.R., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J.H., Ponnambalam, S.: Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors.*Atherosclerosis*, 182(1):1-15, 2005.
78. Sivrikaya, A.: Sağlıklı Kişilerde ve Koroner Kalp Hastalıklarında Bitki Sterolleri, Total Antioksidan Kapasite(TAS), Okside LDL (OxLDL) Ve Homosistein Düzeylerinin Araştırılması. Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,Doktora Tezi, Konya, 2007.
79. Mutlu, N.: Obez ve Normal Kilolu Bireylerde Diyete Fındık İlavesinin Serum Lipid ve Serum Homosistein Düzeyine Etkisi. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 2008.
80. Jiang, X., Yang, F., Brailoiu, E., Jakubowski, H., Dun, N.J., Schafer, A.I., Yang, X., Durante, W., Wang, H.: Differential Regulation of Homocysteine Transport in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(9):1976-83, 2007.
81. Bolander, C.G.: Focus On Homocysteine And The Vitamins Involved In Its Metabolism. Springer Bussiness Media Gmbh, 262, 2002.
82. Hankey, G. Eikelboom, J.W.: Homocysteine And Vascular Disease. *The Lancet*, 354(31): 407-413, 1999.
83. Friedman, A.N.,Bostom, A.G., Selhub, J., Levey, A.S., Rosenberg, I.H.: The Kidney And Homocysteine Metabolism. *J Am Soc Nephrol*, 12: 2181-2189, 2001.

84. Bostom, A.G., Lathrop, L.: Hyperhomocysteinemia In Endstage Renal Disease: Prevalence, Etiology And Potential Relationship To Arteriosclerotic Outcomes. *Kidney Int*, 52:10-20, 1997.
85. Koç, Y.L.: Homosistein Metabolizmasında Rol Oynayabilecek Gen Değişimlerinin İncelenmesi. Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara,2007.
86. Scott, J.M., Molloy, A.M., Kennedy, D.G., Kennedy, S., Weir, D.G.: Effects Of The Disruption Of Transmethylation on The Central Nervous System: An Animal Model. *Acta Neurol Scand Suppl*, 54: 27-31,1994.
87. Dikmen M.: Homosistein Metabolizması Ve Hastalıklarla İlişkisi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 24:645-652, 2004.
88. Ide, N., Keller, C., and Weiss, N.: Aged Garlic Extract Inhibits Homocysteine-induced CD 36 Expression and Foam Cell Formation in Human Macrophages. *Journal of Nutrition*, 136:755-758, 2006.
89. Thampi, P., Stewart, B.W., Joseph, L., Melnyk, S.B., Hennings, L.J., Nagarajan, S.: Dietary homocysteine promotes atherosclerosis in apoE-deficient mice by inducing scavenger receptors expression. *Atherosclerosis*, 197(2):620-9, 2008.
90. Utku, U., Çelik, Y.: Serebrovasküler hastalıklar. In: Balkan S, ed. Ankara: Güneş Kitapevi Ltd.Şirkrti p.49-61,2002.
91. Akar, N., Aka, E., Özel, D., et al.: Common mutations at the homocysteine metabolism pathway and pediatric stroke. *Thrombosis Research*, 102:115-120,2001.
92. Berg, K., Malinov, M.R., Kierulf, P., Upson, B.: Population variation and genetics of plasma homocyst(e)ine level. *Clin Genet*, 4:315-321,1992.
93. Sucu, M., Karadere, A., Toprak, N.: Homosistein ve kardiyovasküler hastalıkları. *Türk Kardiyol Dern Arş.*,29:181-90,2001.
94. Diaz-Arrastia R. Homocysteine and neurologic disease. *Arch Neurol.*,57:1422-1428, 2000.
95. Dekou, V., Whincup, P., Papacost, O., et al.: The effect of C677T and A1298C polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene on homocysteine levels in elderly men and women from the British region heart study. *Atherosclerosis*, 154:659-666, 2001.
96. Schmitz, C., Lindpainter, K., Verhoef, P., et al.: Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction. *Circulation*, 94:1812-1814, 1996.

97. Kang, S., Wong, P.W.K., Susmano, A., et al.: Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: An inherited risk factor for coronary artery disease. *J Hum Genet*, 48:536-545,1991.
98. Kang, S., Passen, E.L., Ruggie, N., et al.: Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation*, 88:1463-1469, 1993.
99. Perna, A.F., Castaldo, P., Ingrosso, D., et al.: Homocysteine, a new cardiovascular risk factor is also a powerful uremic toxin. *J Nephrol*,12:230-240,1999.
100. Verhoef, P., Hennekens, C.H., Malinow, M.R., et al.: A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of ischemic stroke. *Stroke* 1994;25:1924-30.
101. Wu, Y., Tomon, M., Sumino, K., Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and ischemic stroke: Sex difference in Japanese. *Kobe J Med Sci*, 47:255-262, 2001.
102. Zang, G., Dai, C.: Gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in Chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular diseases. *Thrombosis Research*,104:187-195,2001.
103. Diaz-Arrastia, R.: Homocysteine and neurologic disease. *Arch Neurol*,57:1422-1428,2000.
104. Yasui, K., Kowa, H., Nakaso, K., Takeshima, T., Nakashima, K.: Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. *Neurology*, 55:437-440,2000.
105. Mccrory, S.P., Dynan, K.B., Lawson, J.T., et al.: Moderately elevated plasma homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase genotype and risk for stroke, vascular dementia and alzheimer disease in Northern Ireland. *Stroke*, 33:2351-2356, 2002.
106. Harmon, D.L., Doyle, R.M., Meleady, R., et al.: Genetic analysis of the thermolabile variant of 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for ischemic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19:208-211,1999.
107. Hanratty, C.G., Mcgrath, L.T., Mcauley, D.F., et al.: The effects of oral methionine and homocysteine on endothelial function. *Heart*, 85:326-30,2001.
108. McDowell, I.F.W., Long, D.: Homocysteine and endothelial dysfunction: A link with cardiovascular disease. *J Nutr*, 130:3695-3725,2000.
109. Pullin, C.H., Wilson, J.F., Ashfield-Watt, P.A.L., et al.: Influence of methylenetetrahydrofolate reductase genotype, exercise and other risk factors on endothelial function in healthy individuals. *Clin Sci*, 102:45-50,2002.

110. Fattal-Valevski, A., Bassan, H., Korman, S.H., et al.: Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency: Importance of early diagnosis. *J Child Neuro*, 15:39-543,1999.
111. Korkmaz, C., Bozan, B., Kosar, M., Sahin, F., Gülbas, Z.: Is there an associations of plasma homocysteine levels with vascular involvement in patients with Behçet's Syndrome. *Clin Exp Rheumatol*, 20:30-34,2002.
112. Brattstrom, L., Wilcken, D.E.L., Ohrvik, J., Brudin, L.: Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not vascular disease. *Circulation*, 98:2520-2526,1998.
113. Vermeer, S.E., Dijk, E.J., Koudstaal, P.J., et al.: Homocysteine, silent brain infarcts, and white matter lesions: The Rotterdam scan study. *Ann Neurol*, 51:285-289,2002.
114. Chambers J, Skooner J. Homocysteine: A novel risk factor for coronary heart disease in UK Indian Asians. *Heart*, 86:121-2,2001.
115. Lindgren, A., Brattstrom, L., Norrving, B., Hultberg, B., Andersson, A., Johansson, B.B.: Plasma homocysteine in the acute and convalescent phases after stroke. *Stroke*, 26:795-800,1995.
116. Malinow, M.R., Bostom, A.G., Krauss, R.M.: Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases. A statement for healthcare professionals from the nutrition committee, American heart association. *Circulation*, 99:178-82,1999.
117. Wang, G., Siow, Y.L., O K.: Homocysteine stimulates nuclear factor κ B activity and monocyte chemoattractant protein-1 expression in vascular smooth-muscle cells : a possible role for protein kinase C .*Biochem J*, 3:817-826, 2000.
118. Mujumdar, V.S., Tummalapalli, C.M., Aru, G.M., Tyagi, S.C.: Mechanism of constrictive vascular remodeling by homocysteine: role of PPAR. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(5):1009-15, 2002.
119. Munari , C.C., Alves,J. M., Bastos, J.K. , Tavares,D. C.: Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of baccharis dracunculifolia extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of Applied Toxicology* ; 30(1):22-8,2010.
120. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paul, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst.*; 83(11):757-66,1991.
121. Çolak, M.: Arı poleni ve propolisinin metastatik insan prostatkanserli hücre serilerinde voltaj kapılı sodyum kanalları ekspresyonu üzerine etkisi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon, 2009.
122. Lefrere, I., de Coppet, P., Camelin, J.C. , Le Lay, S., Mercier, N., Elshourbagy, N., Bril, A., Berrebi-Bertrand, I., Feve, B., Krief, S.: Neuropeptide AF and FF modulation of adipocyte metabolism. Primary insights from functional genomics and

- effects on beta-adrenergic responsiveness. *J Biol Chem*, 277: 42, 39169–39178, 2002.
123. Abumrad NA, El-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA: Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is included during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36, *J Biol Chem*, 268:17665–8, 1993.
 124. Wu, ZH., Zhao, SP. Adipocyte: A potential target for the treatment of atherosclerosis, *Medical Hypotheses*, 67(1): 82–86, 2006.
 125. Vaya, A., Ejarque, I., Tembl, J., Corella, D., Laiz, B.: Hyperhomocysteinemia, obesity and cryptogenic stroke. *Clin Hemorheol Microcirc*, 47(1):53-58,2011.
 126. Gamou, S., Shimizu, Y., Shimizu, N.: Adipocytes. *Methods Mol Biol.*, 5:197-207,1990.
 127. Chui, P.C., Guan, H.P., Lehrke, M., Lazar, M.A.: PPAR γ regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *J.Clin.Invest.*;115:2244-2256,2005.

ÖZGEÇMİŞ

Ahmet Menteşe, 11.10.1977 tarihinde Giresun'un Görele ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini 1982-1994 tarihleri arasında Görele'de tamamladı. 1995 yılında Fırat Üniversitesi TBMYO Bilgisayar Donanımı Bölümünü kazandı. 1997 yılında Bilgisayar Donanımı Bölümünden birincilikle mezun oldu. Kısa bir süre Siemens Nixdorf Bilgisayar Sistemleri A.Ş.'inde bilgisayar teknikeri olarak görev yaptı. 1998 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2002 yılında Kimya Bölümünden ikincilikle mezun oldu. 2002 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2003-2004 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak görev yaptı. 2005 yılında Biyokimya bilim uzmanı ünvanı alarak yüksek lisansını tamamladı. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2004-2010 tarihleri arasında Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde araştırma görevlisi olarak görev yaptı. 2010 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO Tıbbi Laboratuvar Programında öğretim görevlisi olarak göreve başladı. Evli ve iki çocuk babası.