

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN SERUM BÜTİRİLKOLİNESTERAZININ KARACİĞER
HEPG2 HÜCRELERİNDE LİPİT METABOLİZMASI İLE
ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**

Müslüm GÖK

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2015**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN SERUM BÜTİRİLKOLİNESTERAZININ KARACİĞER
HEPG2 HÜCRELERİNDE LİPİD METABOLİZMASI İLE
ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**

Müslüm GÖK

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ebru BODUR**

**ANKARA
2015**

ONAY SAYFASI

iii

Anabilim Dalı : **Biyokimya**
Program : **Biyokimya**
Tez Başlığı : **İNSAN SERUM BÜTİRİLKOLİNESTERAZİNİN KARACİĞER
HEPG2 HÜCRELERİNDE LİPİD METABOLİZMASI İLE
ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**
Öğrenci Adı-Soyadı : **Müslüm Gök**
Savunma Sınavı Tarihi : **04.02.2015**

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: **Prof. Dr. Özden TACAL**
Hacettepe Üniversitesi
Tez danışmanı: **Doç. Dr. Ebru BODUR**
Hacettepe Üniversitesi
Üye: **Doç. Dr. Aylin Sepici DİNÇEL**
Gazi Üniversitesi
Üye: **Doç. Dr. N. Dilara ZEYBEK**
Hacettepe Üniversitesi
Üye: **Doç. Dr. Gülnihal KULAKSIZ ERKMEN**
Hacettepe Üniversitesi

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ersin FADILLIOĞLU
Müdür y.

TEŞEKKÜR

Beni iyi bir akademisyen olarak yetiştirmek için gerek iş hayatında gerekse sosyal yaşamda her anlamda bana örnek olan, yüksek lisans eğitimim süresince bilgi, birikim ve yardımlarını benden esirgemeyen ve akademik hayata adım atışımda her zaman desteğini yanımda hissettiğim değerli hocam Doç. Dr. Ebru BODUR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Göreve başlayışımdan yüksek lisans eğitimimin tamamlandığı bu günlere gelene dek bilgi paylaşımları, destek ve anlayışlarıyla bana her zaman yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Ediz DEMİRPENÇE, Prof. Dr. Naciye Leyla AÇAN, Prof. Dr. Yasemin AKSOY, Prof. Dr. N. Nuray ULUSU, Doç. Dr. İlker DIBIRDIK, Doç. Dr. Gülnihal KULAKSIZ ERKMEN, Dr. Esra BÜBER'e, birlikte çalışma fırsatı bulduğum için mutluluk duyduğum, kendisinden çok şey öğrendiğim Doç. Dr. Dilara ZEYBEK'e ve tez izlemesi komitesinde yer alarak gerekli katkıları sağlayan Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL'e teşekkür ederim. Deney için gerekli malzemelerin teminine katkıda bulunan, deneyimlerim ve gözlemlerim sırasında benden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. H. Asuman ÖZKARA, Doç. Dr. İncilay LAY, Prof. Dr. A. Lale DOĞAN, Prof. Dr. Özden TACAL, Doç. Dr. Çetin KOCAEFE ve değerli asistanı Duygu AKÇAY'a çok teşekkür ederim. Akım sitometri çalışmaları için İrem Akar'a, hücre kültürü çalışmaları için yardımcı olan Tülay Dağaşar'a teşekkür ederim. Varlıklarıyla bana güç veren bölüm hocalarım ve asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarım süresince göstermiş oldukları desteklerden dolayı Dr. Merve Sibel GÜNGÖREN, Mehmet ÖZCAN'a, Dr. Deniz CEYHAN'a ve uzaklardan manevi desteği ile katkıda bulunan Ender FAKI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim biricik annem Hamdiye'ye, sevgili babam Zeki'ye ve birbirinden değerli kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması kapsamında beni destekleyen Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP)'na teşekkür ederim.

Son olarak yüksek lisans eğitimim boyunca sağladığı finansal destek için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

ÖZET

Gök, M. İnsan serum bütirilkolinesterazının karaciğer HepG2 hücrelerinde lipid metabolizması ile etkileşiminin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2015. Karaciğerde sentezlenen bütirilkolinesteraz (BChE), çoğunlukla ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ilişkilendirilir. Daha önce sedanter erkek öğrenciler ile yaptığımız çalışmada, egzersiz ve/veya konjuge linoleik asit (CLA) uygulaması ile BChE ve serbest yağ asit (FFA) seviyelerinin değiştiğini gösterdik. Bu çalışmada linoleik asit (LA) ve α -linolenik asit (ALA)'i HepG2 hücrelerine uygulayarak, bu lipidlerin BChE ekspresyonuna etkilerini gözlemleyip lipid metabolizmasıyla BChE'nin ilişkisini inceledik. Deney grubumuz, BChE ekspresyonunu ve LA ile ALA uygulamalarının hücre döngüsündeki etkilerini incelediğimiz normal HepG2 hücrelerinden oluşmaktadır. HepG2 hücreleri Reverse transkriptaz PCR (RT-PCR) analizinde herhangi bir BChE ekspresyonu göstermedi. Bu yüzden doğal tip insan BChE plazmidini çoğaltılıp HepG2 hücrelerine transfeksiyonu yapıldı. Akım sitometrisi ile analiz edilen BChE transfeksiyonu yapılmamış HepG2 hücrelerinde LA ve ALA'nın yüksek konsantrasyonda (sırasıyla 500 μ M ve 50 μ M) uygulaması HepG2 hücreleri üzerinde toksik etki gösterdi. ALA'ya göre daha toksik etki gösteren LA, HepG2 hücrelerinin tutunmasını engelledi. WST-1 yöntemi ile LA için IC₅₀ değeri 149.3 μ M olarak bulundu ve çalışma için uygun ALA ve LA konsantrasyonları 5 μ M olarak belirlendi. RT-PCR ve aktivite sonuçlarında gözlemlediğimiz üzere, BChE plazmidinin HepG2 hücrelerine transfeksiyonu BChE ifadesinde artışla sonuçlandı. BChE'nin HepG2 hücrelerine transfeksiyonu sonrası ALA'nın 5 μ M uygulaması, hem transfeksiyon işlemi yapılan hem de transfeksiyon işlemi yapılmayan hücrelere göre BChE ifadesinde artışa neden oldu. Bu BChE ifadesindeki artış, LA uygulamasıyla gözlenen toksik etkiyi azalttı ve hücre sayısında artışa neden oldu ancak hayalet hücre görünümünü sürdürdü. Diğer yandan ALA uygulaması hem BChE plazmidini transfeksiyonu yapılan hem de herhangi bir transfeksiyon işlemi yapılmayan HepG2 hücrelerinde, BChE ifadesinde ve BChE aktivitesinde belirgin bir artışa neden oldu. Sonuçlarımız BChE ile lipid birikiminin ve hücre çoğalmasında arttığını gösterdi. Elde ettiğimiz bulgular BChE'nin lipid metabolizması ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Bütirilkolinesteraz, HepG2, Linoleik asit, α -Linolenik asit, ekspresyon analizleri.

Destekleyen kurumlar: HÜBAB 6080-DESTEK PROJESİ, Proje No: 2145

ABSTRACT

Gök, M. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Biochemistry Program, MSc Thesis, Ankara, 2015. Interaction of human serum butyrylcholinesterase with lipid metabolism of liver HepG2 cells.

Butyrylcholinesterase (BChE) synthesized in liver is mostly associated with the detoxification of xenobiotics. Recently we have shown that in sedentary young males, application of exercise and/or conjugated linoleic acid (CLA) changes both free fatty acids(FFA) and BChE levels. In this study to analyze the involvement of BChE in lipid metabolism, we have applied linoleic acid (LA) and α -linolenic acid (ALA) to HepG2 cells to observe the effects of these lipids on BChE expression. Our experimental group consisted of normal HepG2 cells, in which we analyzed the expression of BChE and the effects of these treatments on cell cycle. HepG2 cells did not display any BChE expression as analyzed by Reverse transcriptase PCR (RT-PCR). Hence wild type human BChE plasmid was amplified and transfected to HepG2 cells. Application of high concentrations of linoleic (500 μ M) (LA) and linolenic acid (50 μ M) (ALA) to HepG2 cells without BChE transfection caused toxicity as analyzed by flow cytometry. LA was observed to be more toxic than ALA, leading to unattached cells. The IC₅₀ value of LA was found as 149.3 μ M and the appropriate LA and ALA concentrations were determined as 5 μ M by WST-1 assay. Transfection of BChE plasmid to HepG2 cells yielded increased BChE expression as observed by RT-PCR and activity assays. Application of 5 μ M ALA after BChE transfection to HepG2 cells resulted in increased expression of BChE as opposed to both untransfected and transfected cells. The toxicity observed during LA treatment was diminished and cell proliferation increased, although the cells retained a ghost cell like property. Application of ALA on the other led to an overall increase in both cell numbers and BChE expression and activity. Our results indicate that BChE transfections help HepG2 cells to internalize more lipids and lead the cells to a more proliferative state. Hence, the interaction of butyrylcholinesterase with lipid metabolism is much closer than realized before.

Keywords: Butyrylcholinesterase, HepG2, Linoleic acid, α -Linolenic acid, expression analyses.

Supported by: HÜBAB 6080-Project Grant, Project ID: 2145

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolinesterazlar	3
2.2. Bütirikolinesterazın Moleküler Yapısı	4
2.3. Bütirikolinesterazın Genetik Özellikleri	6
2.4. BChE'nin Enzimatik Özellikleri	7
2.5. BChE'nin İşlevleri	8
2.5.1. Esteraz aktivitesi	8
2.5.2. Aril açilamidaz aktivitesi	9
2.5.3. Peptidaz (proteinaz) veya amidaz aktivitesi	9
2.5.4. Non-enzimatik özellikleri	10
2.6. BChE'nin Fizyolojik Önemi	11
2.7. Yağ asitleri	12
2.8. HepG2 Hücrelerinin Özellikleri	13
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	15
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	15
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	15
3.1.2. Kullanılan cihazlar	15
3.2. Doğal Tip BuChE Plazmidinin Transfeksiyon İçin Hazırlanması	16
3.2.1. pRc/CMV-BChE ekspresyon vektörü	16
3.2.2. Kompetan bakterilerin transformasyonu	17
3.2.3. Midiprep ile plazmid DNA'nın saflaştırılması	18

3.2.4. Restriksiyon enzimi ile plazmidin kesilmesi	19
3.3. Hücre Kültürü	20
3.3.1. Hücrelerin çözülmesi ve ekimi	20
3.3.2. Hücrelerin pasajlanması	20
3.3.3. Hücre sayımı	21
3.4. Karaciğer HepG2 Hücrelerinde ALA ve LA İçin Uygun Dozun Belirlenmesi	24
3.4.1. Akım sitometride yapılan hücre canlılığı ön çalışması	24
3.4.2. Hücre canlılığı	26
3.5. Transfeksiyon Çalışması	27
3.5.1. Doğal tip BChE plazmidinin HepG2 hücrelerine transfeksiyonu	27
3.5.2. Kontrol ve transfeksiyon yapılmış hücre gruplarında ALA ve LA uygulaması	28
3.6. HepG2 hücrelerin Oil Red O ile boyanması	28
3.7. Gen Ekspresyonu Tayini	29
3.7.1. RNA izolasyonu	29
3.7.2. Reverse transkriptaz PCR (RT-PCR) ile cDNA sentezi	30
3.7.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	32
3.8. BChE Aktivite Tayini ve BChE Aktivite Boyaması	35
3.8.1. BChE aktivite tayini	35
3.8.2. BChE aktivite boyaması	36
3.9. İstatistiksel Değerlendirmeler	37
4. BULGULAR	38
4.1. Doğal Tip BChE Plazmidinin Transfeksiyon İçin Hazırlanması ve Kontrolü	38
4.2. İnsan HepG2 Hücre Hattının Çözülmesi Sonrası Mikroskop Görüntüsü	39
4.3. Karaciğer HepG2 Hücrelerinde ALA ve LA İçin Uygun Dozun Belirlenmesi	40
4.3.1. Akım sitometride yapılan hücre canlılığı ön çalışması	40
4.3.2. Doz-bağımlı hücre canlılığı çalışması	41
4.4. BChE Plazmidinin Karaciğer HepG2 Hücrelerine Transfeksiyonu	42
4.4.1. Akım sitometri analizi	43
4.4.2. BChE mRNA ekspresyonu	44
4.4.3. Oil Red O ile boyama sonrası ışık mikroskobu bulguları	47
4.5. BChE Aktivite Sonuçları ve BChE Aktivite Boyaması	52

4.5.1. BChE aktivite sonuçları	52
4.5.2. BChE aktivite boyaması	54
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	62
EKLER	
Ek 1. Etik Kurul Onayı	

SİMGELER VE KISALTMALAR

μ	Mikro
Å	Angstrom
A1-12	Kolinesterazların asimetrik formları
AAA	Aril açil amidaz
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AD	Alzheimer hastalığı (<i>Alzheimer's disease</i>)
Ala	Alanin
APS	Amonyum persülfat
Asn	Asparajin
Asp	Aspartik asit
BChE	Bütirilkolinesteraz
BSA	Sığır Serum Albumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BW284C51	1, 5-bis (4-allildimethylamonyum fenil)
cAMP	Siklik AMP (<i>Cyclic AMP</i>)
cDNA	Komplementer DNA (<i>complementary DNA</i>)
ChE	Kolinesteraz (<i>Cholinesterase</i>)
CMF-PBS	Kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfatla tamponlanmış tuzlu çözelti
C-ter	Karboksil-ucu
Cys	Sistein
DEPC	Dietilpirokarbonat
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNase	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksinükleotit
dsRNA	Çift zincirli RNA (<i>Double stranded RNA</i>)
DTNB	5,5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)
DTT	Ditiyotreitol

EcoRI	<i>Escherichia Coli</i> Restriksiyon enzim I
EDTA	Etilendiamin tetra-asetik asit
FCS	Fötal Dana Serumumu (<i>Fetal Calf serum</i>)
G1-G4	Kolinesterazların globüler formları
Glu	Glutamik asit
Gly	Glisin
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein (<i>High density lipoprotein</i>)
HEK	İnsan Embriyonik böbrek (<i>Human embryonic kidney</i>)
His	Histidin
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-Koenzim A
IC ₅₀	Maksimum inhibisyonun yarısını oluşturan inhibitor konsantrasyonu
IL-1	İnterlökin-1
Ile	İzolösin
iso-OMPA	Tetramonoizopropilpirofosfor-tetramide
<i>LacZ</i>	beta-Galaktozidaz geni
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LB-amp(+)	<i>Lysogeny broth-ampisilin</i>
Leu	Lösin
Lys	Lizin
Met	Metiyonin
MOPS	3-(N-morfolino) propan sülfonik asit
mRNA	Mesajcı RNA (<i>Messenger RNA</i>)
N-terminal	Amino terminal
OD	Optik Dansite
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Fosfatla tamponlanmış tuzlu çözelti (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (<i>Polymerase chain reaction</i>)
Phe	Fenilalanin

PRiMA	Prolince zengin membrana bağlama bölgesi (<i>Proline-rich membrane anchor</i>)
Pro	Prolin
RNA	Ribonükleik asit
RNAz	Ribonükleaz
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Ser	Serin
siRNA	küçük interferans RNA'sı (<i>small interfering RNA</i>)
SOC medium	Süper optimal katabolit medyum (<i>Super Optimal Catabolite medium</i>)
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TBS	Trisle fosfatlanmış tuz çözeltisi (<i>Tris-buffered saline</i>)
TE	Tris-EDTA
Thr	Treonin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
Val	Valin
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein (<i>Very low density lipoprotein</i>)
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galaktopiranozid
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Bütirikolinesterazın moleküler formları	5
2.2.	BChE'nin x ışını kristalografisi	5
2.3.	Bütirikolinesteraz geni.	6
2.4.	BChE'nin enzimatik olarak aktif bölgesi	7
2.5.	Alzheimer Hastalığı ve Bütirikolinesteraz	10
2.6.	LA ve ALA'nın molekül yapısı	12
2.7.	Esansiyel yağ asitlerinin metabolik reaksiyonları	13
3.1.	pRc/CMV vektörü içerisindeki insan BChE cDNA dizisi	16
3.2.	pRc/CMV ekspresyon vektörü gen haritası ve doğal tip insan BChE cDNA'sının klonlandığı bölge	17
3.3.	Thoma lamının mikroskopta görünümü	22
3.4.	Hücre sayımı yapılacak karışımın thoma lamına aktarılması	23
3.5.	Apoptozis tanımlama belirteçleri ile sağlıklı ve apoptotik hücreler.	25
3.6.	BChE ve β -aktin geni ve PCR'da sentezlenen bölge	32
3.7.	PCR'da kullanılan BChE ve β -Aktin primerleri ile ilgili bilgiler.	33
3.8.	Ellman reaksiyonu	36
4.1.	Transformasyon sonrası LB Amp(+) agarda çoğalan koloniler	38
4.2.	Bgl II ile kesilmiş pRc/CMV-BChE'nin %1 agaroz jel elektroforezi görüntüsü	39
4.3.	Çözülen insan HepG2 hücre hattının ekim sonrası farklı objektif büyütmelelerdeki faz mikroskop görüntüleri	40
4.4.	48-72 saat inkübasyon ile 500 μ M linoleik asit ve 50 μ M α -linolenik asit uygulamaları için akım sitometri sonuçları	41
4.5.	Alfa-linolenik asit (a) ve linoleik asitin (b) farklı dozlarındaki hücre canlılığının yüzde olarak ifadesi	42
4.6.	BChE plazmidinin karaciğer HepG2 hücrelerine transfeksiyonu sonrası 5 μ M ALA ya da LA uygulamalarının akım sitometri sonuçları	43
4.7.	Gradyent çalışması sonucu elde edilen PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü	44
4.8.	β -aktin ve BChE mRNA ekspresyonu için 61 ⁰ C'deki PCR analizi	45

4.9.	β -Aktin için yapılan PCR analiz sonucu	46
4.10.	BChE mRNA ekspresyonu için yapılan PCR analiz sonucu	46
4.11.	48 saat inkübasyon sonrası Oil Red O boyamasının X20 objektif büyütme ile ışık mikroskobu görünümü	48
4.12.	48 saat inkübasyon sonrası Oil Red O boyamasının X20 objektif büyütme ile ışık mikroskobu görünümü	49
4.13.	48 saat inkübasyon sonrası Oil Red O boyamasının X63 objektif büyütme ile ışık mikroskobu görünümü	50
4.14.	48 saat inkübasyon sonrası Oil Red O boyamasının X63 objektif büyütme ile ışık mikroskobu görünümü	51
4.15.	Transfeksiyon işlemi yapılmayan örneklerin besiyerinde BChE aktivitesi	52
4.16.	Transfeksiyon işlemi yapılan örneklerin besiyerinde BChE aktivitesi	53
4.17.	BChE aktivite boyaması sonunda elde edilen jel görüntüsü	55

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Gradyent çalışması için PCR reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları	33
3.2.	Gradyent için PCR döngüsü	34
3.3.	PCR çalışması için reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları	34

1. GİRİŞ

Kolinesterazlar inhibitör ve substratlarına gösterdikleri özgül ve seçici afiniteleri bakımından iki alt gruba ayrılan bir enzim ailesidir (1). Asetilkolinesteraz (AChE) özgül olarak asetilkolini hidroliz edebilmekte iken, butirikolinesteraz (BChE) hem asetil hem de butiril-, benzoyil-, süksinilkolin gibi birçok kolinester ve analoglarını hidroliz edebilmektedir (1, 2). Aynı zamanda inhibitörlerine gösterdikleri duyarlılık ile de birbirlerinden ayırt edilirler; BW284C51 özgül olarak AChE'yi inhibe ederken, iso-OMPA ise BChE'yi inhibe etmektedir (3).

BChE yaygın olarak beyin, akciğer, karaciğer, kalp, böbrek, kas gibi dokularda ve serum, ter, beyin-omurilik sıvısı, plevra gibi vücut sıvılarında bulunmaktadır (4-5). İnsan barsak epitel hücrelerinde de kolinesteraz aktivitesi saptanmıştır (6). BChE'nin fizyolojik rolü henüz tanımlanmamıştır fakat klinik olarak anestezi sırasında kas gevşetici olarak kullanılan süksinilkolini hidroliz etme yeteneği nedeni ile kullanım bulmaktadır (1). Son yıllarda organofosfat yapıda olan sinir gazları ve kokain, eroin gibi esterlerin kısmi hidrolizini gerçekleştirebilmesi ile bu bileşiklerle olan zehirlenmelerde normal ve mutant BChE'nin terapötik olarak kullanımına yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır (7,8). Ayrıca BChE'nin lipid metabolizmasında ve enterositlerin yenilenmesi ile intestinal villusların hareketinde rol oynayabileceği kanısına varılmıştır (9).

İnsan serum BChE'i globüler yapıda bir glikoprotein olup birbirlerine disülfid köprüleri ile bağlanmış dimerler dimeridir (10,11). Barsak BChE'i da benzer özelliklere sahiptir. G4 tetramerik, G1 monomerik, G2 dimerik formları vardır (12). Barsak BChE'nin sadece globüler formları (G1, G2, G4) saptanmıştır (6). Barsak BChE'in aktivitesinin değişik gelişim dönemlerinde farklı değerler aldığı saptanmıştır. G1 ve G4 formlarının bulunma oranındaki değişim mukoza hücresindeki BChE'i başka kökenli (örneğin; G4 formu baskın olan plazma BChE'i) BChE'lerden ayırır (13). Ayrıca barsak BChE aktivitesi, kolonda en yüksek iken jejunumda en düşük olarak saptanmıştır (6). BChE'nin lipid metabolizmasında henüz belirlenememiş bir rolü olduğu düşünülmektedir. Kutty ve diğ. (14) şişman, diyabetik ve normal fareler ile yaptıkları çalışmalarında, genetik olarak şişman veya diyabetik olan farelerin kontrollere oranla %100 – 150 kez daha yüksek BChE aktiviteleri olduğunu saptamışlardır. Ayrıca yüksek kalorili bir diyet ile beslenen

kontrol grubunda da benzer BChE aktivitesine rastlamışlardır. Diğer bir çalışmada ise hiperlipoproteinemik hastaların serumlarında BChE seviyelerindeki artışa paralel olarak HDL seviyesinin azaldığı saptanmıştır (15). Hiperlipoproteinemiye karşı kullanılan ilaçlarla fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, hidroksimetilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörü olan simvastatin'in BChE seviyelerinde azalmaya yol açtığı bulunmuştur (16). Ayrıca sedanter erkek öğrenciler ile yaptığımız egzersiz ve konjuge linoleik asit uygulamasının kan lipid profili üzerine etkilerini araştırdığımız çalışmada insan serum BChE'i ile karaciğer fonksiyonu ve plazma serbest yağ asidi arasında ilişki olduğunu gösterilmiştir (17).

Butirilkolinesteraz, karaciğer kökenli olup çok sayıda farklı bileşiği hidroliz edebildiği veya aktive ettiği için önemli bir enzimdir. Bu çalışmada insan kökenli HepG2 karaciğer hücreleri linoleik ve alfa-linolenik asit ile uyarılarak butirilkolinesteraz ile lipid metabolizması arasındaki etkileşim araştırılacaktır. Çalışma, butirilkolinesterazın lipid metabolizması ile ilişkisini aydınlatması açısından önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolinesterazlar

Kolinesterazlar özellikle asetilkolin ve bütirilkoline olan substrat seçicilikleri nedeniyle iki gruba ayrılır. Asetilkolinesteraz (AChE, asetilkolin asetilhidrolaz, EC 3.1.1.7) gerçek kolinesteraz; Bütirilkolinesteraz (BChE, açilkolin açilhidrolaz, EC 3.1.1.8) psödokolinesteraz, serum kolinesterazı ya da nonspesifik kolinesteraz olarak adlandırılır. AChE ile BChE'yi birbirinden ayıran diğer bir önemli özellik de yüksek substrat derişimlerinde AChE'nin inhibe, BChE'nin ise aktive olmasıdır (18). Enzimler seçici inhibisyonları yönünden de birbirlerinden farklılık gösterirler. AChE seçici olarak 1,5-bis (4-allildimetilaminopropilpentan-3-on-dibromür) (BW284C51) ile inhibe olurken, BChE ise 10-(2-dietilaminopropil)-fenotiyazid (etopropazin) ve tetraizopropil pirofosforamid (iso-OMPA) ile inhibisyonuna uğrar. Aminoasit dizi içeriklerinde %65 benzerlik gösteren asetilkolinesteraz ile bütirilkolinesteraz sırasıyla 7. ve 3. kromozomlarda kodlanırlar (18).

Asetilkolinesteraz (AChE), sinir sisteminde sinapslar arasındaki iletişimde rol oynayan asetilkolin bileşğini hidroliz eden bir enzimdir. Genellikle kas ve beyin sinirlerine ait sinapslarda bulunmakla beraber karboksilesteraz enzimleri ailesinin bir üyesidir. Yapısı ilk olarak 1991 yılında J.L. Sussman tarafından X-ışını ile tespit edilmiştir (19).

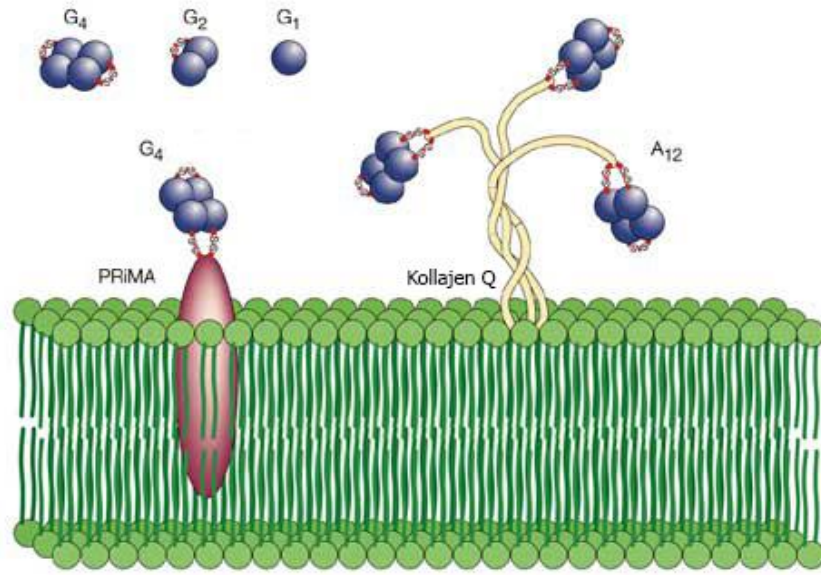
Serum bütirilkolinesteraz (BChE), karaciğerde sentezlenip dolaşıma salınmaktadır. BChE'nin klasik rolü lokal anestetik olarak kullanılan süksinilkolini hidroliz etmesidir. BChE organizmada süksinilkolini parçalayabilen tek enzimdir. Süksinilkolin, ameliyatlarda genel anestezi öncesi kısa süreli kas gevşetici olarak kullanılır. BChE, intravenöz olarak verilen süksinilkolinin %90 kadarını çok kısa bir süre içerisinde parçalayarak sinir uçlarının depolarizasyonunu önler. Atipik adı verilen bir BChE varyantına sahip kişilerde süksinilkolin, yeteri kadar hızlı hidrolize edilememekte ve bunun sonucu apne görülmektedir. Literatürde koma ve ölümle sonuçlanan vakalar da bildirilmiştir. Bu nedenle anestezi öncesi kolinesteraz aktivitesi tayini rutin olarak yapılmaktadır (1, 20).

Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri Alzheimer hastalığında önemli rol oynayan enzimlerdir. Hastalığın kesin nedeni henüz tam olarak

bilinmemekle beraber, asetilkolin eksikliği arttıkça bu hastalığın arttığının bilinmesinden dolayı, bu enzimler ile ilişkilendirilmiştir. Asetilkolinin sinaptik aralıkta daha uzun kalmasını sağlamak Alzheimer tedavisinde kullanılan yöntemlerin başında yer almaktadır. Bu amaca yönelik olarak da kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır (21).

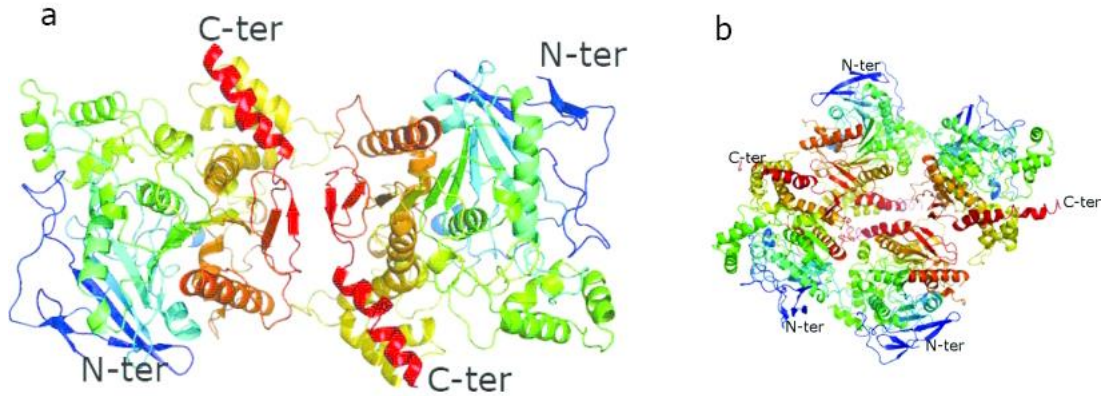
2.2. Bütirikolinesterazın Moleküler Yapısı

İnsan BChE'i, birbirine eşdeğer 85 kDa ağırlığında ve 574 aminoasitten oluşan, tetramer yapıda bir glikoproteindir. BChE'nin çeşitli moleküler formları, monomerik ve oligomerik yapılarına göre tanımlanmıştır (Şekil 2.1). Bu formlar çözünebilen monomer (G_1), dimer (G_2) ve tetramer (G_4) globüler yapılardır. İki monomerin 571. pozisyonunda bulunan sistein (Cys)'lerin disülfid bağları birbirine bağlanması dimerik (G_2) yapıyı oluşturur. İki dimer (G_2) yapının hidrofobik etkileşimler ile bir araya gelmesiyle tetramer (G_4) yapı oluşur. Bu üç moleküler formların (G_1 , G_2 ve G_4) tamamı BChE'nin simetrik, hidrofilik ve çözülebilir globüler formlarıdır. Globüler BChE, aynı zamanda bir protein bağlayıcı ile membrana bağlı tetramerleri (G_4) içeren, çözünebilen, asimetric ve membrana bağlı formlarda da bulunur. BChE'yi membrana bağlayan, proline zengin membrana bağlayıcı (PRIMA) bir protein olup, katalitik alt birimlerin oligomerizasyonunu sağlar. Ayrıca, kollajen bir bağlayıcı ile membrana tutunarak, katalitik alt birimlerin tetramerlerini içeren, asimetric kollajen-kuyruklu BChE formları da bulunmaktadır. Kollajen-kuyruklu formdaki tetramer A_4 , iki tetramer A_8 formunu ve bu tetramerlerin üç tanesi A_{12} formunu oluşturur. BChE'i bu heteromerik multimerler içerisinde toplayan kollajen Q, amino (N) ucunda bulunan proline zengin bağlama bölgesi sayesinde bu yapıların ekstraselüler matrikste bir araya gelmelerini sağlar (22).



Şekil 2.1. Bütirilkolinesterazın moleküler formları (22).

Plazmada bulunan BChE'nin, monomer (G_1) ve dimer (G_2) formları da bulunmakla beraber %90'ı G_4 formundan oluşur. BChE'nin protein yapısının X-ışını kristalografisi Şekil 2.2'de verilmiştir.



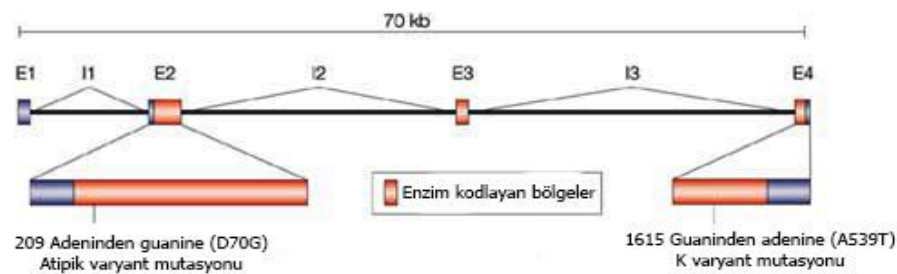
Şekil 2.2. BChE'nin x ışını kristalografisi: a. Dimer yapısı b. Tetramer yapısı (22)

BChE kristalografi görüntüsündeki mavi ile gösterilen yapı N-ucu iken kırmızı ile gösterilen ise C-ucu'dur. Dimer ve tetramer yapılarında görüldüğü gibi monomerler birbirine göre simetrik dizilmiştir.

2.3. Bütirilkolinesterazın Genetik Özellikleri

İnsan BChE enziminin katalitik alt ünitesi tek bir gen tarafından kodlanmasına rağmen kromozomlarla yapılan in situ hibridizasyon çalışmalarında 3. ve 16. kromozomlarda lokalize iki bölge bulunmuştur (24, 25). 3q2b bandında saptanan ve E1 adı verilen lokusun katalitik alt üniteye karşılık geldiği Gnatt ve diğ. (26) tarafından belirlenmiştir.

BChE geni 70 kilobaz uzunluğunda bir gendir (Bkz. Şekil 2.3). Gen, yapısında 3 intron ve 4 ekzon içerir. Genin proteine kodlanan kısmı 2416 baz uzunluğundadır. Aktif enzim ise 574 aminoasit içerir. Ekzon 1'de başlama kodonu bulunur. Oldukça uzun olan BChE geninde, olgun proteinin N ucu ve aktif merkezde yer alan Ser 198 dahil 478 aminoasit ikinci ekzonda kodlanmıştır. Üçüncü ekzon 167 aminoasit uzunluğundadır. Ekzon 4 ise C ucunu kodlar (24).



Şekil 2.3. Bütirilkolinesteraz geni. Kromozom 3'ün 70 kbaz'lık bölümünü oluşturan BChE geni, 4 ekzon (E1, E2, E3, E4) ve 3 intron (I1, I2, I3) içermektedir (22).

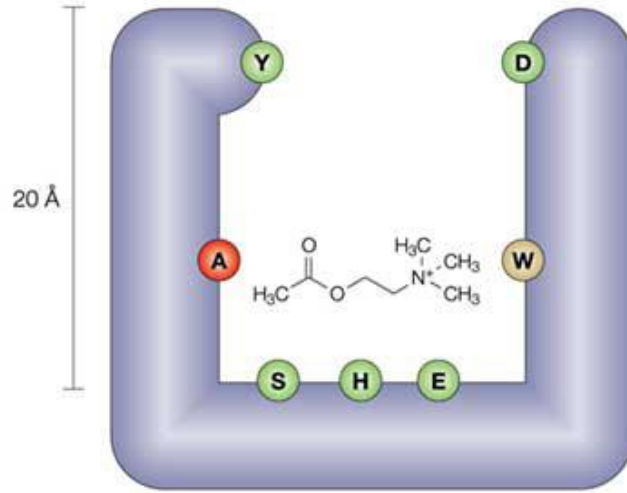
BChE çok sayıda allelik varyantı bulunan bir enzimdir. Birçok varyantın şifreleyici dizideki nokta mutasyonlarından kaynaklandığı bulunmuştur. BChE varyantlarından en çok ilgi uyandıranı Asp70→Gly nokta mutasyonunun görüldüğü ve "atipik" adı verilen varyanttır. Atipik enzimin süksinilkolin yıkım hızı normal enzime göre çok azalmıştır. Ayrıca atipik varyant domates, patates, patlıcan gibi sebzelerde bulunan doğal kolinesteraz inhibitörleri olan *α-solanine* ve *α-chaconine* tarafından inhibisyona uğramamaktadır (27-29). Asp70→Gly varyantının bu

sebzelere ağırlıklı olarak diyetlerinde kullanan toplumlarda sık görülmesinin evrimsel bir avantaj sağladığı düşünülmektedir.

Kanser üzerine yapılan çalışmalarda gen amplifikasyonu olduğu ve bu artışın tümör oluşumuna katkıda bulunduğu gözlenmiştir. Brass ve diğ. (29) küçük hücreli akciğer kanserinde 3q2b bandı üzerinde bulunan BChE geninin amplifikasyona uğradığını saptamışlardır.

2.4. BChE'nin Enzimatik Özellikleri

BChE, AChE'de olduğu gibi her monomerde 20Å derinliğinde ve yaklaşık 55 aminoasit birimi ile çevrelenmiş aktif bölgede dar bir oluk bulunur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. BChE'nin enzimatik olarak aktif bölgesi (22).

Aktif merkezin esteratik bölgesinde bulunan katalitik üçlüde Serin198 (S), Histidin438 (H) ve Glutamik asit325 (E) aminoasitlerinden oluşur. Substratların açıl grubu (şekilde asetilkolin molekülü gösterilmiş) açıl cebine yerleşirken (A), pozitif yüklü kuaterner amonyum grubu triptofan (W) aminoasitinden oluşan anyonik bölge ile etkileşir. Kolin türevli substratlar, oluşun ağızındaki aktif bölgede bulunan aspartik asit (D) ve tirozin (Y) aminoasit kalıntıları ile etkileşerek, aktif merkeze doğru yönlendirilir.

BChE yapı ve fonksiyon olarak AChE ile ilişkilidir. AChE'nin ve BChE'nin aktif bölge olukları yapısal benzerlik gösterir. Aralarındaki fark, AChE'in aktif merkez oluşunu sınırlayan on dört aromatik aminoasitten altısının yerlerini BChE'de alifatik aminoasit birimlerine bırakmış olmalarıdır. Bu durum BChE aktif merkez oluk hacminin (500 \AA^3) AChE'ninkinden yaklaşık 200 \AA^3 daha büyük olmasına yol açmanın yanında, iki enzimin substrat seçiciliklerinden ve değişik inhibitörlere olan seçici duyarlılıklarından da sorumludur. BChE'ye özgü inhibitörler AChE'ye özgü inhibitörlerden daha büyük molekül yapısına sahiptirler (30).

2.5. BChE'nin İşlevleri

BChE bütirikolin, asetilkolin ve süksinilkolin gibi kolin esterlerinin hidrolizini katalizler. BChE, AChE'e göre daha az etkili olsa da asetilkolini hidrolizlediği bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda BChE'nin, kokain, asetilsalisilik asit (aspirin) ve eroin gibi diğer esterlerin hidrolizini de katalizlediği gösterilmiştir (31-33). BChE bazı aromatik aminlerin açıl amidlerinin hidrolizini katalizlediği açilamidaz aktivitesine de sahiptir (34).

2.5.1. Esteraz aktivitesi

Kolinesterazlar çok benzer moleküller olmalarına rağmen, yapıları arasındaki farklılıklar substratlarının farklılığına, bu da kinetik özelliklerinin değişmesine neden olmaktadır. AChE ACh'yi diğer kolin esterlerinden daha etkin hidroliz ederken, BChE bütiril-, propiyonil-, vareril- gibi birçok ester türevlerinin hidrolizini çok daha etkili yapmaktadır.

BChE'nin diğer önemli esteraz aktivitesi, organofosfat ve karbamat yapılı bileşiklerin asetilkolinesteraza ulaşmadan dolaşımdan temizlenmesinde ve asetilkolinesteraz yokluğunda kolinerjik sinir sisteminin kontrolünde rol oynar. Ayrıca, kokain, aspirin, amitriptilin gibi bazı ilaçların hidrolizinde veya bambuterol, eroin gibi bazı ilaçların aktivasyonunda da BChE'nin esteraz aktivitesi önemlidir (18, 35).

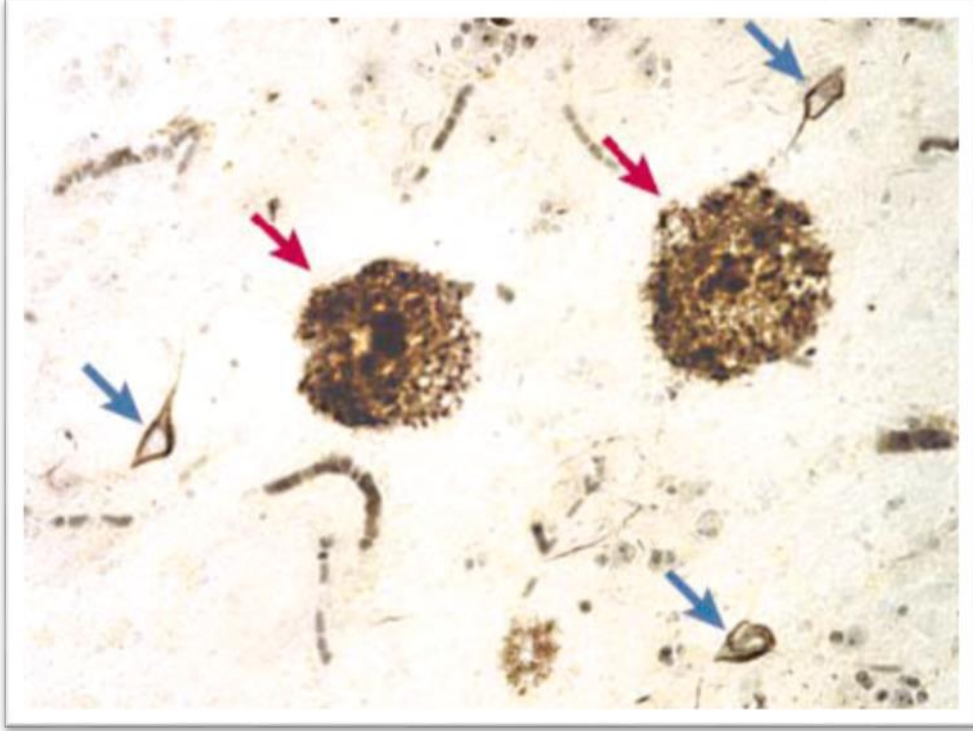
2.5.2. Aril açilamidaz aktivitesi

BChE bilinen esteraz aktivitesine ek olarak, bazı aromatik aminlerin açil amidlerini hidroliz ederek aril açilamidaz (AAA) aktivitesi de göstermektedir. Bu katalizin biyolojik fonksiyonu henüz tanımlanmamıştır (36). Aril açilamidaz (AAA) aktivitesinin tayininde substrat olarak N-(4-nitrofenil)asetamid kullanılmaktadır. Enzim, substratın amid bağına hidroliz ederek, 4-nitroanilin ve asetaldehit ürünlerinin oluşumuna yol açar. BChE'nin AAA aktivitesinin beyinin erken gelişiminde ve Alzheimer hastalığında amiloid plak oluşumunda rolü olduğuna dair bazı kanıtlar mevcuttur (37, 38). Yaygın olarak kullanılan birçok kimyasal (ilaçlar: asetaminofen, fenasetin, flutamid, izokarboksazid, lidokain; pestisid: asefat; herbisidler ve fungusidler: asetoklor, propanil ve butaklor) aril açilamid yapısındadır. BChE'nin plazma ve dokulardaki AAA aktivitesi, bu yapıdaki ilaçların ve ksenebiyotiklerin metabolizmasında rol oynar. Son yıllarda yapılan kinetik ve yapı-aktivite ilişkileri ile anilid ve esterlerin hidrolizinde aynı katalitik bölgenin kullanıldığı gösterilmiştir (38).

2.5.3. Peptidaz (proteinaz) veya amidaz aktivitesi

Alzheimer hastalığı (AD), beynin hipokampus ve korteks bölgelerinde geri dönüşümsüz nöron kaybı ile ortaya çıkan, geri dönüşümsüz, ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığın yaygınlığı ve sıklığı yaşın ilerlemesi ile artar. 65 yaşa kadar %1-2 oranında ortaya çıkan hastalığın görülme sıklığı 85 yaş ve üzerinde %35'lere kadar yükselir. Serebral kortekste kolinerjik hasar hastalıkta gelişen bilişsel ve davranışsal rahatsızlıklara neden olur. Semptomlar hafıza kaybı, konuşma, yön bulma, karar verme, düşünme ve yorumlamada zorluklar; kişilik ve davranış bozuklukları ile karakterizedir. Hastalık β -amiloid proteininin serebral kortekste birikmesinin yanında, nöron ve sinapsların dramatik kaybı ile de karakterizedir (39). BChE, bu hastalığın gelişmesi ve ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. AD'nin histopatolojik belirteçleri olan amiloid plaklar, nörofibriler yumaklar ve amiloid anjiyopatili veziküller, BChE ekspresyonunu artırır (Şekil 2.5). BChE esteraz aktivitesinin yanında peptidaz aktivitesine de sahiptir (37, 40). Alzheimer hastalığında BChE, normalde beyinde bol miktarda bulunan amiloid öncül proteinini β -amiloid proteine parçalar. Daha sonra β -amiloid proteinler çöker

ve β -amiloid plaklar meydana gelir (37). Alzheimer hastalarının beyin omurilik sıvısında glikolizasyon düzeyi değişmiş BChE'nin spesifik bir formunun bulunduğu ve bu formun hastalığın tanısında kullanılabilirlik spesifik ve hassas bir belirteç olduğu rapor edilmiştir (37, 41).



Alzheimer hastalarının beyin kortekslerindeki β -amiloid plak (kırmızı ok) ve düğümleri (mavi ok) etrafında bulunan bütirikolinesteraz enzimi.

Şekil 2.5. Alzheimer Hastalığı ve Bütirikolinesteraz (22)

Alzheimer hastalarının beyin kortekslerindeki β -amiloid plak ve düğümlerinde normal insana göre artmış BChE aktivitesi gözlenmektedir.

2.5.4. Non-enzimatik özellikleri

BChE, Schwann hücrelerinin miyelin kılıflarında bulunmaktadır. Bazı kolinesteraz inhibitörlerinin demiyelinizasyona yol açtığı gözlenmiş ve bu gözlemden yola çıkarak BChE'nin miyelin kılıfının korunması ve hatta tutunmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür (42).

Escalera ve diğ. (43) Drosophila'dan nörotaktin adı verilen bir transmembran proteininin BChE'ye benzediğini saptamışlardır. Nörotaktin bir sinir hücresi yapışma

molekölü olup HNK-1 adı verilen bir şeker epitopu içermektedir. Tavuk serum, beyin BChE'i ve Torpedo AChE'i HNK-1 epitopu taşımaktadır. Bu nedenle BChE'nin sinir hücresi yapışma molekölü özelliğine sahip olabileceği düşünülmektedir.

2.6. BChE'nin Fizyolojik Önemi

BChE serumda bulunduğu ve karaciğerde sentezlendiği için, beslenme düzeyi, inflamasyon varlığı, nörofizyolojik bozukluklar ve tümör gelişimi gibi pek çok patolojik durumda dokulardaki, özellikle serumdaki düzeyi değişmektedir (45). Total protein ve albümin düzeyleriyle beraber karaciğer sentez kapasitesinin göstergesi olup, pek çok metabolik hastalıkta, tanı koydurucu belirteçlerden biri olarak kullanılmaktadır (46). Kolinesterazlarla ilişkilendirilen hastalıklar başlıca; astım, Myasthenia gravis, Alzheimer hastalığı, kokain zehirlenmesi, organofosfat zehirlenmeleri, anestezi apne, romatroid artrit ve küçük hücreli akciğer kanseri olarak özetlenebilir (47).

BChE'nin lipid metabolizmasında henüz belirlenememiş bir rolü olduğu düşünülmektedir. Kutty ve diğ. (14) şişman, diyabetik ve normal fareler ile yaptıkları çalışmalarında, genetik olarak şişman veya diyabetik olan farelerin kontrollere oranla %100 – 150 kez daha yüksek BChE aktiviteleri olduğunu saptamışlardır. Ayrıca yüksek kalorili bir diyet ile beslenen kontrol grubunda da benzer BChE aktivitesine rastlamışlardır. Diğer bir çalışmada ise hiperlipoproteinemik hastaların serumlarında BChE seviyelerindeki artışa paralel olarak HDL seviyesinin azaldığı saptanmıştır (15). Hiperlipoproteinemiye karşı kullanılan ilaçlarla fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, HMG-CoA redüktaz inhibitörü olan simvastatin'in BChE seviyelerinde azalmaya yol açtığı bulunmuştur (16). Son yıllarda yapılan bir çalışmada, bütirikolinesteraz gen eksikliği sağlanan farelerde yüksek yağ içerikli diyetin, obeziteye yol açtığı görülmüştür (44).

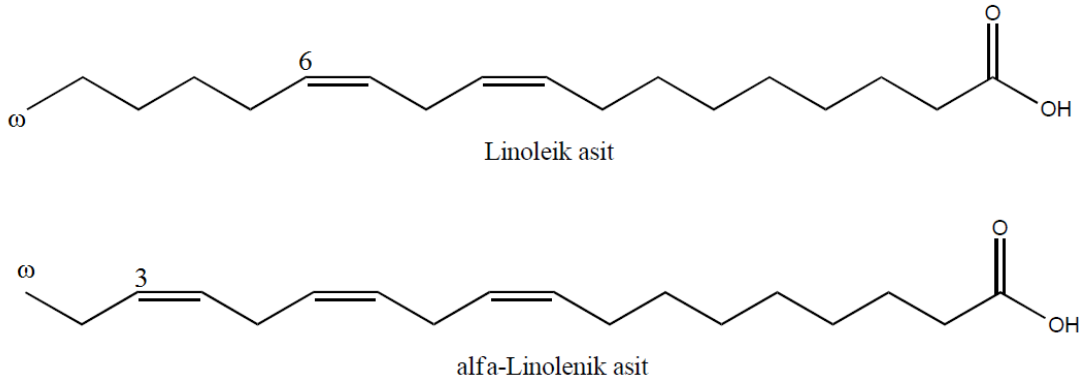
L'Hermite ve diğ. (9)'nin yaptığı çalışmada sıçan barsağı epiteli kript hücreleri ve villuslarda BChE varlığını saptamıştır. Bu çalışmada enterositlerdeki BChE dağılımı, bu dokuda sentezlenip ekzositoz yolu ile hücreler arası boşluğa salınan ve BChE içeren lipid damlacıkları ile gösterilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak araştırmacılar, BChE'nin lipid metabolizmasında ve enterositlerin

yenilenmesi ile intestinal villuslara hareketinde rol oynayabileceği kanısına varmışlardır.

2.7. Yağ asitleri

Yağ asitleri fonksiyonel grupları $-\text{COOH}$ olan organik bileşiklerdir. Yapısal formüllerini oluşturan karbon zincirleri arasındaki bağ durumuna bağlı olarak doymuş veya doymamış yağ asitleri olarak adlandırılırlar. Yapısında tek çift bağ bulunduranlar tekli doymamış, iki veya daha fazla çift bağ bulunduranlar ise çoklu doymamış yağ asitleri olarak adlandırılırlar.

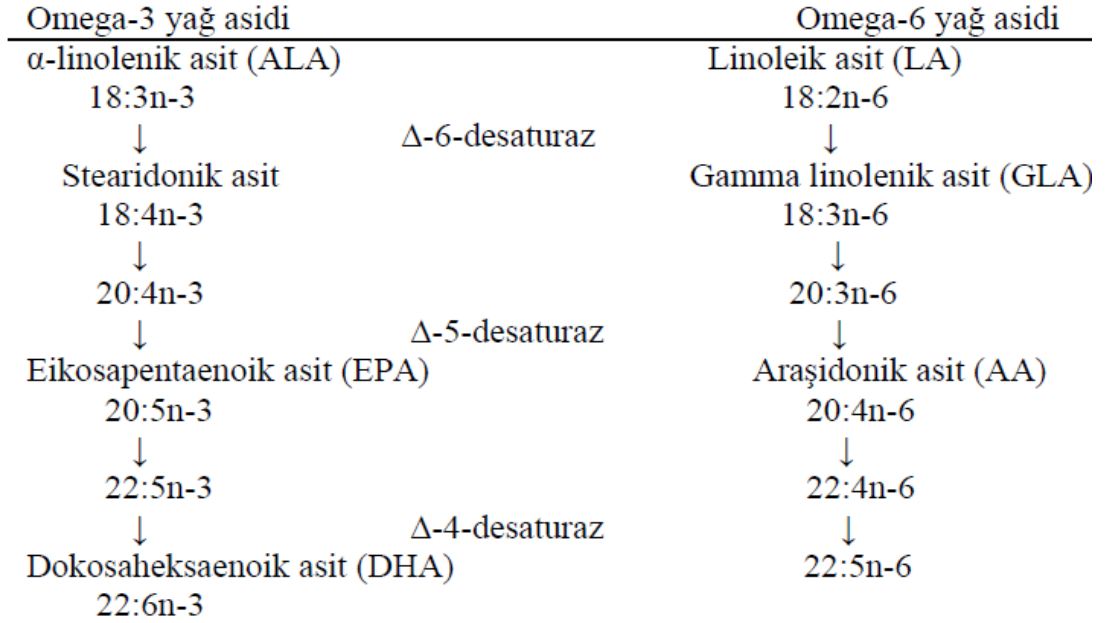
İnsanlar ve diğer memeli hayvanlarda, omega (ω) grubundan itibaren en fazla 9. ve 10. karbonlar arasında çift bağ oluşturabilecek desaturaz enzimi bulunmaktadır. Bundan dolayı insanlar ve hayvanlarda sadece ω -9 sınıfı tekli doymamış yağ asiti olan oleik asit ($18:1n-9$) sentezlenebilmektedir. ω -3 ve ω -6 yağ asitleri sentezlenemediğinden mutlaka diyet yoluyla dışarıdan alınması gereklidir. İşte organizmada sentezlenemeyen ve besinler yoluyla birlikte alınması gerekli olan 18 karbonlu linoleik (LA, $18:2$, ω -6, cis,cis,9,12-oktadekadienoik asit) ve α -linolenik (ALA, $18:3$, ω -3, cis,cis,cis,9,12,15-oktadekatrienoik asit) (Şekil 2.6) asitlere esansiyel yağ asitleri denir (48).



Şekil 2.6. LA ve ALA'nın molekül yapısı

ω -6 yağ asitlerinin kaynağı olan LA dihomo-gamma-linoleik asit (DGLA) ve araşidonik (AA) asitin öncül molekülüdür. DGLA 1. grup prostaglandinlerin oluşumunu sağlar (Şekil 2.7). AA ise proinflatuvar mediyatörlerin, 2. grup prostaglandinler ve 4. grup lökotrienlerin sentezlenmesini sağlar. ω -6 tipi

eikosanoidler (tromboksanlar, prostaglandinler ve lökotrienler) kan damarlarının daralmasına, trombosit çökmesine ve pıhtılaşmasına yardım eder, enflamasyon üzerine etki gösterir ve düz kasların kasılmasını sağlar (48-50).



Şekil 2.7. Esansiyel yağ asitlerinin metabolik reaksiyonları (48).

2.8. HepG2 Hücrelerinin Özellikleri

HepG2 (insan hepatoselüler karsinoma) daimi hücre hattı, 15 yaşında iyi derecede farklılaşma gösteren hücelere sahip olan Amerikalı beyaz bir erkeğin hepatoselüler karsinoma örneğinden hazırlanmıştır. HepG2 çeşitli türlere ait ölümsüz hücre hatları çalışma ve kültürü bakımından diğer hücre hatlarına göre daha kolay olması bakımından tercih edilmekte ve in vitro modellemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Plazma proteinlerinin büyük bir kısmını üretebilmesi, biyosentetik özelliklerinin normal hepatositlere benzerliği, hücre yüzey reseptörlerini koruyabilmesi, kullanılan proteinleri (Örneğin; sitokin-IL6) işleyebilmesi, metal ve organik bileşiklere maruz kaldığında metalotiyonin (MT) oluşturması, yüksek-düşük yoğunluklarda lipoproteinlerin sentezlenmesi-salınması, serumsuz besiyerinde üretilmesi durumunda ise karaciğere özel çeşitli serum proteinlerini üretebilmesi, sitokrom p450 (CYP450)" ye bağımlı monooksijenaz enzimlerine sahip olması ve glukuronat-sülfatla birleşme tepkimelerini gerçekleştirebilmesi sonucu

detoksifikasyon işlemlerinde gerekli olan normal biyotransformasyon etkinliklerinin çoğunu yapmakta ve dolayısıyla in vitro toksisite modellemesi olarak yaygın kullanılmaktadır (51). HepG2 hücreleri birçok bitki sitotoksitesisi araştırmalarında da kullanılmıştır (52-54).

Bu çalışmada insan serum butirilkolinesterazı ile lipid metabolizmasının araştırılmasında, barındırdığı özellikler nedeni ile HepG2 hücreleri kullanılmıştır. HepG2 hücrelerine esansiyel yağ asitleri olan linoleik asit (LA) ve α -linolenik asit (ALA) uygulamaları ile hem hücre yapısına olan etkileri hem de BChE ifade arttırımı ile lipid metabolizması arasındaki ilişki araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Doğal tip insan BChE komplementer DNA (cDNA) dizisini içeren pRc/CMV ekspresyon vektörü, Prof. Oksana Lockridge'den (Nebraska Üniversitesi Tıp Fakültesi, ABD) temin edildi. Plazmid DNA saflaştırma kitleri (QIAprep Spin Miniprep kit ve QIAprep Spin Midiprep kit), QIAGEN (Almanya); HST08(Stellar™) elektrokompetan E. Coli, Clontech (A.B.D); transfeksiyon reaktifi DharmaFECT® Duo, Thermo Scientific (A.B.D); restriksiyon enzimi Bgl II (10 000 U/ml), One Taq master mix ve Protoscript cDNA sentez kit, New England Biolabs'dan (İngiltere) satın alındı. BChE dizi analizi çalışmaları için tasarlanan tüm oligonükleotidler, Sentromer DNA Teknolojileri (Türkiye) tarafından sentezlendi.

İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2 (ATCC No: HB-8065), ATCC'den temin edildi. DMEM, fosfatla tamponlanmış tuzlu çözelti (PBS, Phosphate Buffered Saline), %0.25 (w/v) Tripsin-EDTA ve Penisilin-Streptomisin Solüsyonu, Lonza (İsviçre); *Fetal Bovine Serum*, Gibco'dan (A.B.D) temin edildi. Sodyum asetat, amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ Analar (İngiltere); potasyum monohidrojen fosfat (K₂HPO₄) ve sodyum klorür (NaCl) Panreac'dan (İspanya); agaroz, Prona (İspanya); agar, Tripton ve maya ekstresi, Oxoid-Thermo Fisher (İngiltere); bakır sülfat (CuSO₄) İlsan'dan (Türkiye); Bradford Reaktifi kiti, BioRad (ABD); akım sitometri analizleri için FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences'dan (A.B.D) temin edilmiştir.

Diğer tüm kimyasallar, Sigma-Aldrich veya Merck (Almanya) kaynaklıydı.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

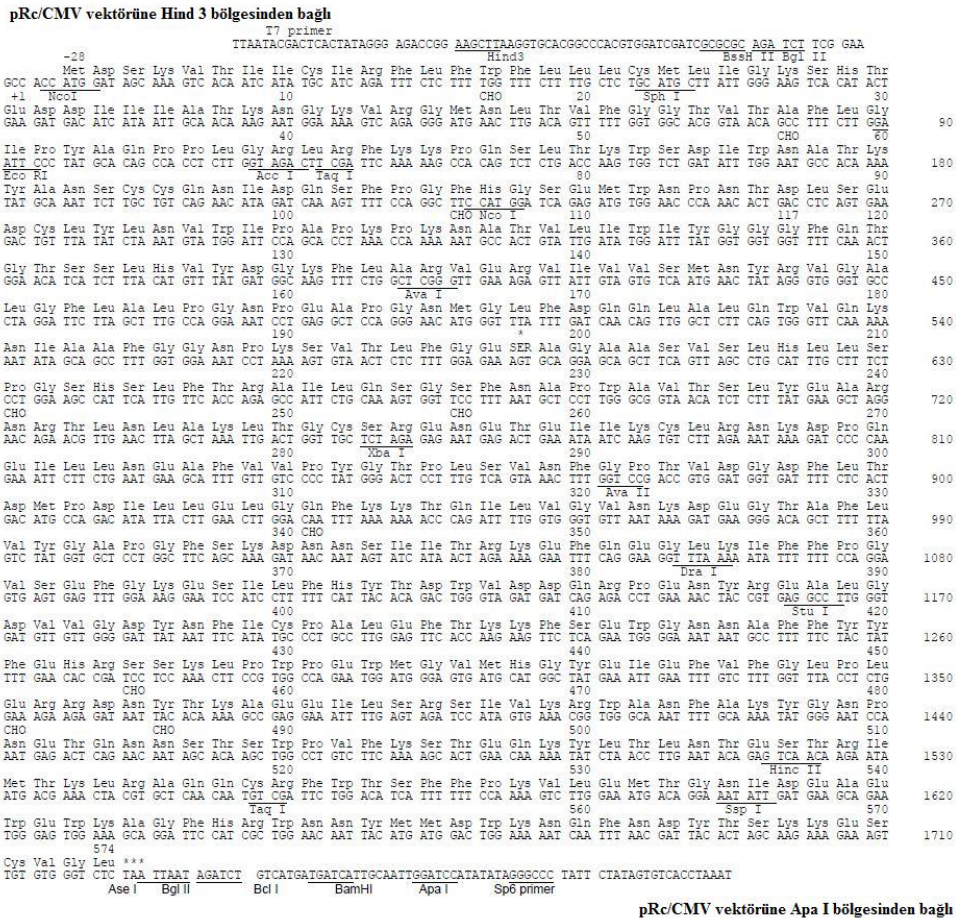
Spektrofotometrik analizlerde, Shimadzu UV1700, Shimadzu UV mini 1240 model spektrofotometre ve Spectramax M2 mikropilaka okuyucusu kullanıldı. Akım sitometri analizlerinde the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSAria™ System cihazı, BD Biosciences kullanıldı.

Deneyleerde kullanılan diğler cihazlar, Mettler Toledo analitik terazisi, Consort pH metre, ısıtıcı ve FinePCR SV12 inkübatörü, Nikon TMS inverted mikroskop, HERA Cell inkübatör, Thoma lamı, Biorad iCycler pcr cihazı, Biorad mini protean 3 elektroforez kiti ve güç kaynağı, Gilson pipetler ve pipet uçları; eppendorf 5417R ve Hanil Supra 21K soğutuculu yüksek hızlı santrifüj kullanıldı.

3.2. Doğal Tip BuChE Plazmidinin Transfeksiyon İçin Hazırlanması

3.2.1. pRc/CMV-BChE ekspresyon vektörü

Doğal tip insan BChE cDNA'sı, pRc/CMV vektörüne, Hind 3 ve Apa I bölgesinden bağlıdır. pRc/CMV vektörü 5.5 kb uzunluğunda olup BChE geni (1.8 kb) ile birlikte toplam 7.3 kb uzunluğundadır. BChE geninin nükleotid dizisi ve 5' ve 3' ucundaki kesim yerleri gösterilmiştir (Şekil 3.1).

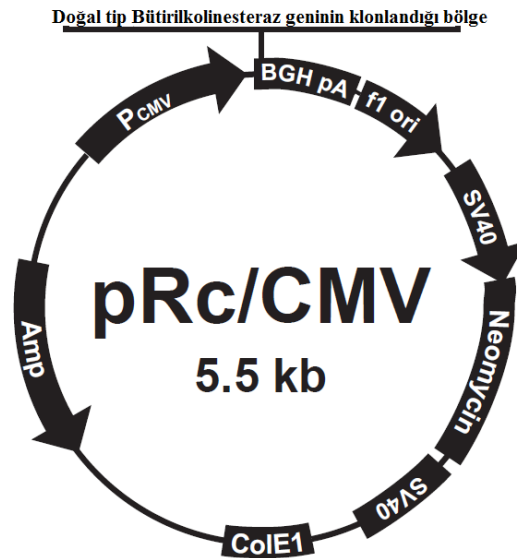


Şekil 3.1. pRc/CMV vektörü içerisindeki insan BChE cDNA dizisi

3.2.2. Kompetan bakterilerin transformasyonu

Doğal tip insan BChE cDNA'sı içeren pRc/CMV ekspresyon vektörü (Şekil 3.2) ve puc19 kontrol plazmidini, E.coli HST08 (Stellar™) kompetan bakteri hücrelerine ısı şok yöntemi ile aktarıldı:

1. -80°C 'de tutulan HST08 kompetan bakteri ve pRc/CMV-BChE plazmidini buz üzerinde tamamı çözününceye kadar bekletildi.
2. 1-5 ng pRc/CMV-BChE plazmidini (1-5 μl) ile ependorf tüp içerisinde bulunan 50 μL HST08 kompetan hücre karıştırıldı. 30 dakika buz üzerinde bekletildi.
3. 42°C 'de 45 saniye ısı şoku yapıldı (zar geçirgenliğini azaltmak için) ve ardından karışım 1-2 dakika buz içinde bekletildi.
4. 37°C 'de önceden ısıtılmış olan SOC besiyerinden 300-400 μL eklendi. Karışım 60 dakika 37°C 'de karıştırıcılı inkübatörde (160-225 rpm) inkübe edildi.
5. 50-100 μL *Lysogeny broth-ampisilin(+)* [LB-Amp(+)] agar plakların ortasına pipetlendi, öze ile bütün plağa yayıldı. 37°C 'de 16 saat inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrasında plaktan 1 koloni seçildi. LB-Amp(+) besiyerinde (5ml) çoğaltılarak plazmid DNA'sı HST08 bakterilerinden, Qiagen midiprep kit kullanılarak saflaştırıldı.



Şekil 3.2. pRc/CMV ekspresyon vektörü gen haritası ve doğal tip insan BChE cDNA'sının klonlandığı bölge

3.2.3. Midiprep ile plazmid DNA'nın saflaştırılması

Qiagen plazmid saflaştırma protokolünde, alkali ortamda bakterilerin parçalanmasını takiben plazmid DNA uygun pH ve düşük tuz konsantrasyonunda anyon değiştirici reçineye bağlanır. RNA, proteinler, boyalar ve düşük molekül ağırlıklı safsızlıklar orta dereceli tuz konsantrasyonu ile yıkanarak uzaklaştırılır ve plazmid DNA yüksek oranda tuz içeren tampon ile elüe edilir. Elde edilen DNA eluatu izopropanol eklenerek çöktürülür. Pellet %70 etanol ile yıkanıp kurutulduktan sonra istenilen miktarda TE eklenerek DNA çözülür.

1. Gliserol stoktan transforme hücreler alınıp sıvı LB (ampisilinli) içine eklendi, ya da plaktan tek koloni alındı ve 5ml LB'de (ampisilinli) gece boyunca üremeye bırakıldı.
2. İnkübasyon sonrasında bakteri kültürü (1ml) 90 ml ampisilinli LB sıvı besiyerine ekildi; 200-250 rpm'de 37 °C'de, 16 saat inkübe edilip çoğaltıldı.
3. 6 000 x g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
4. Pellet 6 mL P1 tamponunda (50 mM Tris/HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNAz A) resüspanse edildi.
5. 6 mL P2 (lizis) tamponu [(200 mM NaOH, %1 SDS (w/v))] eklendi, 6-7 defa alt-üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. 6 mL soğuk P3 (nötralizasyon) tamponu (3.0 M potasyum asetat pH 5.5) eklendi, 6-7 defa alt-üst edilerek karıştırıldı ve 15-20 dk buzda bekletildi.
7. Karışım, 4°C'de, 20 000 x g'de 30 dakika santrifüj edilerek plazmid DNA'yı içeren süpernatant alındı. Partikül içermeyen berrak bir çözelti elde etmek için süpernatant gerektiğinde tekrar 4°C'de 20 000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi, süpernatant alındı.
8. QIAGEN-tip 100 kolonu 6 ml QBT tamponu [(750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; %15 isopropanol (v/v); %0.15 Triton® X-100 (v/v))] ile dengelendi ve yer çekimi etkisi ile tamponun akmasına izin verildi.
9. Süpernatant yüklendi ve yer çekimi etkisi ile plazmidi içeren süpernatantın reçineye girmesi sağlandı.
10. Kolon 3 defa, her seferinde 10 mL QC (yıkama) tamponuyla [(1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; %15 isopropanol (v/v))] yıkandı.

11. Altta biriken sıvı atıldı.
12. Kolona tutunmuş plazmid DNA'sı, 8 mL QF (elüsyon) tamponu [(1.25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; %15 isopropanol (v/v)] yüklenerek elue edildi.
13. Elüe edilen plazmid DNA'sı üzerine 0.7 hacim (5.6 mL) izopropanol eklenip 8-10 defa alt-üst edilerek karıştırıldı; 4°C'de 15 000 x g'de 30 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
14. Pellet 3 mL %70 etanol ile yıkandı ve 4°C'de 15 000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
15. 5-10 dk etanolün uçması için oda sıcaklığında bekletildi ve plazmid DNA 100 µL TE eklenerek çözüldü.

Elde edilen plazmid DNA'nın konsantrasyonu 260 nm'de absorbans ölçülerek aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{seyreltme faktörü} \times 50\mu\text{g/ml}$$

(Çift zincirli DNA molekülü için, 1 optik dansite (OD) 50 µg/ml'ye karşılık gelmektedir.)

DNA saflığı ise A_{260}/A_{280} oranı ile belirlendi.

3.2.4. Restriksiyon enzimi ile plazmidin kesilmesi

A_{260}/A_{280} oranı DNA'nın saflığının ölçüsüdür ve 1,5-2 arasında olması beklenir. Saflaştırılan doğal tip BChE plazmidi için 260 ve 280 nanometrede absorbans ölçüldü. BgI II restriksiyon enzimi ile kesilecek örneğimizde A_{260}/A_{280} oranı 1,94 olarak saptandı. Yaklaşık 0.5 µg Doğal tip BChE plazmid DNA (2µL), 1µL 0.1 mg/ml BSA içeren 10x restriksiyon enzim tamponu (Neb tamponu 3: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiyotritol pH 7.9), 6.5 µL distile su, 0.5 µL restriksiyon enzimi (BgI II) eklenerek +4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Kesim sonunda tepkime ortamından 5 ve 10 µL'lik örnek alınarak %1'lik agaroz jelde yürütüldü (90 Volt 1 saat).

3.3. Hücre Kültürü

3.3.1. Hücrelerin çözülmesi ve ekimi

- Öncelikle bir beher içine distile su konup 37-40°C'ye kadar ısıtıldı.
- -192°C sıvı azot tankında bulunan HepG2 hücreleri tanktan çıkarıldı.
- Dondurulmuş kriyoviyal (dondurma tüpü) tüp buz üzerinde, ısınan su banyosu yanına taşındı ve tüp su banyosunun içine konuldu.
- Kriyoviyal tüp 1-2 dakika şok ile ısıtıldıktan sonra su banyosundan alınıp temiz havlu kağıt ile kurulanıp çevresi %70 etanol ile temizlendi.

Daha sonraki işlemlerin tamamı dikey laminar hava akımlı kabinde steril koşullarda yapıldı.

- 15 ml'lik falkon tüp içerisine, HepG2 için (55) hazırlanan besiyerinden (%10 ısı ile inaktive edilmiş FCS (fötal dana serumu), %1 penisilin/streptomisin ve 2 mM L-Gln içeren düşük glukozlu DMEM) 7-9 ml konuldu.
- İçeriği tamamen eritilmiş HepG2 hücreleri kriyoviyal tüpten pipetle çekilip falkon tüp içerisindeki besiyerine eklendi ve 250 x g'de 5 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant kısım pipetle çekilerek atıldı. Tüpün dibinde kalan pellet üzerine besiyeri eklenip, pipetaj yapılarak resüspanse edildi.
- Tüpte oluşan hücre-besiyeri karışımı pipetle çekilerek kültür flasklarına ekildi.
- Faz kontrast mikroskopta hücreler kontrol edilip görüntü alındı. Daha sonra kültür kaplarının kapağı gevşetilerek %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de inkübe edildi.

Hücreler kültür kabına yapıştıktan sonra (yaklaşık 48 saat) besiyeri değiştirildi. Daha sonra haftada 2 gün besiyeri tazelenerek pasajlamaya uygun sayıya erişmeleri beklendi.

3.3.2. Hücrelerin pasajlanması

- Kültür kapları kontrast mikroskopta incelendi. Hücrelerin canlılığı ve pasajlama zamanının gelip gelmediği değerlendirildi.

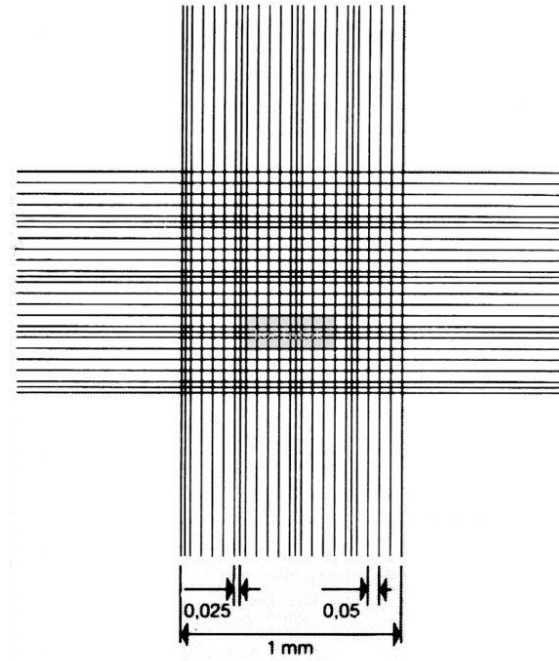
- Pasaj yapılacak hücre yoğunluğuna erişmiş kùltùr kabının hücre olmayan kùřesine biriktirilen besiyeri, pastùr pipeti ile çekildi.
- Hücreler 12 ml CMF-PBS (Kalsiyum ve magnezyum içermeyen tuzlu fosfat tamponu) ile yıkandı.
- 2-3 ml %0.25 (w/v) Trypsin-EDTA çùzeltisi kùltùr kabına eklendi. 37°C'de etùvde hücreler kalkana kadar (yaklaşık 5 dakika) bekletildi.
- Etùvden alınan hücrelerin trypsin ile muamele sonrası kalkıp kalkmadığı mikroskopta değerlendirildi.
- Pipet ile hücreler ve trypsin bir tùpe alındı; üzerine bir miktar serumlu besiyeri eklendi. Buradaki amaç trypsinin etkisinin ortadan kalkmasını sağlamak ve hücrelerin bu proteolitik enzimden zarar görmelerini engellemektir.
- 250 x g'de 5 dakika santrifùj edildi.
- Hücreler kùltùr kabından toplandıktan sonra kùltùr kabı mikroskopta incelenerek içinde hücre kalmadığından emin olunmalıdır. Olası hücre kayıpları yanlış rakamsal değerler elde etmemize sebep olur.
- Santrifùj sonrası tùpün dibinde oluşan hücre pelletinin üstündeki süpernatant pastùr pipeti ile çekilerek atıldı.
- Pellet üzerine besiyeri eklendi. Eklenen besiyeri ile 1-2 kez pipetaj yapıldı.
- Hücreler ve besiyerinden oluşan karışım miktarı istenen sayıya (3 veya 4'e) bölünür. Hücrelere zarar verilmeden çekildi ve kùltùr kaplarına eşit olarak ekildi.
- Kùltùr kabı üzerine hücre tipi, işlemin tarihi ve kullanılan besiyeri yazıldı. Kùltùr kaplarının üzerine 2 ml besiyeri eklendi.
- Faz kontrast mikroskopta hücreler kontrol edildikten sonra kùltùr kaplarının kapağı gevşetilerak %5 CO₂ içeren inkùbatörde 37 °C'de inkùbe edildi.

3.3.3. Hücre sayımı

Hücre sayımı tripan mavisi ile boya dışlama metoduna göre yapıldı (56). Bu yöntemde, canlı hücreler membran bütünlüğünü koruduğu için tripan mavisi içeri giremezken; ölü hücrelerde membran bütünlüğünü bozulduğu için boya içeri geçer bu yüzden koyu mavi renge boyanır. Hücreler, Thoma lamı olarak adlandırılan bir

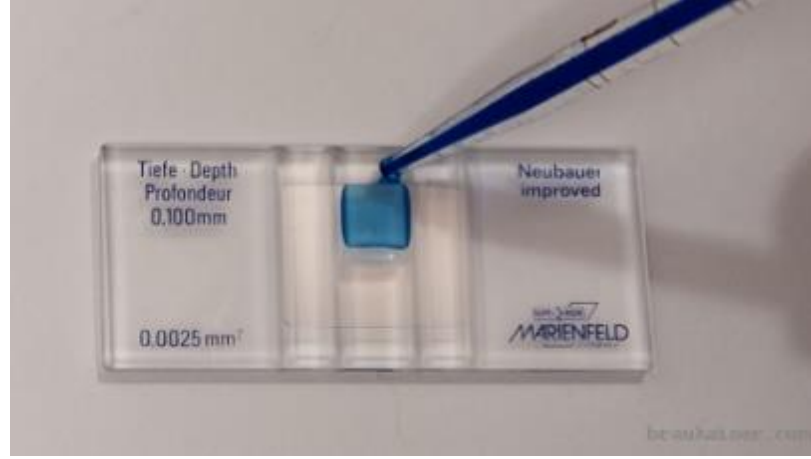
çeşit bölmeli lama damlatılır ve üzeri lamel ile kapatılarak mikroskop altında tek tek sayılır. Protokol şu şekildedir:

1. İnkübatördeki hücreler çıkarıldı, daha önce anlatılan tripsinizasyon ve santrifüj işleminden sonra hücreler 1 ml besiyeri ile süspansiyon haline getirildi.
2. Lamel, kenarları önceden su ile ıslatılan Thoma laminin (Şekil 3.3) tam ortasına gelecek şekilde yerleştirildi.



Şekil 3.3. Thoma laminin mikroskopta görünümü

3. Hücre yoğunluğuna göre seyreltilen örnekten 50 μ l, tripan mavisi'nden (%0.4) 50 μ l (eşit hacimde olmalı) 1.5 ml'lik ependorf tüpe alındı ve pipet ile 2-3 defa pipetaj yaparak homojen olarak karışmaları sağlandı.
4. 10 μ l hücre/tripan mavi karışımı pipetle çekildi ve pipet ucuyla lamele emdirilerek thoma laminin kenarından aktarıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Hücre sayımı yapılacak karışımın thoma lamina aktarılması

- Thoma lamı mikroskoba yerleştirildi ve küçük büyütmede Thoma lamının çizgileri bulundu. Şekil 3.3'de gösterildiği gibi, sadece merkezde çizgilerin keşiştiği 1 mm^2 'lik alandaki 16 karenin içindeki canlı hücreler sayıldı. Ölü hücrelerin her tarafı mavi olacağından, mavi olmayan hücreler sayıldı.

Bu işlem 5 defa yapıldı ve ortalaması alındı. Aşağıdaki formüle göre 1 ml 'deki canlı hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Canlı hücre sayısı (hücre/ml)} = \text{Ortalama hücre sayısı} \times 2 \times 10^4$$

Ortalama hücre sayısı: 5 defa 1 mm^2 'lik alandaki 16 kare sayıldıktan sonra, toplam hücre sayısının 5'e bölünmesiyle elde edilir.

10^4 : Her 1 mm^2 alan hacim olarak 0.1 mm^3 'e, bu da 10^{-4} ml 'ye eşit olduğu için, 1 ml 'deki hücre sayısını bulmak için 10^4 ile çarpılır.

2: Alınan örnek hacmine eşit miktarda tripan mavisini konulduğu için 2 kat seyrelir, bu yüzden 2 ile çarpılır.

Sayım için alınan örnek seyreltiliyse, bulunan sonuç en son seyreltme faktörü ile çarpılır.

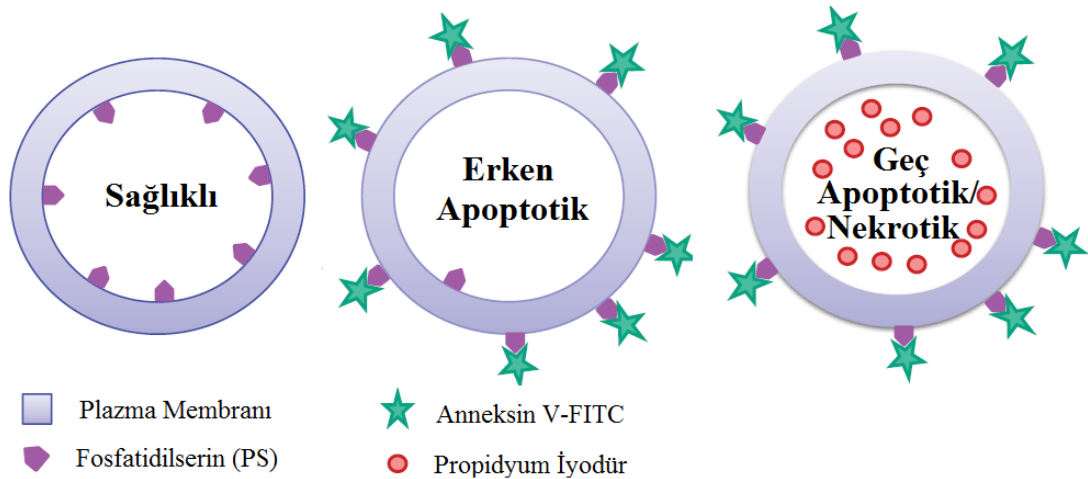
3.4. Karaciğer HepG2 Hücrelerinde ALA ve LA İçin Uygun Dozun Belirlenmesi

Çalışmamızda HepG2 hücrelerini yağ asitleri (LA ve ALA) ile inkübe ederek, bütirikolinesterazın lipid metabolizması ile etkileşiminin incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu nedenle lipid metabolizması ile etkileşimini gösteren ancak hücre canlılığını etkilemeyen bir dozun kullanılması önemlidir. Bunun belirlenebilmesi için 500 µM (final) linoleik asit ve 50 µM (final) α-linolenik asit hücrelere uygulandı ve hücre canlılığı akım sitometride incelendi.

3.4.1. Akım sitometride yapılan hücre canlılığı ön çalışması

Temel olarak bir akım sitometri, süspansiyon içerisindeki boyanmış partiküllerin (hücre çekirdeği ya da DNA) bir floresans mikroskobu aracılığıyla okunmasıdır. Okunma sırasında yaklaşık olarak 10.000 adet hücre çekirdeğinin DNA miktarları floresans yardımıyla okunur ve bu çekirdeklere ait floresans yoğunluğu grafiğe dökülür.

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin V, hücrenin dış yüzüne transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı akım sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Annexin V-FITC (yeşil floresans) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (kırmızı floresans) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITC-/PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+/PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin verir (57). Apoptozis tanımlama belirteçleri ile sağlıklı ve apoptotik hücreler şekil 3.5’de gösterilmiştir.



FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I ürün veri sayfası (58)'ndan türkçeleştirilerek alınmıştır.

Şekil 3.5. Apoptozis tanımlama belirteçleri ile sağlıklı ve apoptotik hücreler.

a. Hücrelerin, akım sitometri için ekimi ve yağ asidi uygulaması

1. 12 kuyulu plaka içerisine her kuyuya 200 000 hücre/1000 μ l besiyeri olacak şekilde ekildi.
2. 24 saat hücrelerin tutunması için beklendi ve besiyerinde ayrı ayrı çözülmüş final 500 μ M/mL linoleik asit ve final 50 μ M/mL α -linolenik asit kuyulara pipetlendi.
3. 24 saatlik inkübasyonun sonunda, karaciğer HepG2 üzerindeki besiyerleri enzim aktivitesi bakmak için toplandı.
4. Hücreler %0.25 (w/v) Tripsin-EDTA çözeltisi ile muamele edilerek kaldırıldı ve besiyeri eklenerek 250 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası tüpün dibinde oluşan hücre pelletinin üstündeki süpernatant atıldı.
6. Tüpün dibinde kalan pellet üzerine 200 μ l soğuk PBS eklenip, pipetaj yapılarak resüspanse edildi ve hücreler analiz edilmek üzere buz üzerinde akım sitometriye götürüldü.

Bu işlemler 48 ve 72 saat için tekrarlandı.

b. Akım sitometride hücre canlılığının incelenmesi

Akım sitometri çalışması FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I kullanılarak şu şekilde yapıldı:

1. 200 µl soğuk PBS'te çözülen hücreler üzerine, hücre sayısı yaklaşık 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde 1X bağlayıcı tampon [binding buffer: 10 mM Hepes/NaOH (pH 7.4), 0.14 M NaCl, 2.5 mM CaCl₂] eklendi.
2. Bu karışımdan 100 µl (1×10^5 hücre) 5 ml'lik kültür tüpüne aktarıldı.
3. 5 µl FITC Annexin V ve 5 µl PI (propidyum iyodür) eklendi.
4. Tüp yavaşça vortekslendi ve karanlık ortamda oda sıcaklığında (25°C) 15 dk inkübe edildi.
5. Tüpe 400 µl 1X Binding Buffer eklendi. Akım sitometri ile 1 saat içerisinde analiz edildi.

Bu işlemler 48 ve 72 saat için tekrarlandı.

3.4.2. Hücre canlılığı

Literatürde karaciğer HepG2 hücrelerinde yağ asitleri ile yapılan çalışmalarda seçilen doz aralığının 50-1000 µM olduğu saptandı ve hücre canlılığı çalışmaları için daha geniş bir aralık olan 0.5-500 µM, inkübasyon süresi olarak da 24 ve 48 saat seçildi.

Hücre canlılığı çalışması için Cell proliferation reagent wst-1 (Roche) kiti kullanıldı. Bu yöntem, açık kırmızı renkli tetrazolyum tuzlarının hücredeki enzimler tarafından kesilip koyu kırmızı renkli formazan tuzuna dönüştürülmesi esasına dayanır. Bu renk dönüşümü 440 nm ve 600 nm'de plaka okuyucu ile okunur.

1. 96 kuyulu plaka içerisine her kuyuya 10 000 hücre/100 µl besiyeri olacak şekilde ekildi.
 2. 24 saat hücrelerin tutunması için beklendi ve 0.5, 5, 50, 500 µM final olacak şekilde linoleik asit ve α-linolenik asit ayrı kuyulara pipetlendi.
 3. 24 saat sonra Cell proliferation reagent wst-1 çözeltisinden her kuyuya 10 µL eklendi ve 440 ve 600 nm'de mikropilaka okuyucu ile okundu.
- 48 saat inkübasyon süresi için de yukarıdaki işlemler tekrarlandı.

3.5. Transfeksiyon Çalışması

3.5.1. Doğal tip BChE plazmidinin HepG2 hücrelerine transfeksiyonu

Transfeksiyon işlemi DharmaFECT® Duo Transfection Reagent kiti ile yapıldı. Bu yöntemde, plazmid DNA'nın lipozomal yapıların içine girmesi sağlandı. Hücrelere verilen bu lipozomlar hücre membranlarıyla birleşerek hücre içerisine girer.

Transfeksiyon işlemi 12 kuyulu plakada yapıldı ve her örnek 2 kuyu paralel şekilde çalışıldı.

1. 12 kuyulu plaka içerisine her kuyuya 200 000 hücre/1000 µl besiyeri olacak şekilde ekildi. 24 saat hücrelerin tutunması için beklendi.
2. 24 saat sonra 20 µg/mL stok plazmid çözeltisi steril DEPC (Dietilpirokarbonat) ile muamele edilmiş su ile seyreltilerek hazırlandı.
3. 50 µL 20 µg/mL stok plazmid çözeltisi, serum ve antibiyotik içermeyen 50 µL besiyeri ile 1,5 ml'lik RNA içermeyen steril ependorf tüp içerisinde seyreltildi (Tüp 1 total hacim 100 µL).
4. 2 µL DharmaFECT Duo çözeltisi, serum ve antibiyotik içermeyen 98 µL besiyeri ile 1,5 ml'lik RNA içermeyen steril ependorf tüp içerisinde seyreltildi (Tüp 2 total hacim 100 µL).
5. Her iki tüp de alt üst edilerek yavaşça karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
6. 100 µL içeren tüp 2 yavaşça 100 µL içeren tüp 1'e eklenir, pipet ile dikkatli bir şekilde karıştırıldı ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.
7. Bu 200 µL'lik karışıma, 800 µL serum ve antibiyotik içermeyen besiyeri eklenerek karıştırıldı ve transfeksiyon ortamı oluşturuldu.
(Yukarıdaki hacimler 12 kuyulu plakadaki bir kuyu içindir. Transfeksiyon işlemi yapılacak kuyu sayısına göre miktarlar hesaplandı.)
8. 24 saat önce ekilen karaciğer HepG2 hücreleri üzerindeki besiyeri kaldırılıp, 1000 µL transfeksiyon ortamı kuyuya eklendi. Bu işlem transfeksiyon işlemi yapılacak her kuyu için yapıldı.
9. Hücreler 37°C'de, % 5 CO₂ içeren inkübatörde 4 saat inkübe edildi.

3.5.2. Kontrol ve transfeksiyon yapılmış hücre gruplarında ALA ve LA uygulaması

Kuyulara kontrol, transfeksiyon, linoleik asit + transfeksiyon, α -linolenik asit + transfeksiyon olmak üzere toplam 4 grup olarak düzenlendi. Her gruptan 3 örnek çalışıldı.

- Transfeksiyon işlemi yapılan karaciğer HepG2 hücreleri üzerindeki besiyeri uzaklaştırılıp ve hücreler 1'er ml PBS ile yıkandı.
- Besiyerinde ayrı ayrı çözülmüş 5 μ M/mL (final) linoleik asit ve 5 μ M/mL (final) α -linolenik asit kuyulara pipetlendi.
- 24 ve 48 saatlik inkübasyonun sonunda, karaciğer HepG2 üzerindeki besiyerleri enzim aktivitesi bakmak için toplandı.
- Hücreler %0.25 (w/v) Tripsin-EDTA çözeltisi ile muamele edilerek kaldırılır ve besiyeri eklenerek 250 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası tüpün dibinde oluşan hücre pelletinin üstündeki süpernatant atıldı.
- Pellet akım sitometri için analize götürüldü ya da daha sonra RNA ve protein izole edilmek üzere -20°C 'de donduruldu. RNA ekspresyon çalışmaları için, protein ise Western Blot analizi için kullanıldı.

3.6. HepG2 hücrelerin Oil Red O ile boyanması

Sudan III, Oil red O ve Sudan black yağda çözülebilir boyalardır, genellikle dondurulmuş kesitlerdeki yağların ve lipidlerin gösterilmesi amacıyla kullanılır. Oil red O, daha derin kırmızı renk oluşturup daha net görülebildiği için sudan II ve sudan IV boyaalarının yerini almıştır (59).

Oil red O boyamasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

- Oil Red O Stok çözeltisi: 0.35 g Oil Red O tartılır ve 100 ml izopropanolde çözülür. 0.2 μ 'luk filtreden geçirildi ve oda koşullarında saklandı.
- Oil Red O çalışma çözeltisi: 6 ml of Oil Red O stok çözeltisi ile 4 ml ddH₂O karıştırıldı. Oda sıcaklığında 20 dk bekletildi ve 0.2 μ 'luk filtreden geçirildi.

Oil red O boyama protokolü (Lenka Janderova'dan Türkçeye çevrilmiştir.) şu şekildedir:

1. 8 kuyulu özel boyama plaka (35 mm) içerisine her kuyuya 200 000 hücre/500 µl besiyeri olacak şekilde HepG2 hücreleri ekildi.
2. 24 saat hücrelerin tutunması için beklendi. Transfeksiyon yapılmayan hücreler için finalde 5 µM olacak şekilde α-linolenik asit ya da linoleik asit 24 ve 48 saat olarak uygulandı. Doğal tip BChE plazmidinin karaciğer HepG2 hücrelerine transfeksiyonu yapılan hücreler için, transfeksiyon işleminden 4 saat sonra ALA ya da LA 24 ve 48 saat olarak uygulandı.
3. İnkübasyon sonunda hücreler üzerindeki besiyeri atıldı.
4. Hücreler 2 ml PBS ile yıkanır ve PBS tamamen atıldı.
5. 2 ml %10 formalin eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
6. Formalin atıldı ve taze 2 ml %10 formalin eklendi.
7. En az 1 saat inkübe edildi
8. Pipet yardımıyla formalin kaldırıldı. Hücreler 2 ml distile su ile (ddH₂O) iki defa yıkandı.
9. Hücreler oda sıcaklığında 5 dk boyunca 2 ml %60 izopropanol ile yıkandı.
10. Hücreler oda sıcaklığında tamamıyla kurutuldu. 1 ml Oil Red O çalışma çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
11. Oil Red O çözeltisi kaldırıldı ve hücreler hemen ddH₂O ile 4 defa yıkandı.
12. Analiz edilmek üzere ışık mikroskobu ile fotoğraf çekildi.

3.7. Gen Ekspresyonu Tayini

3.7.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için trizol yöntemine dayanan EZ-RNA Total RNA Isolation kiti kullanıldı.

1. -20°C'de dondurulan karaciğer HepG2 hücre pelleti 0.5 ml denatüre edici çözelti ile karıştırılarak lizis yapılır ve 1,5 ml'lik RNaz ve DNaz içermeyen ependorf tüplere alındı.

2. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. Tüp üzerine 0.5 ml ekstraksiyon çözeltisi eklenir. 15 saniye vorteks ile karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Karışım, +4°C'de, 12 000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası çözelti üç faza ayrılır. En üstteki renksiz kısım RNA'yı içerir. Protein içeren sarı renkli orta faz ile DNA'yı içeren pembe renkli alt faz, Western Blot yapılmak üzere -20°C'de tutuldu.
6. En üstteki renksiz kısım RNA'yı içerdiği için çekilerek ayrı bir ependorf tüpe alındı. Üzerine 0.5 ml izopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
7. Karışım, +4°C'de, 12 000 x g'de 8 dakika santrifüj edildi.
8. Süpernatant atıldı, RNA'yı içeren beyaz renkli pellet 1 ml %75 etanol ile vortekslenerek yıkandı ve +4°C'de, 7 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve 5 dakika etanolün uçması için oda sıcaklığında bekletildi.
10. RNA 100 µL DEPC ile muamele edildi.

Elde edilen RNA'nın konsantrasyonu 260 nm'de absorban ölçülerek aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{seyreltme faktörü} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

(Tek zincirli RNA molekülü için, 1 optik dansite (OD) 40 µg/ml'ye karşılık gelmektedir.)

RNA saflığı ise A_{260}/A_{280} oranı ile belirlendi.

Elde edilen RNA'lar, RT-PCR yapılana kadar -20°C'de bekletildi.

3.7.2. Reverse transkriptaz PCR (RT-PCR) ile cDNA sentezi

RT-PCR RNA'dan revers transkriptaz enzimi sayesinde komplementer DNA (cDNA) sentezinin gerçekleştiği yöntemdir. Bu çalışmada RNA'dan cDNA sentezi

için First Strand cDNA sentez kiti kullanıldı. Kitte bulunan malzemelerin karışımındaki içerikleri (final olarak) aşağıda gösterilmiştir:

1X M-MuLV Enzim karışımı:

0.5 ünite/μl M-MuLV Reverse Transkriptaz

1 ünite/μl Murine RNaz inhibitörü

1X M-MuLV Reaction Karışımı:

50 mM Tris-Acetate (pH 8.3)

75 mM KOAc (potasyum asetat)

3.1 mM Mg(OAc)₂

0.5 mM içerecek şekilde deoksiniükleotit karışımı (dNTPs, N = A, G, C ve T)

First Strand cDNA sentez protokolü “thermocycler” programı ayarlanarak Biorad iCycler PCR cihazında şu şekilde yapıldı:

İlk olarak tüm bileşenler elde eritildi ve buz üzerine kondu.

1. RNA örnekleri ile oligo primer d(T)23VN, 0.2 mL’lik RNaz içermeyen steril PCR tüplerine eklendi ve pipetle karıştırıldı.

Total RNA	1–6 μl (0.5 μg)
d(T)23VN primer (50 μM)	2 μl
nükleaz içermeyen H ₂ O	<u>değişken</u>
Total Hacim	8 μl

2. Cihaza yerleştirilen tüplerdeki RNA 5 dk boyunca 70°C’de denature edildi ve buz üzerine alındı.

3. Tüp üzerine aşağıdaki bileşenler eklendi.

M-MuLV Reaksiyon Karışımı 10μl

M-MuLV Enzim Karışımı 2 μl

4. 20 μl cDNA sentez karışımı cihazda 42°C’de bir saat inkübe edildi.

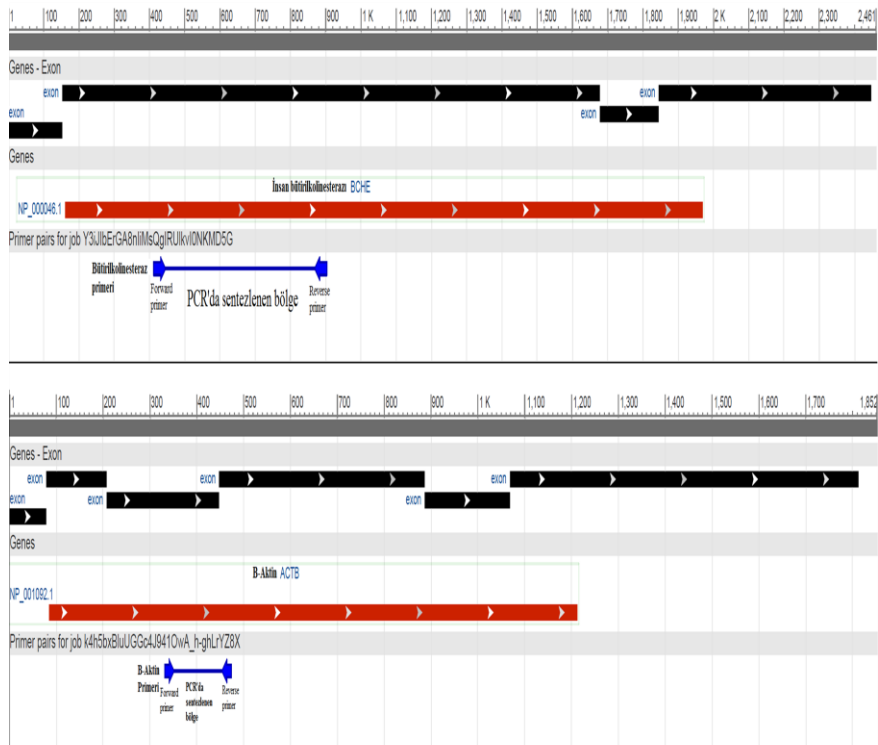
5. Enzim 80°C’de 5 dk inaktive edildi. Karışım 30 μl nükleaz içermeyen H₂O ile 50 μl’ye seyreltildi.

cDNA ürünleri PCR yapılana kadar –20°C’de saklandı.

3.7.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincirleme tepkimesi (Polymerase Chain Reaction - PCR), DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir.

PCR çalışmaları için, doğal insan BChE genine özgü primer çiftleri literatürdeki çalışmalar incelenerek seçildi (60) ve <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> sitesinde yer alan yazılım ile BLAST yapılarak primerler kontrol edildi. PCR reaksiyonunda iç kontrol olarak β -aktin geni kullanıldı. BChE ve β -aktin geni ve PCR'da sentezlenen bölge Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. BChE ve β -aktin geni ve PCR'da sentezlenen bölge

BChE dizi analizi çalışmaları için tasarlanan primerler ve β -aktin, Sentromer DNA Teknolojileri (Türkiye) tarafından sentezlendi. Primer bilgileri Şekil 3.7'te verilmiştir. Primerler nükleaz içermeyen steril su ile çözülerek 100 μ mol/ μ l stok

yapıldı. Bu stok çözelti PCR deneyinde kullanılmak üzere, nükleaz içermeyen steril su ile 10 µmol/µl'ye seyreltildi.

>NM_000055.2 İnsan bütilkolinesteraz (BChE), mRNA'sı

Ürün uzunluğu = 492

Forward primer 1 GAATGCCACAAAATATGCAAATTCTTGCTGCAG 34
Kalıp 412 445

Reverse primer 1 GCTCTGGTGAACAATGAATGGCTTCCAGGAGAAAAG 35
Kalıp 903 869

Primer çifti İnsan bütilkolinesteraz (BChE)

	Sekans (5'→3')	Uzunluk	Başlangıç	Bitiş	Tm	GC%
Forward primer	GAATGCCACAAAATATGCAAATTCTTGCTGCAG	34	412	445	66.18	38.24
Reverse primer	GCTCTGGTGAACAATGAATGGCTTCCAGGAGAAAAG	35	903	869	70.10	48.57
Ürün uzunluğu	492					

>NM_001101.3 İnsan B-Aktin (ACTB) mRNA'sı

Ürün uzunluğu = 142

Forward primer 1 AGAAAATCTGGCACCACACC 20
Kalıp 332 351

Primer çifti İnsan B-Aktin (ACTB)

	Sekans (5'→3')	Uzunluk	Başlangıç	Bitiş	Tm	GC%
Forward primer	AGAAAATCTGGCACCACACC	20	332	351	58.38	50.00
Reverse primer	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	20	473	454	57.64	50.00
Ürün uzunluğu	142					

Şekil 3.7. PCR'da kullanılan BChE ve β-Aktin primerleri ile ilgili bilgiler.

Kullanılacak primerler için annealing (primerle eşlenip bağlanma) sıcaklıkları değişken olduğu için, gradiyent çalışması yapılarak en uygun sıcaklığın bulunması gerekir. Gradyent çalışmasında Taq polimeraz enzimi (Sigma) kullanılarak hazırlanan PCR karışımı (Tablo 3.1) için thermocycler programı yapıldı (Tablo 3.2).

Tablo 3.1. Gradyent çalışması için PCR reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	1 örnek için miktar (µl)	Final Konsantrasyon
10x PCR Tamponu	5	1x
25 mM MgCl ₂	3	1.5 mM
10 mM dNTP karışımı	1	200 µM
10 µM Forward primer	0.5	0.1 µM
10 µM Reverse primer	0.5	0.1 µM
5 ünite/µl Taq polimeraz	0.5	0.05 ünite/µl
~10 ng Kalıp DNA (cDNA)	2.5	10 pg/ µl
Nükleaz içermeyen steril su	37	-
Final Hacim	50	

Tablo 3.2. Gradyent için PCR döngüsü

Adım	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu	95°C	05:00 dk
35 döngü	95°C	01:30 dk
	50-70°C	01:30 dk
Son uzama	72°C	10:00 dk
Bekleme	4°C	∞

DNA ürünleri %2'lik agaroz jele uygulanarak, elektroforez yapıldı (90 V, 1 saat). Primerlere özgü en uygun annealing sıcaklıkları bulundu ve sonraki PCR deneyleri için bu sıcaklıklar kullanıldı.

PCR deneyinde, tüm DNA örneklerinin seçilen primerler ile çoğaltılması için OneTaq® 2X Master Mix with Standart Buffer kiti kullanıldı. Master mix, Taq polimeraz enzimi, Taq polimeraz tamponu (final 1.8mM MgCl₂) ve deoksinükleotidleri (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) içeren karışımdır. Bu karışıma, komplementer DNA (cDNA) ve nükleaz içermeyen steril su eklenerek, 0.2 ml'lik ependorf tüplere PCR karışımı hazırlandı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. PCR çalışması için reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	1 örnek için miktar (µl)	Final Konsantrasyon
10 µM Forward primer	0.5	0.1 µM
10 µM Reverse primer	0.5	0.1 µM
Kalıp DNA (cDNA)	2.5	~50 ng
OneTaq® 2X Master Mix with Standart Buffer	12.5	1X
Nükleaz içermeyen steril su	9	-
Final Hacim	25	

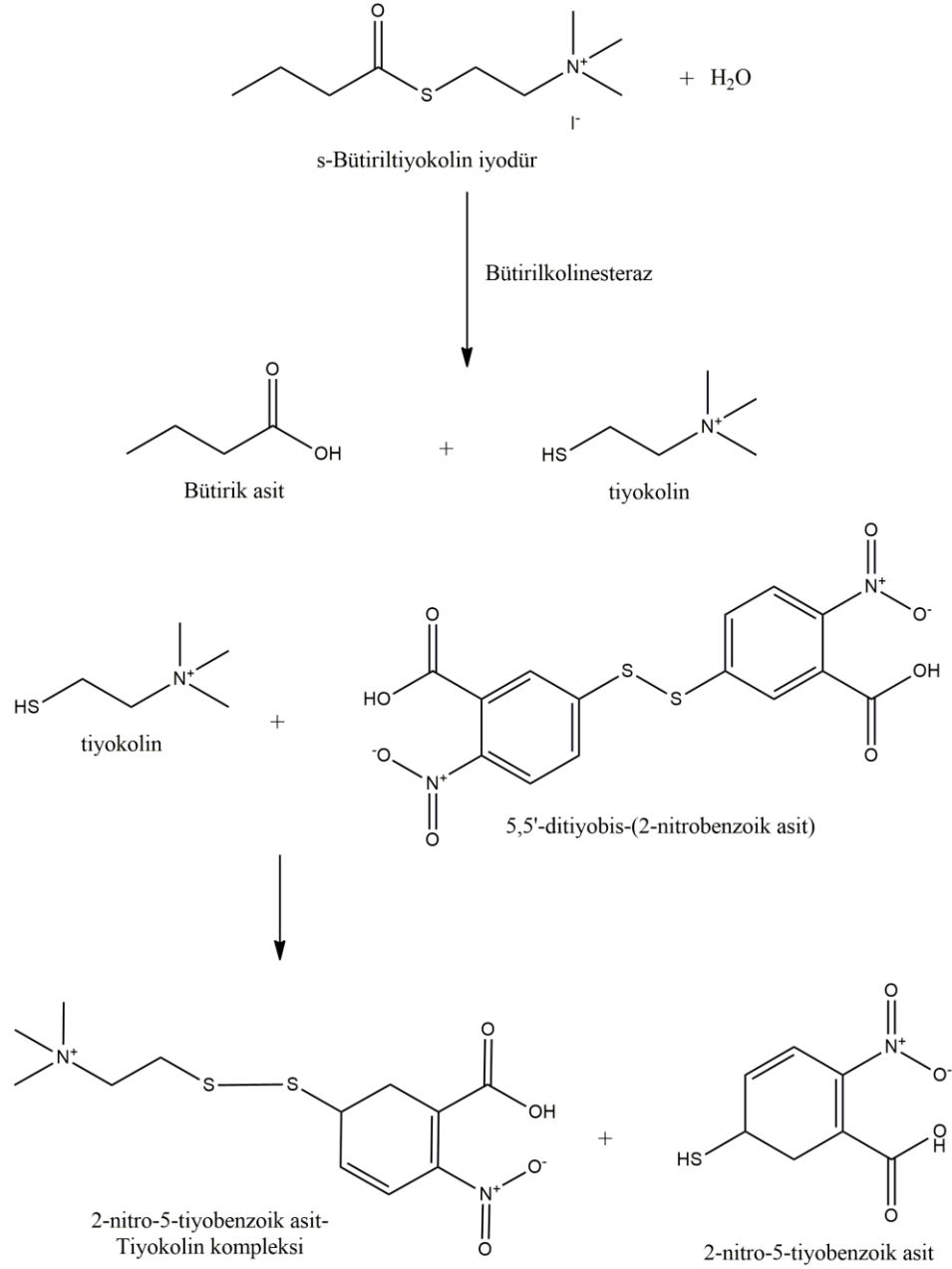
3.8. BChE Aktivite Tayini ve BChE Aktivite Boyaması

3.8.1. BChE aktivite tayini

Bütirikolinesteraz aktivitesi modifiye Ellman yöntemine göre yapıldı (61). Ellman yöntemi, substrat olan tiyokolin esterlerinin kolinesterazlar tarafından hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolinin, DTNB'yi indirgenmesi sonucu oluşan sarı renkli 2-nitro-5-tiyobenzoik asit miktarının (Şekil 3.8) 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (62).

Hücre kültüründe toplanan besiyerlerindeki BChE aktivitesi, BChE içeren besiyeri ile spesifik AChE inhibitörü olan BW284C51'in 5dk inkübasyonu sonucu, ortama bütiriltiyokolin (BTCh) substratının en son eklenmesiyle başlatılan reaksiyon spektrofotometrede 37°C'de 90 saniye boyunca izlendi (ϵ_{412} , DTNB = $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Aktivite ortamı, finalde 50 mM MOPS pH 7.4 tamponu, 0.25 mM DTNB, 1 mM BTCh ve 10 μ M BW284c51 ve yaklaşık 3 mU/ml BChE enzimi içermektedir. Tüm örnekler en az 3 defa çalışıldı.

Örneklerdeki protein içerikleri, Bradford yönteminin 96 kuyulu plaka'ye uyarlanmış protokolüne göre yapıldı ve BSA (sığır serum albumin) standart protein olarak kullanıldı (63). Absorbans ölçümü, 595 nm'de Spectramax M2 mikro plaka okuyucu cihazı ile yapıldı. Tüm örnekler en az 3 defa çalışıldı.



Şekil 3.8. Ellman reaksiyonu

3.8.2. BChE aktivite boyaması

Hücre kültüründe toplanan besiyerleri, natif poliakrilamid jel elektroforezine (PAGE) yüklendi (64). Elektroforez tamponları ve poliakrilamid jeller Laemmli ve arkadaşlarının önerdiği şekilde yapıldı ancak ortama SDS ve indirgeyici ajan olarak β -merkaptöetanol eklenmedi (65). BChE molekül yapısından dolayı, %5 yükleme jeli ve %7.5 ayırıcı jel kullanıldı. Örnekler 80 μ g protein/kuyucuk olacak şekilde jelle

yüklendi ve 100 V'da 1.5 saat yürütüldü. Elektroforezin ardından BChE aktivite boyaması Karnovsky-Roots metodu (66)'na göre yapıldı.

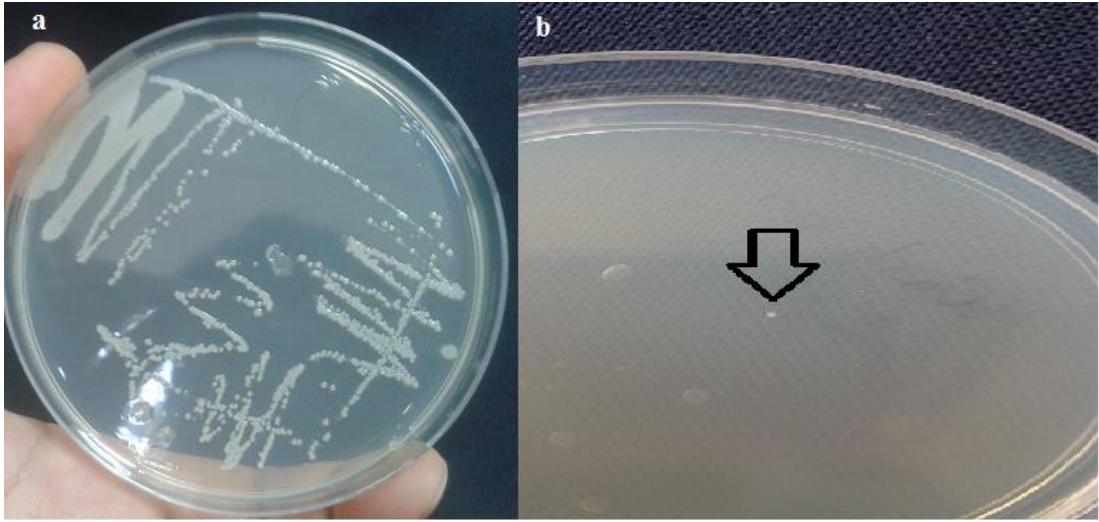
3.9. İstatistiksel Değerlendirmeler

Yağ asitlerine ait IC₅₀ değeri hesaplamasında ve elde edilen sonuçlara ait grafiklerin çiziminde Graphpad Prism 6.05 (versiyon 2014), istatistiksel verilerin elde edilmesinde ise IBM SPSS Statistics 21 programı kullanıldı. Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, bağımsız ikiden çok grubun karşılaştırmasında Kruskal-Wallis varyans analizi; bağımsız iki grubun karşılaştırmasında ise nonparametrik Mann Whitney U testi kullanıldı. Buna göre $P \leq 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Doğal Tip BChE Plazmidinin Transfeksiyon İçin Hazırlanması ve Kontrolü

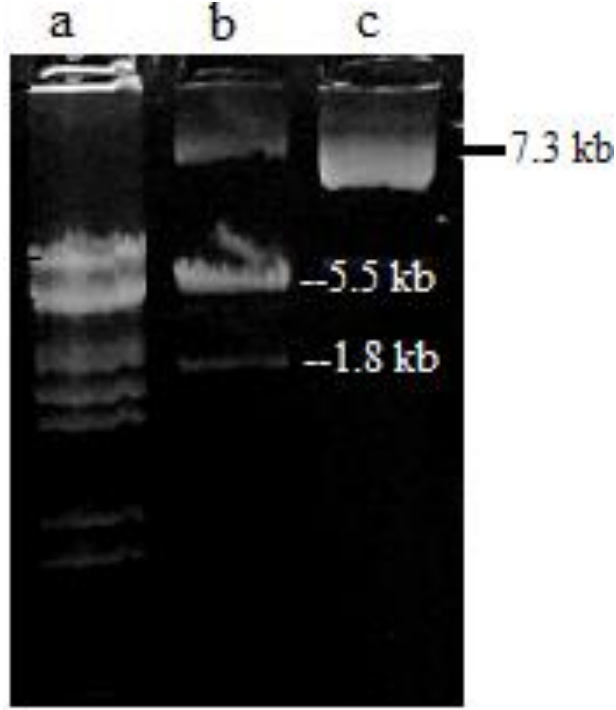
Yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi, doğal tip insan BChE cDNA'sı içeren pRc/CMV ekspresyon vektörü ve puc19 kontrol plazmidi, E.coli HST08 (Stellar™) kompetan bakteri hücrelerine ısı şok yöntemi ile aktarıldı. Transformasyon sonrası LB Amp(+) agarda çoğalan koloniler şekil 4.1'de gösterildi.



a) puc19 kontrol plazmidi b) Doğal tip insan BChE cDNA'sını içeren pRc/CMV ekspresyon vektörü

Şekil 4.1. Transformasyon sonrası LB Amp(+) agarda çoğalan koloniler

50 µg/ml ampisilin içeren LB ortamında çoğaltılan puc19 ve pRc/CMV-BChE plazmid DNA'sı, HST08 (Stellar™) bakterilerinden Qiagen midiprep kit kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan pRc/CMV-BChE plazmidi, BgI II restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonunda %1'lik agaroz jele uygulanan plazmidin jel görüntülemesi Şekil 4.2'de yer almaktadır. Kesilmemiş doğal tip insan BChE cDNA'sı içeren pRc/CMV ekspresyon vektörü (7.3 kb civarında) gözlemlendi. Kesilmiş plazmidin, pRc/CMV ekspresyon vektörü (yaklaşık 5.5 kb) ve doğal tip insan BChE cDNA'sı (yaklaşık 1.8 kb) olmak üzere iki bant oluşturduğu görüldü. Saflaştırdığımız DNA'nın insan BChE genine (1.8 kb) ait olduğu doğrulandı.

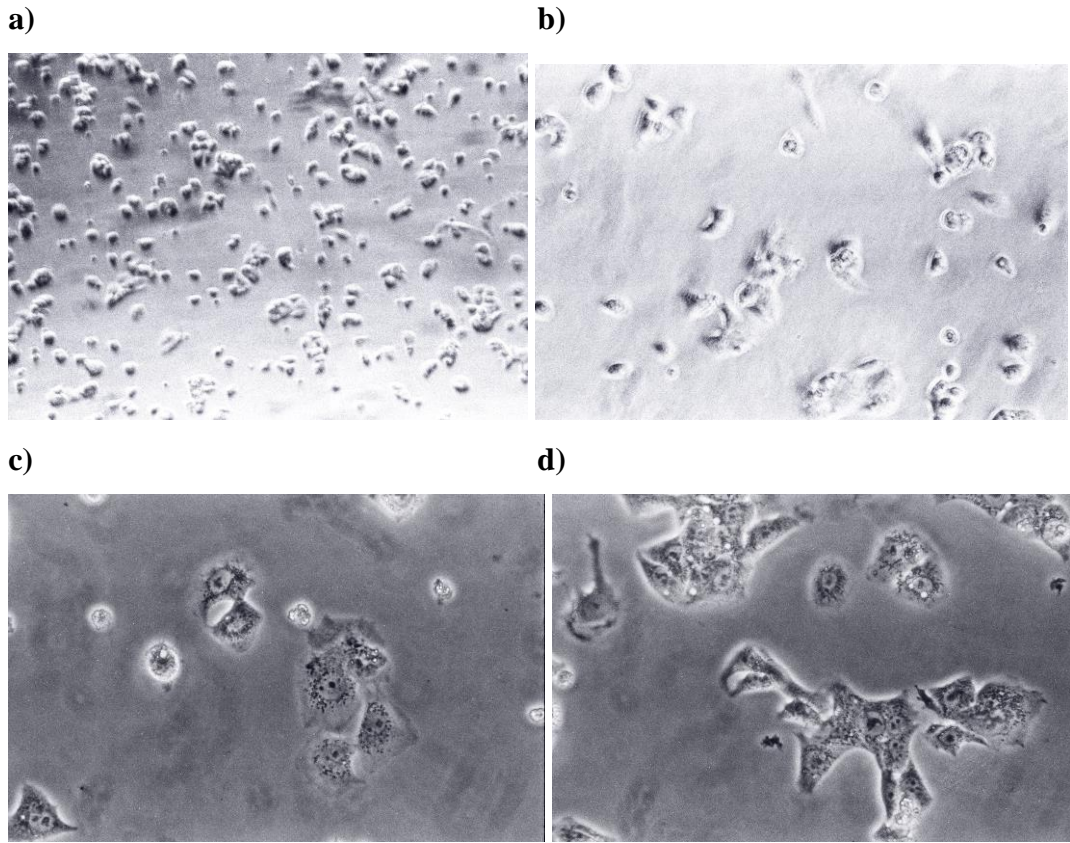


- a) 21 226-564 baz çiftlik Lambda DNA EcoRI+HindIII Digest Marker
 b) Kesilmiş doğal tip insan BChE cDNA'sı içeren pRc/CMV ekspresyon vektörü
 c) Kesilmemiş doğal tip insan BChE cDNA'sı içeren pRc/CMV ekspresyon vektörü

Şekil 4.2. Bgl II ile kesilmiş pRc/CMV-BChE'nin %1 agaroz jel elektroforezi görüntüsü

4.2. İnsan HepG2 Hücre Hattının Çözülmesi Sonrası Mikroskop Görüntüsü

Çözülüp flasklara ekimin hemen ardından insan HepG2 hücre hattına ait hücreler faz kontrast mikroskop altında yuvarlak şeffaf hücreler olarak izlendi (Şekil 4.3). Çözüp ekme sonrası ikinci günde hücreler tek tek veya ikili üçlü gruplar halinde flask yüzeyine tutunmuştu. Hücrelerin belirgin çekirdekçik içeren ökromatik çekirdekleri şeffaf sitoplazma ile çevriliydi. Sitoplazma içinde çekirdek çevresinde granüller ve bazı hücrelerde tek tek lipid damlası izlendi. Ekim sonrası 10. günde hücreler kümeler oluştuyordu.



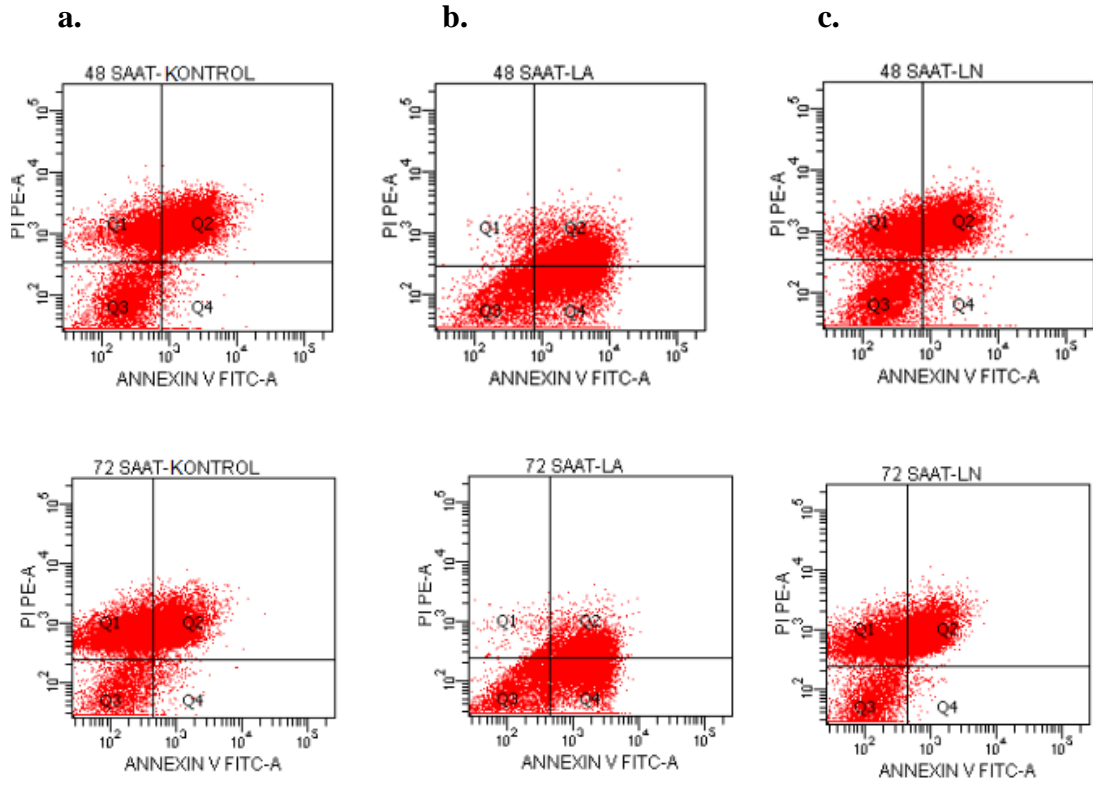
Şekil 4.3. Çözülen insan HepG2 hücre hattının ekim sonrası farklı objektif büyütmelelerdeki faz mikroskop görüntüleri: a) X5 b) X10 c) X10 d) X20

4.3. Karaciğer HepG2 Hücrelerinde ALA ve LA İçin Uygun Dozun Belirlenmesi

Bu çalışmada, karaciğer HepG2 hücrelerinde yağ asitleri kullanılarak bütirilkolinesterazın lipid metabolizması ile etkileşiminin incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu nedenle lipid metabolizması ile etkileşimini gösteren, ancak hücre canlılığını etkilemeyen bir doz belirlemek için hücre canlılığı-doza çalışmaları yapıldı.

4.3.1. Akım sitometride yapılan hücre canlılığı ön çalışması

Yağ asitleri için uygun dozu belirlemek amacıyla, 500 μ M finalde linoleik asit (LA) ve 50 μ M α -linolenik asit (ALA) olacak şekilde hücrelere 48 ve 72 saat olarak uygulandı ve hücre canlılığı akım sitometride incelendi (Şekil 4.4).



a) Kontrol b) 500 μ M linoleik asit uygulaması c) 50 μ M α -linolenik asit uygulaması

Şekil 4.4. 48-72 saat inkübasyon ile 500 μ M linoleik asit ve 50 μ M α -linolenik asit uygulamaları için akım sitometri sonuçları

Q1: Nekrotik hücreler

Q2: Geç apoptotic hücreler

Q3: Canlı hücreler

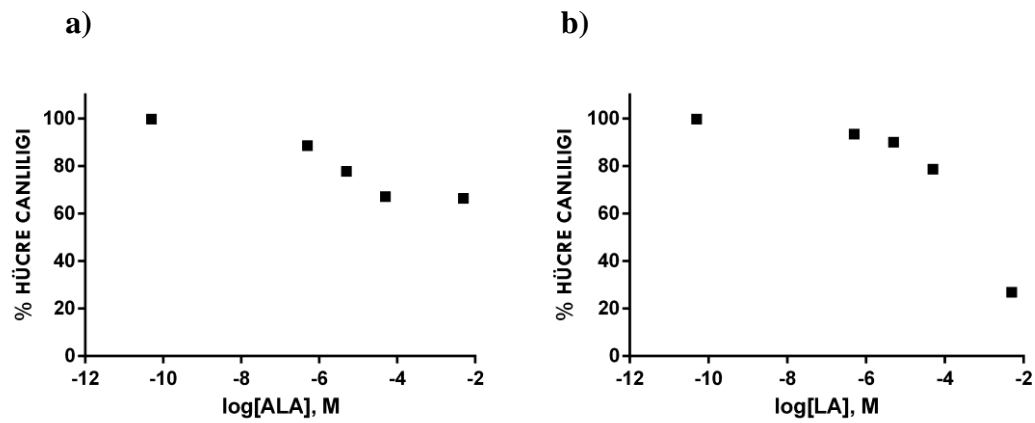
Q4: Erken apoptotic hücreler.

Akım sitometrik analiz sonuçları, uygulanan final 500 μ M linoleik asit ve final 50 μ M α -linolenik asit dozlarının karaciğer HepG2 hücreleri için yüksek olduğunu gösterdi. Şekil 4.4'ten de görüldüğü gibi, canlı hücre sayısı (Q3) yağ asidi uygulamasıyla azaldı. 72 saatlik inkübasyon sonunda canlı hücre sayısında belirgin bir düşüş olduğu için, sonraki çalışmalarda yağ asidi inkübasyon süresi 24 ve 48 saat olarak belirlendi.

4.3.2. Doz-bağımlı hücre canlılığı çalışması

Linoleik asit (LA) ve α -linolenik asit (ALA)'in, lipid metabolizması ile ilişkilendirebileceğimiz, ancak hücre canlılığını anlamlı düzeyde etkilemeyen

dozlarını seçmek amacıyla doz-bağımlı hücre canlılığı çalışması yapıldı. Literatürde karaciğer HepG2 hücrelerinde yağ asitleri ile yapılan çalışmalardan yararlanılarak, doz-bağımlı hücre canlılığı çalışması için 0.5-500 μM , inkübasyon süresi ise 24 ve 48 saat olarak seçildi. Cell proliferation reagent wst-1 kiti kullanılarak hücre canlılığı belirlendi. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 6.05 programı kullanılarak grafik olarak çizildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Alfa-linolenik asit (a) ve linoleik asitin (b) farklı dozlarındaki hücre canlılığının yüzde olarak ifadesi

Grafikteki sonuçlar, linoleik ve α -linolenik asitin 5 μM konsantrasyona kadar çok yüksek bir sitotoksosite göstermediği, ancak 5 μM 'dan yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkilerinin hızla arttığı gözlemlendi. Sonuç olarak, linoleik ve α -linolenik asitin 5 μM konsantrasyonları çalışma için uygun doz olarak belirlendi.

Ayrıca karaciğer HepG2 hücreleri için LA uygulamasının IC_{50} değeri 149.3 μM olarak hesaplandı. ALA uygulaması için grafikte görüldüğü gibi artan konsantrasyon ile hücre canlılığı orantılı bir şekilde azalırken, 50 μM konsantrasyondan sonra hücre canlılığı sabit kaldı ve IC_{50} değerine ulaşamadı.

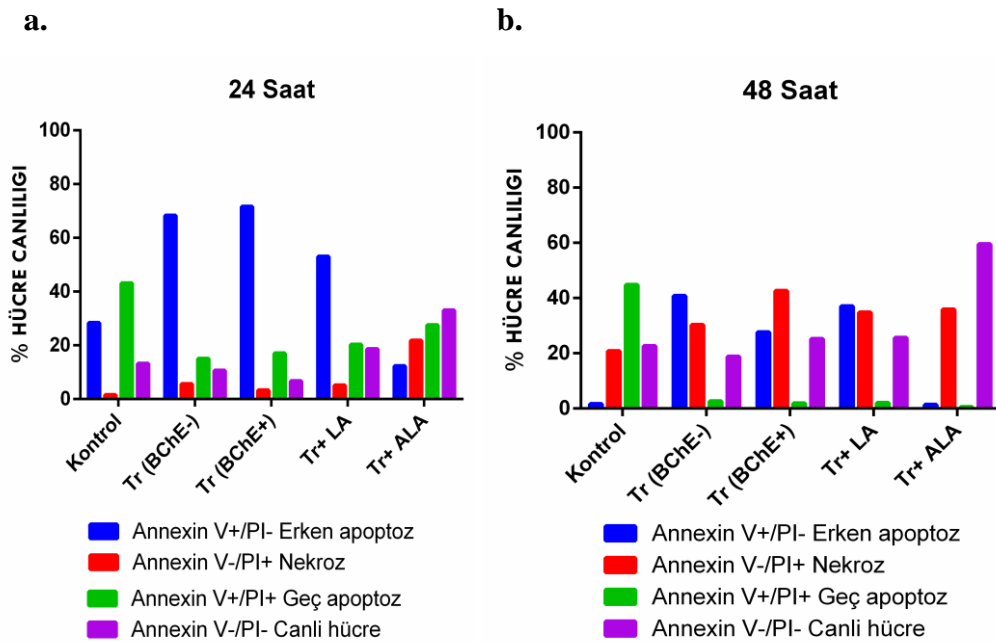
4.4. BChE Plazmidinin Karaciğer HepG2 Hücrelerine Transfeksiyonu

Puc19 kontrol plazmidi ve doğal tip BChE plazmidinin karaciğer HepG2 hücrelerine transfeksiyonundan 24 saat sonra, hücrelere finalde 5 μM olacak şekilde α -linolenik asit ya da linoleik asit 24 ve 48 saat olarak uygulandı. 24 ve 48 saatlik

inkübasyonun sonunda, karaciğer HepG2 hücreleri üzerindeki besiyerleri enzim aktivitesi bakmak için toplandı. Tripsinizasyon ve santrifüj sonucu oluşan pellet, akım sitometri, Oil Red O boyaması ve ekspresyon çalışmaları için toplandı.

4.4.1. Akım sitometri analizi

Akım sitometri, süspansiyon içerisindeki boyanmış partiküllerin (hücre çekirdeği ya da DNA) bir floresans mikroskobu aracılığıyla okunmasıdır (Bkz. 3.4.1). Akım sitometri çalışmasında FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I kullanılarak, sağlıklı, apoptotik ve ölü hücreler belirlendi. Okunma sırasında yaklaşık olarak 10 000-20 000 adet hücre çekirdeğinin DNA miktarları floresans yardımıyla okundu ve bu çekirdeklere ait floresans yoğunluğu grafiğe döküldü (Şekil 4.6).



a) 24 saat inkübasyon b) 48 saat inkübasyon

Şekil 4.6. BChE plazmidinin karaciğer HepG2 hücrelerine transfeksiyonu sonrası 5 µM ALA ya da LA uygulamalarının akım sitometri sonuçları

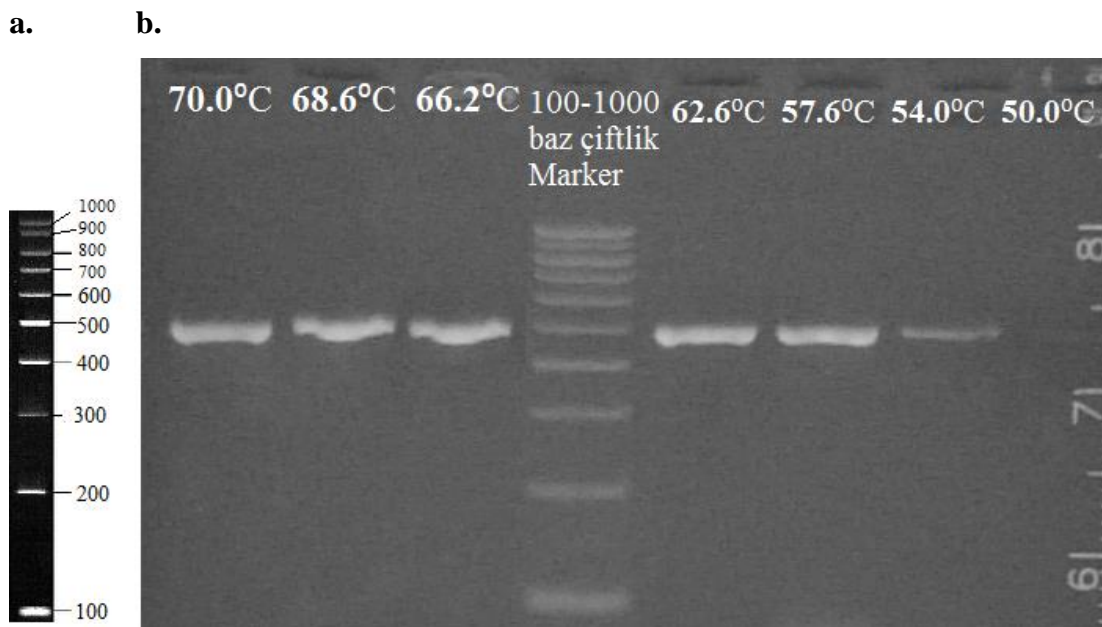
BChE plazmidinin karaciğer HepG2 hücrelerine transfeksiyonu sonrası 5 µM ALA ya da LA uygulamalarının akım sitometri sonuçlarına bakıldığında, transfeksiyon işleminin hücreleri erken apoptoza götürdüğü söylenebilir.

Transfeksiyon işlemini takiben, 24 ve 48 saatlik uygulamalarda LA'nın aksine ALA'nın hücreleri erken apoptozdan çıkardığı görülmektedir. Ayrıca ALA uygulaması kontrole oranla canlı hücre sayısında anlamlı düzeyde artışa neden olmaktadır.

4.4.2. BChE mRNA ekspresyonu

Puc19 ve BChE plazmidinin karaciğer HepG2 hücrelerine transfeksiyonu ve transfeksiyon işlemi yapılmamış normal karaciğer HepG2 hücrelerinin 24 ve 48 saatlik yağ asidi uygulamaları sonunda toplanan hücrelerden RNA izole edildi. İzole edilen RNA'dan ise, RT-PCR yöntemi ile revers transkriptaz enzimi kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezlendi.

BChE dizi analizi çalışmaları için tasarlanan primerlerin annealing sıcaklıkları değişken olduğu için, BChE transfeksiyonu yapılan örnek için gradiyent çalışması yapıldı. 50-70°C sıcaklık aralığı için gradiyent yapılarak, primerler için en uygun sıcaklık bulundu. Gradiyent çalışması sonucu elde edilen PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü şekil 4.7'da verildi.

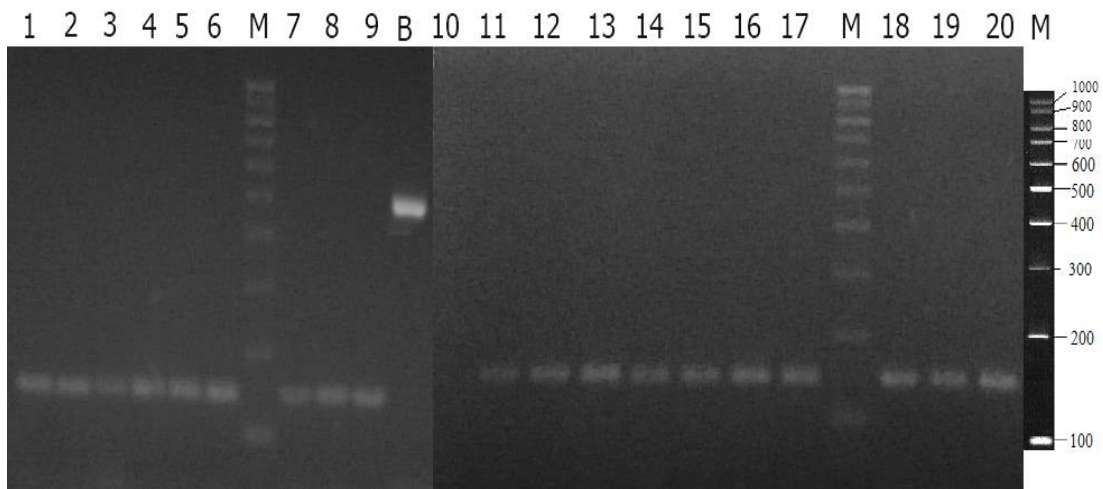


a. 100-1000 baz çiftlik DNA marker b. Gradiyent PCR ürünleri

Şekil 4.7. Gradiyent çalışması sonucu elde edilen PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü

Şekil 4.7’den elde ettiğimiz sonuçlara bakıp, BChE dizi analizi çalışmaları için en uygun sıcaklığın 70-58⁰C aralığında olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca BChE PCR ürününün 492 baz çiftinde bant vermesi, tasarlanan primerlerimizin çalıştığını göstermektedir.

İç kontrol geni olarak kullanılan β -aktinin primerleri için annealing sıcaklığı 61⁰C olarak hesaplandı. β -aktin ve BChE dizi analizi için 61⁰C’nin uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla bütün örneklerde PCR analizi ile ön çalışma yapıldı. Sonuçlar %2’lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.8).



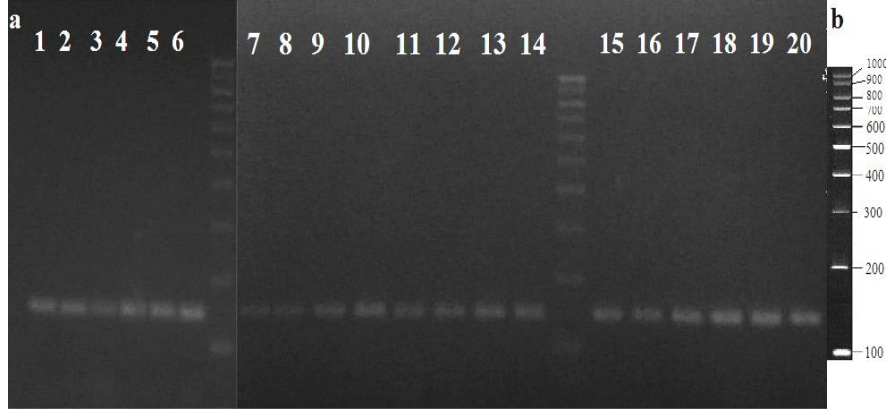
24 ve 48 saatlik LA ve ALA uygulamaları yapılan kontrol (1-6) HepG2, BChE (8-10, 12-14) ve Puc19 (15-20) transfeksiyon HepG2 hücrelerinin β -aktin ifadesi. Sadece transfeksiyon ajanına maruz kalmış HepG2 hücrelerin (7, 11) β -aktin ifadesi. BChE transfeksiyonu yapılan HepG2 hücrelerindeki (B) BChE mRNA ifadesi.

Şekil 4.8. β -aktin ve BChE mRNA ekspresyonu için 61⁰C’deki PCR analizi

Şekil 4.8’deki sonuçlara bakıldığında, β -aktin ve BChE için 61⁰C annealing sıcaklığının PCR analizi açısından en uygun sıcaklık olduğuna karar verildi. Marker (M)’den yararlanarak bantların 142 baz çifti civarında gelmesi, β -aktin PCR ürünü olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca transfeksiyon işlemi yapılan örnekteki (B) BChE mRNA ifadesinin β -aktin mRNA ifadesinden daha fazla olduğunu söyleyebiliriz.

Puc19 ve BChE plazmidinin karaciğer HepG2 hücrelerine transfeksiyonu ve transfeksiyon işlemi yapılmamış normal karaciğer HepG2 hücrelerinin 24 ve 48 saatlik yağ asidi uygulama örneklerinin cDNA’ları, iç kontrol olarak kullanılan β -

aktinin primerleri kullanılarak annealing 61°C 'de PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jele uygulandı (Şekil 4.9).

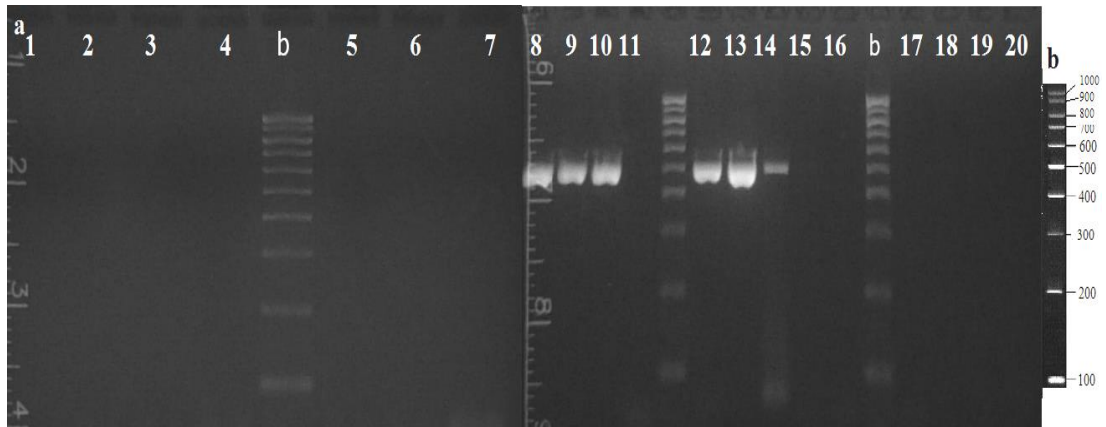


a. 24 ve 48 saatlik LA ve ALA uygulamaları yapılan kontrol (1-6) HepG2, BChE (8-10,12-14) ve Puc19 (15-20) transfeksiyon HepG2 hücreleri. Sadece transfeksiyon ajanına maruz kalmış HepG2 hücreleri (7,11) **b.** 100-1000 baz çiftlik marker

Şekil 4.9. β -Aktin için yapılan PCR analiz sonucu

Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da görüldüğü gibi bütün hücrelerde iç kontrol olan β -aktin bantları görüldü.

BChE primerleri kullanılarak bütün örnekler annealing 61°C 'de PCR yapıldı. Elde edilen BChE PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.10).



a. 24 ve 48 saatlik LA ve ALA uygulamaları yapılan kontrol (1-6) HepG2, BChE (8-10,12-14) ve Puc19 (15-20) transfeksiyonu yapılan HepG2 hücreleri. Sadece transfeksiyon ajanına maruz kalmış HepG2 hücreleri (7,11) **b.** 100-1000 baz çiftlik marker

Şekil 4.10. BChE mRNA ekspresyonu için yapılan PCR analiz sonucu

Şekil 4.10'daki jel görüntüsünden görüldüğü gibi, puc19 transfeksiyonu yapılan (15-20) ve BChE transfeksiyon işlemi yapılmayan (1-6) karaciğer HepG2 hücrelerinde, BChE mRNA ifadesi gözlenmemektedir. BChE plazmidinin HepG2 hücrelerine transfeksiyonu yapılan (8-10,12-14 nolu) örneklerde ise BChE mRNA'sının ifadesi belirgin bir biçimde gözlenmektedir. Bu gen ürünü beklenildiği gibi 492 baz çiftine denk gelmektedir. 7 ve 11 nolu örnekler ise transfeksiyon ajanı ile muamele edilen, ancak BChE genini içermeyen örnekler olduğu için BChE mRNA ifadesini bu örneklerde de göremedik. Elde ettiğimiz bu sonuç, BChE geninin karaciğer HepG2 hücrelerine transfeksiyon işleminin başarı ile sonuçlandığını göstermektedir. Jel görüntüsünden de görüldüğü gibi, BChE transfeksiyon işlemi takiben 24 saatlik inkübasyon örneklerin (8-10), 48 saatlik inkübasyon süresindeki örneklere (12-14) göre BChE mRNA ifadesinin daha az olduğunu söyleyebiliriz.

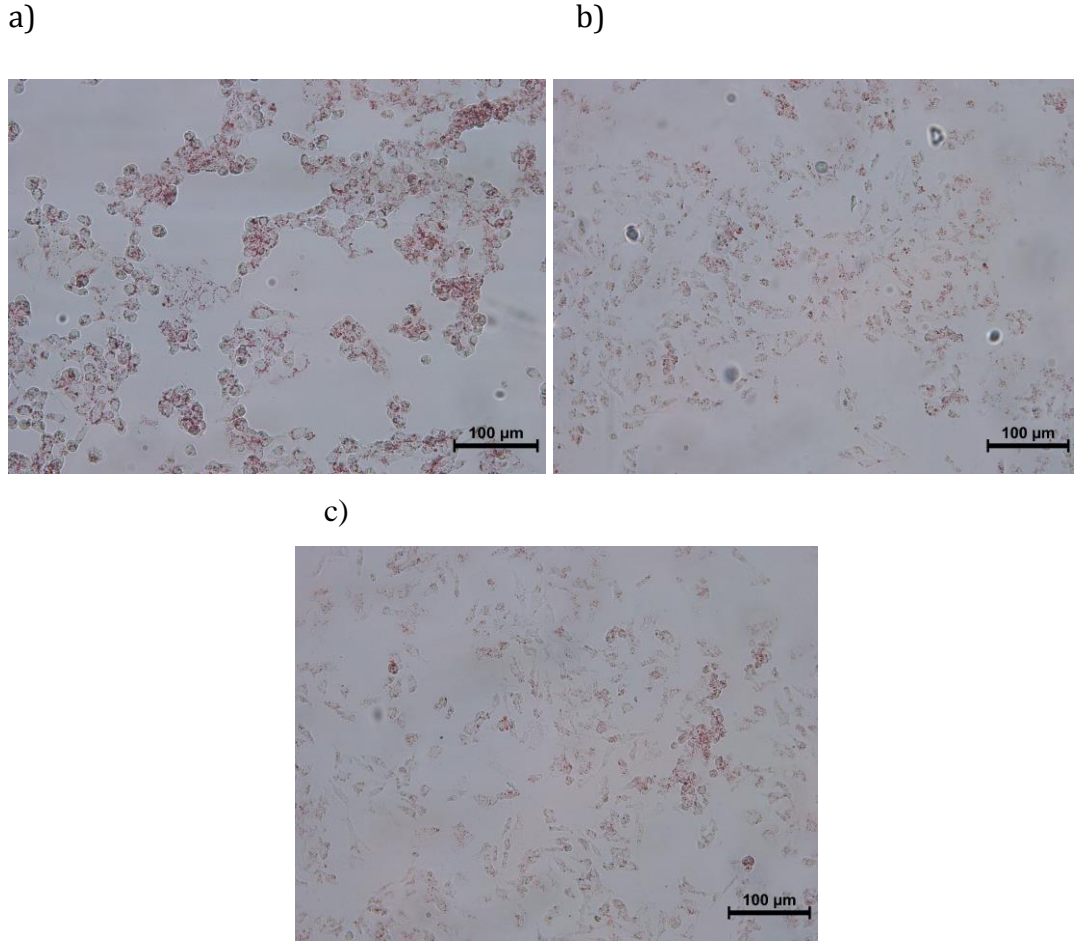
4.4.3. Oil Red O ile boyama sonrası ışık mikroskobu bulguları

Akım sitometri ve PCR analiz sonuçlarında 48 saatlik inkübasyon sürelerindeki hücreler daha anlamlı sonuç verdiği için Oil Red O boyamasının 48 saatlik sonuçları değerlendirildi. Sonuçları gösterirken yararlanılan kısaltmalar şu şekildedir.

48 saat inkübasyon süresince:

Herhangi bir uygulama yapılmayan	:Kontrol
Sadece LA uygulaması yapılan	:LA
Sadece ALA uygulaması yapılan	:ALA
Sadece transfeksiyon ajanı uygulanan	:Tr (-)
BChE transfeksiyonu yapılan	:Tr (+)
BChE transfeksiyonu takiben LA uygulanan	:Tr (+) + LA
BChE transfeksiyonu takiben LA uygulanan	:Tr (+) + ALA

HepG2 hücrelerinin 48 saatlik kontrol, LA ve ALA uygulamasının Oil Red O boyaması X20 objektif büyütme ile ışık mikroskobu görünümü aşağıda yer almaktadır. (Şekil 4.11).

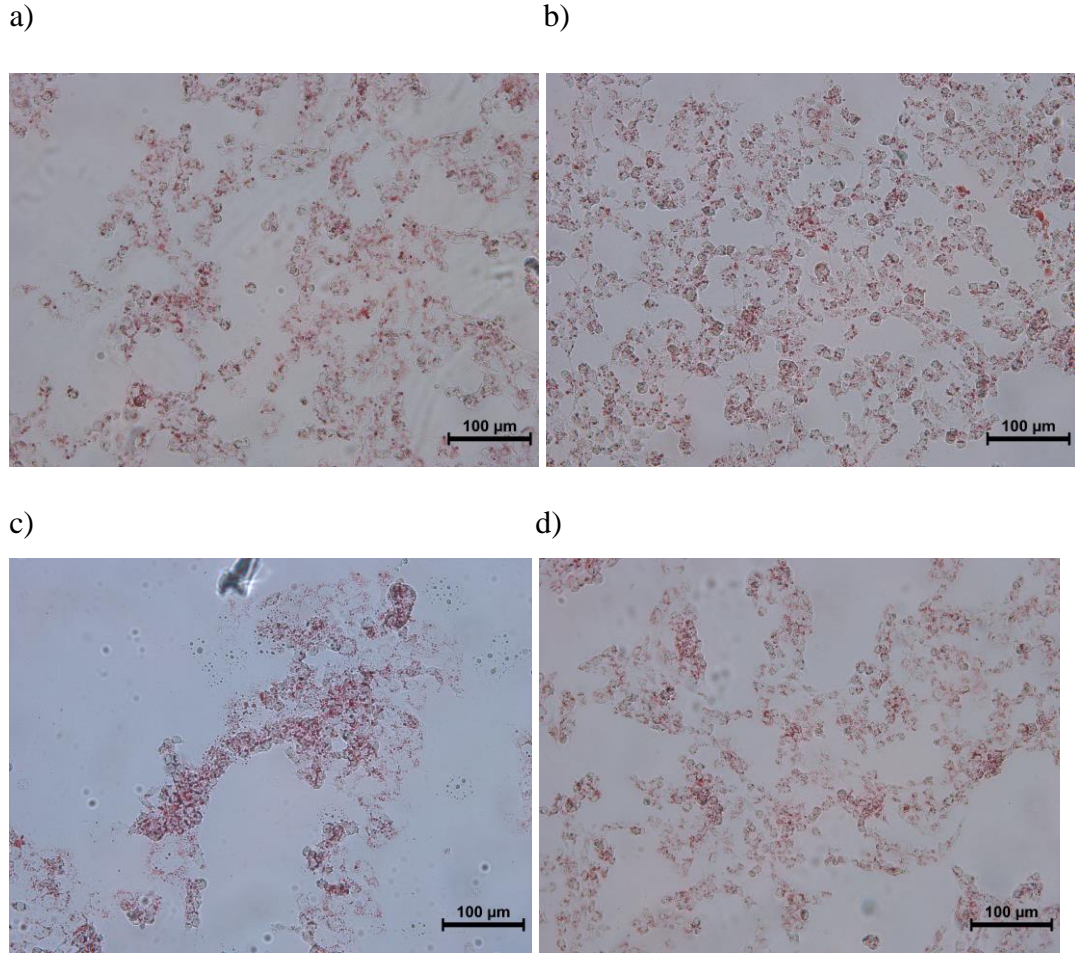


a) Kontrol b) LA c) ALA

Şekil 4.11. 48 saat inkübasyon sonrası Oil Red O boyamasının X20 objektif büyütme ile ışık mikroskobu görünümü

48 saat LA ve ALA uygulaması sonrası HepG2 hücrelerinin hücre membranlarına yakın yerleşimli, büyük yuvarlak ve Oil Red O boyası ile kırmızı boyanmış lipid damlaları izlendi (Bkz. 4.11).

BChE transfeksiyonunu takiben 48 saatlik LA ve ALA uygulamasına ait sonuçlar Şekil 4.12’de verilmiştir.

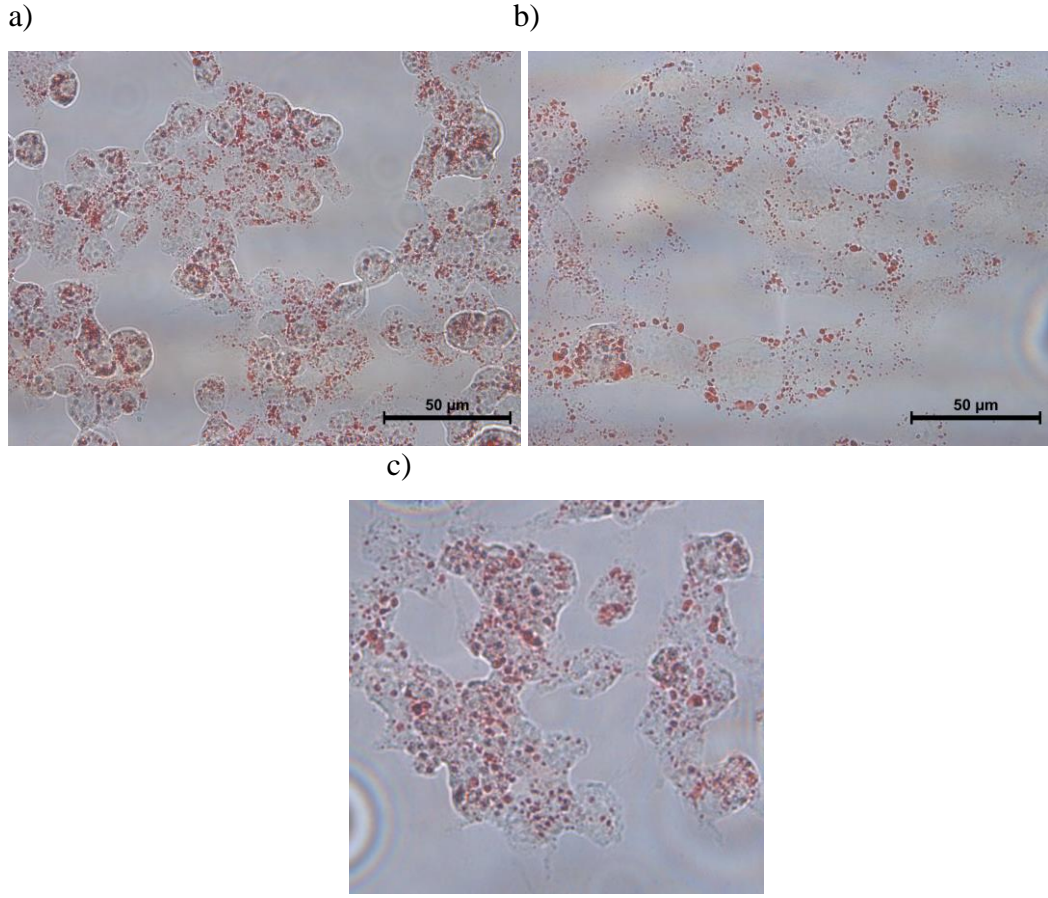


a) Tr (-) b) Tr (+) c) Tr (+) + LA d) Tr (+) + ALA

Şekil 4.12. 48 saat inkübasyon sonrası Oil Red O boyamasının X20 objektif büyütme ile ışık mikroskobu görünümü

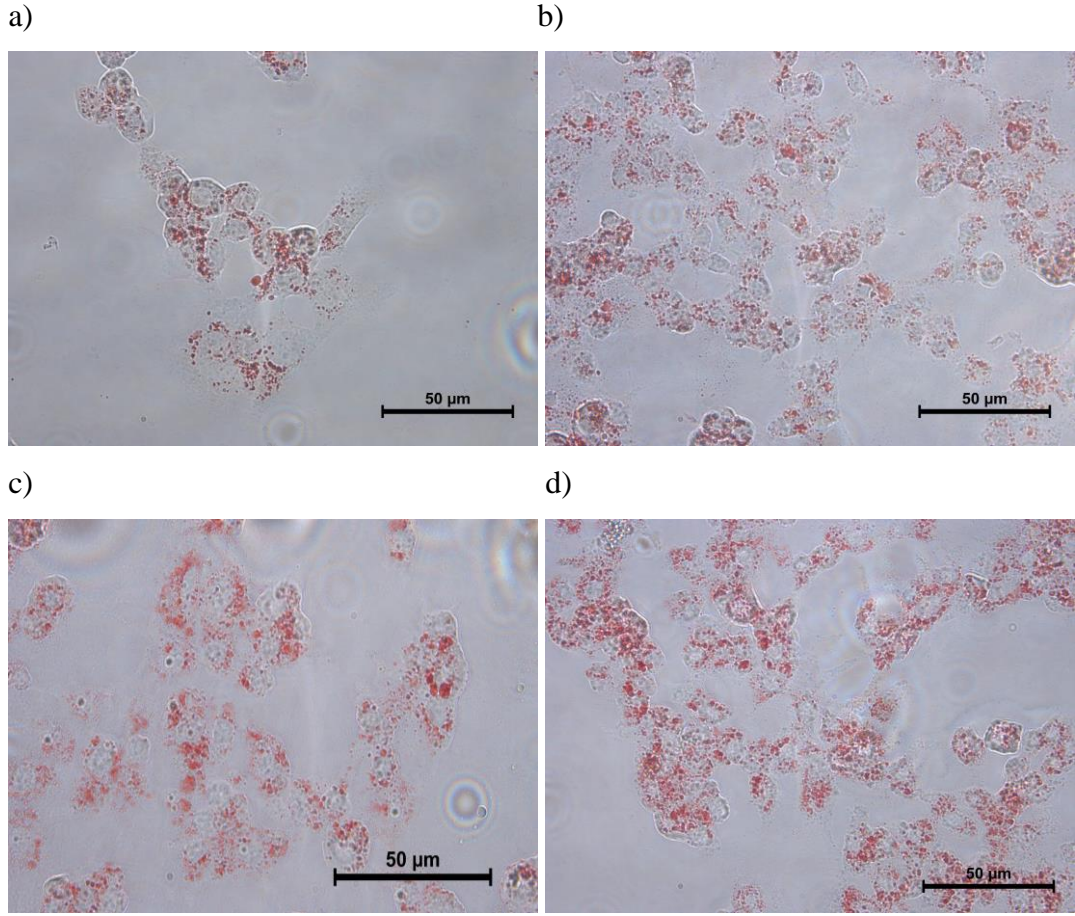
Sadece transfeksiyon ajanı [Tr (-)] verilen hücreler hücre sayısı bakımından en az iken, Tr (+) ile birlikte hücre sayısında belirgin bir artış görülmektedir. Tr (+) + ALA grubundaki hücre sayısı Tr (+) + LA'ya göre daha fazla gözlemlendi.

HepG2 hücrelerinin 48 saatlik kontrol, LA, ALA ve transfeksiyon işlemini takiben LA ve ALA uygulamalarının Oil Red O boyaması X63 objektif büyütme ile ışık mikroskobu görünümü Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te verilmiştir.



a) Kontrol b) LA c) ALA

Şekil 4.13. 48 saat inkübasyon sonrası Oil Red O boyamasının X63 objektif büyütme ile ışık mikroskobu görünümü



a) Tr (-) b) Tr (+) c) Tr (+) + LA d) Tr (+) +ALA

Şekil 4.14. 48 saat inkübasyon sonrası Oil Red O boyamasının X63 objektif büyütme ile ışık mikroskobu görünümü

HepG2 karaciğer kanser hücre hattına ait hücreler ışık mikroskobu altındaki X63 objektif büyütmedeki incelemesinde kontrol grubu yaygın olarak perinükleer yerleşimli çekirdek etrafını halka şeklinde sarmış Oil Red O boyası ile kırmızı boyalı lipid damlaları içermektedir. Tüm gruplarda Oil Red O boyası ile kırmızı boyanmış lipid damlaları çekirdeğin etrafında gözlemlendi. Lipid damlaları hücrelerin birbirleri ile bağlantı yaptığı alanlarda daha yoğun olarak izlendi. Hücrelerin diğer hücrelerle bağlantı yapmadığı kısımlarda şeffaf ve parlak hücre zarı, altında sitoplazma gözlemlendi. Plazmid transfeksiyonu sonrası yağ asidi uygulamasında sitoplazma daha fazla yağ damlası içermekteydi. Gruplar karşılaştırıldığında Tr(-), Tr(+), Tr(+)+ALA gruplarında hücrelerin Tr(+)+LA grubu hücrelerine göre hücre sitoplazma-çekirdek oranı, şeffaf sitoplazmaları ile daha sağlıklı bir görünüme sahip oldukları izlendi.

Tr(+)+LA grubunda ise daha az hücrenin tutunduğu ve tutunan hücrelerin hayalet hücre görünümü aldığı gözlemlendi. Hücrelerin çekirdek-sitoplazma oranları da değişti. Ayrıca sadece transfeksiyon ajanı Tr (-) uygulanan hücrelerde lipid damlalarının kontrole göre arttığı, BChE transfeksiyonu yapılan [Tr (+)] hücrelerde lipid damlalarının en fazla olduğu gözlemlendi.

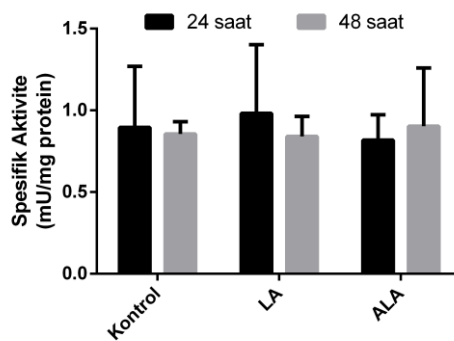
4.5. BChE Aktivite Sonuçları ve BChE Aktivite Boyaması

4.5.1. BChE aktivite sonuçları

Kontrol ve transfeksiyon yapılmış hücre gruplarında α -linolenik asit ve linoleik asit uygulaması sonrası 24 ve 48 saatlik inkübasyonun sonunda, karaciğer HepG2 üzerindeki besiyerleri enzim aktivitesi bakmak için toplandı.

Bütirikolinesteraz aktivitesi modifiye Ellman yöntemine göre yapıldı (61) Hücre kültüründe toplanan BChE içeren besiyeri ile spesifik AChE inhibitörü olan BW284C51'in 5dk inkübasyonu sonucu, ortama BTCh substratının en son eklenmesiyle başlatılan reaksiyon spektrofotometrede 37°C'de 90 saniye boyunca izlendi (ϵ_{412} , DTNB = 13.6 mM⁻¹ cm⁻¹). Aktivite ortamı, finalde 50 mM MOPS pH 7.4 tamponu, 0.25 mM DTNB, 1 mM BTCh ve 10 μ M BW284c51 ve yaklaşık 3 mU/ml BChE enzimi içermektedir. Tüm örnekler en az 3 defa çalışıldı.

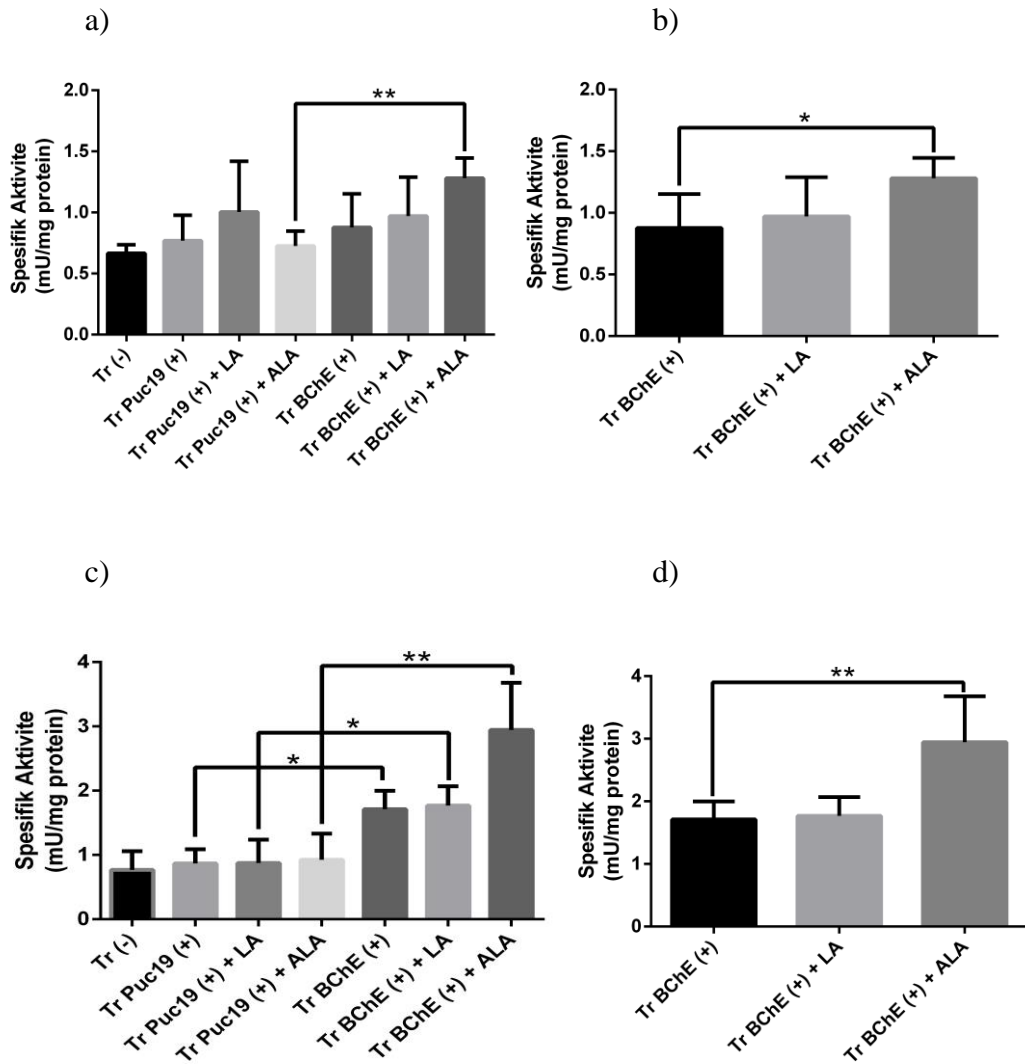
BChE aktivitesi öncelikle transfeksiyon işlemi yapılmayan karaciğer HepG2 hücrelerinin besiyerinde bakıldı. Elde edilen sonuçlar arasında fark olup olmadığı Kruskal-Wallis varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilip grafik olarak şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Transfeksiyon işlemi yapılmayan örneklerin besiyerinde BChE aktivitesi

Şekilde görüldüğü gibi, transfeksiyon işlemi yapılmayan karaciğer HepG2 hücrelerinden toplanan besiyerinde BChE aktivitesi çok düşüktü. Ayrıca LA ve ALA'nın 24 ve 48 saatlik uygulamaları, BChE aktivitesini değiştirmemektedir.

Transfeksiyon işlemi takiben 24-48 saatlik LA ya da ALA uygulamaları yapılan karaciğer HepG2 hücrelerinden toplanan besiyerinde, BChE aktivitesi bakıldı ve sonuçlar non-parametrik Mann Whitney U testi ile istatistiksel olarak değerlendirilip grafik olarak şekil 4.16'da gösterilmiştir.



a) ve b) 24 saat inkübasyon, c) ve d) 48 saat inkübasyon (kısaltmalar için Bkz. 4.4.3).

*, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$

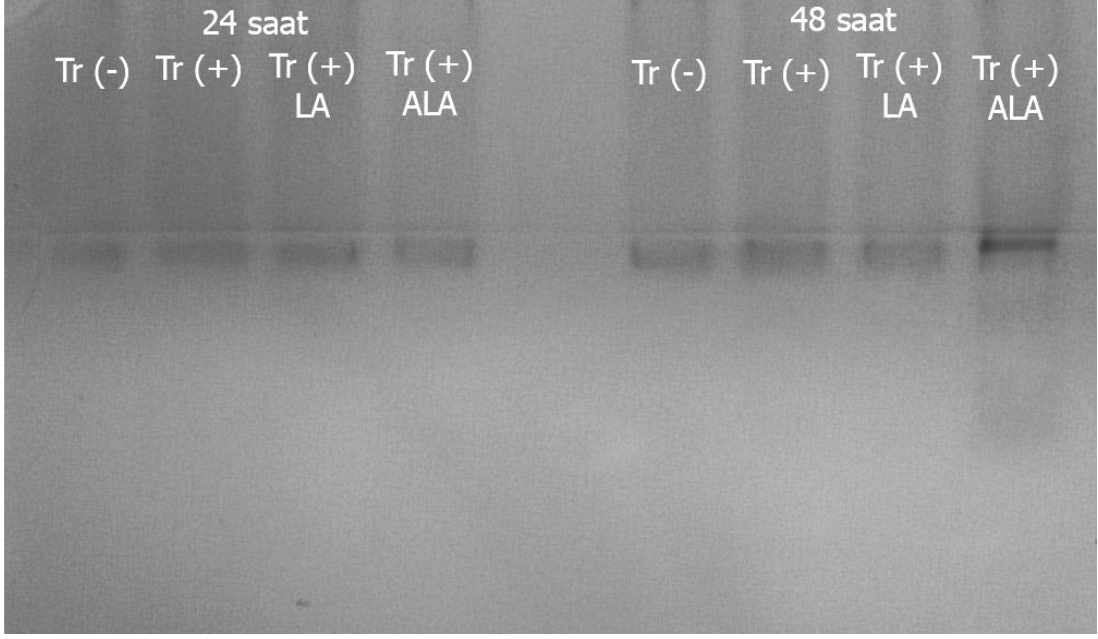
Şekil 4.16. Transfeksiyon işlemi yapılan örneklerin besiyerinde BChE aktivitesi

Şekil 4.16'daki grafik sonucuna bakıldığında, BChE transfeksiyonu yapılan karaciğer HepG2 hücrelerinin besiyerinde, 24 saat inkübasyon sonunda belirgin bir aktivite artışı yok iken, BChE transfeksiyonu işlemini takiben 48 saatlik inkübasyon sonunda BChE aktivitesinde 1,5-2 katlık bir artış gözlenmektedir. Ayrıca BChE transfeksiyonu sonrası 48 saatlik LA uygulaması, BChE aktivitesinde herhangi bir artışa neden olmazken, 48 saatlik ALA uygulamasıyla birlikte BChE aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür ($p=0,0095$). Bu sonuçlar, ALA uygulamasının BChE aktivitesini belirgin bir biçimde artırdığını göstermektedir.

Puc19 kontrol plazmidi transfeksiyonu yapılan karaciğer HepG2 hücrelerinin besiyerinde, 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda BChE aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış yoktur. Ayrıca puc19 kontrol plazmidi transfeksiyonu sonrası 24 ve 48 saatlik LA veya ALA uygulaması, BChE aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir değişikliğe neden olmamaktadır. Bu da transfeksiyon işleminin, BChE aktivitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığını göstermektedir.

4.5.2. BChE aktivite boyaması

BChE enziminin kontrolü için %4'lük yükleme jeli ve %7.5'lük ayırıcı jel içeren natif poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Natif poliakrilamid jel elektroforezinden sonra, Karnovsky yöntemi (66) sonucunda elde edilen jel görüntüsü şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. BChE aktivite boyaması sonunda elde edilen jel görüntüsü

BChE transfeksiyonu yapılan [Tr (+)] örneklerdeki bant görüntüsü, BChE transfeksiyonu yapılmayan [Tr (-)] örneklerdeki banttandan daha koyu renkte görülmektedir. Bunun nedeni, BChE aktivitesinin BChE transfeksiyonu yapılan örneklerin besiyerinde daha fazla olmasıdır. Ayrıca, BChE transfeksiyonunu takiben 48 saatlik ALA uygulamasının bant görüntüsünün en koyu olması, BChE aktivite sonuçlarını desteklemektedir.

5. TARTIŞMA

Bütirilkolinesteraz (BChE) serumda bulunduğu ve karaciğerde sentezlendiği için, beslenme düzeyi, inflamasyon varlığı, nörofizyolojik bozukluklar ve tümör gelişimi gibi pek çok patolojik durumda dokulardaki, özellikle serumdaki düzeyi değişmektedir (45). BChE'nin lipid metabolizmasında henüz belirlenememiş bir rolü olduğu düşünülmektedir. Kutty ve diğ. (14) şişman, diyabetik ve normal fareler ile yaptıkları çalışmalarında, genetik olarak şişman veya diyabetik olan farelerin kontrollere oranla %100 – 150 kez daha yüksek BChE aktiviteleri olduğunu saptamışlardır. Ayrıca yüksek kalorili bir diyet ile beslenen kontrol grubunda da benzer BChE aktivitesine rastlamışlardır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, bütirilkolinesteraz gen eksikliği sağlanan farelerde yüksek yağ içerikli diyetin, obeziteye yol açtığı görülmüştür (44).

L'Hermite ve diğ. (9)'nin yaptığı çalışmada sıçan barsağı epitel kript hücreleri ve villuslarda BChE varlığını saptamıştır. Bu çalışmada enterositlerdeki BChE dağılımı, bu dokuda sentezlenip ekzositoz yolu ile hücreler arası boşluğa salınan ve BChE içeren lipid damlacıkları ile gösterilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak araştırmacılar, BChE'nin lipid metabolizmasında ve enterositlerin yenilenmesi ile intestinal villuslara hareketinde rol oynayabileceği kanısına varmışlardır.

Çalışmamızda insan kaynaklı karaciğer hücrelerinin (HepG2) kültürü yapılmıştır. Karaciğer hücrelerinin seçilmiş olmasının nedeni, karaciğerin metabolik olarak çok aktif bir organ olması, karaciğer hücrelerinin glukoz metabolizmasında önemli role sahip olması ve karaciğerin metabolik sendromdan en çok etkilenen organ olmasıdır. HepG2 hücrelerinin normal karaciğer hücreleri ile benzerliklerinin olması ve literatürde benzer çalışmalarda sıklıkla kullanılmaları nedeniyle çalışmamızda tercih edilmişlerdir. HepG2 (insan hepatoselüler karsinoma) daimi hücre hattı, 15 yaşında iyi derecede farklılaşma gösteren hücrelere sahip olan Amerikalı beyaz bir erkeğin hepatoselüler karsinoma örneğinden hazırlanmıştır. Çoğalma özellikleri ve salgıladıkları proteinler nedeniyle özellikle lipid metabolizması ile ilgili işlevlerin incelenmesi amacıyla kullanılacakları belirtilmiştir (67).

Karaciğer HepG2 hücrelerinin, BChE ekspresyonu göstermediğini PCR ve BChE aktivitesi sonuçlarına bakarak söyleyebiliriz. BChE'yi lipid metabolizması ile ilişkilendirebilmek için BChE cDNA'sı içeren plazmidin karaciğer HepG2 hücrelerine transfeksiyonu ile BChE ifadesini arttırıldı. Transfeksiyon işleminin başarılı bir biçimde gerçekleştiğini BChE aktivitesindeki artış ve PCR'daki BChE mRNA ekspresyonundaki artış ile görmekteyiz.

Doz bağımlı sitotoksosite çalışması ile LA ve ALA için 5 μ M konsantrasyonları çalışma için uygun doz olarak belirlenmiştir. LA uygulaması ile hücrede fiziksel değişiklikler meydana geldi. LA uygulaması yapılan hücreler hayalet hücre görünümündeydi. Bu yapı değişikliğinden dolayı hücrelerin tutunduğu yüzeyle etkileşimi azalıp ve hücre sayısında kontrol hücrelerine göre belirgin bir düşüş gözlemlendi. Ancak, BChE'nin HepG2 hücrelerine transfeksiyonu [Tr (+)]'nu takiben LA uygulamasıyla birlikte, hücrelerin fiziksel görünümünde düzelme meydana gelirken, hücre sayısında da belirgin bir artış gözlemlendi.

Escalera ve diğ. (43) *Drosophila*'dan nörotaktin adı verilen bir transmembran proteininin BChE'ye benzediğini saptamışlardır. Nörotaktin bir sinir hücresi yapışma molekülü olup HNK-1 adı verilen bir şeker epitopu içermektedir. Tavuk serum, beyin BChE'yi ve Torpedo AChE'yi HNK-1 epitopu taşımaktadır. Bu nedenle BChE'nin sinir hücresi yapışma molekülü özelliğine sahip olabileceği düşünülmektedir. Transfeksiyon işlemi yapılmayan HepG2 hücrelerindeki ALA uygulaması, LA'nın sitotoksik etkisinin tersine hücre canlılığını arttırdığı, BChE'nin HepG2 hücrelerine transfeksiyonu [Tr (+)] takiben ALA uygulamasıyla birlikte ise hücre sayısında daha belirgin bir artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca transfeksiyon işleminden dolayı hücrelerin değişen fiziksel görünümünde de ciddi bir iyileşme gözlemlendi ve görüntüsü transfeksiyon işlemi yapılmamış kontrol hücrelerine benzemektedir.

Hücrelerin ışık mikroskobu sonuçlarına baktığımızda, LA uygulanan hücreler LA'yı hücre içerisine almazken, Tr (+) sonrası LA uygulamasıyla birlikte hücre içerisindeki lipid damlasında artış gözlemlendi. ALA ile hücre içerisindeki lipid damlaları sayıca LA'ya göre daha fazlaydı ama Tr (+) sonrası ALA uygulamasıyla birlikte hücre içerisindeki lipid damlaları daha da arttı. Transfeksiyon ajanı uygulanan hücrelerin [Tr (-)] içerisindeki yağ miktarının kontrole göre daha fazla

olması transfeksiyon ajanının yağlı olmasından kaynaklanmaktadır. Tr (+) hücreleri ile Tr (-) hücreleri kıyaslandığında, Tr (+)'deki yağ miktarının belirgin bir şekilde daha fazla olması, BChE transfeksiyonun hücre içerisine LA ve ALA yağ asitlerinin alımını kolaylaştırdığını söyleyebiliriz. BChE'nin hücre içerisine alınan esansiyel yağ asitlerini (LA ve ALA) hücreye kullandığını da düşünmekteyiz. Daha önce barsak villuslarında lipid damlacıkları ile beraber gözlenen BChE bulgusu (9), bu düşüncemize destek sağlamaktadır.

Kolinesterazlar (AChE ve BChE) arasında ters orantılı bir ekspresyon vardır. Hücrelerin çoğalması sırasında BChE ekspresyonu fazla iken, farklılaşma sırasında AChE ekspresyonu fazladır (68). Dışarıdan BChE transfeksiyonu ile özellikle LA'da gözlenen sitotoksosite ve hücre hasarını geri çevirip hücre canlılığında belirgin bir biçimde arttırdığını gözlemledik. Bu sonuç, BChE'nin hücre proliferasyonunda görev aldığını düşündürmektedir. Özellikle lipidten zengin sinir, barsak gibi dokularda yaygın ve aktif BChE ekspresyonu gözlenmesi, bu dokularda BChE'nin klasik kolinerjik hidroliz dışında bir işleve sahip olabileceğine işaret etmektedir. Özellikle adipoz dokuda gözlenen ve tekrarlanan deksametazon uygulamasında etkilenen BChE aktivitesi, bu enzimin lipid metabolizması ile ilgili bir işlevi olduğuna işaret eder (69, 70).

Transfeksiyon işlemi takiben 24 saat inkübasyon sonrası kontrole göre azalan hücre canlılığı, 48 saatlik inkübasyon sonunda arttığı ve bu artışın transfeksiyon sonrası ALA uygulaması ile daha da arttığını akım sitometri analiz sonuçlarına bakarak söyleyebiliriz. LA ve ALA'nın anti-enflamatuvar etkinliğinin olduğu birçok çalışma vardır (71-73). Benzer etkiyi transfeksiyon işlemi sonrası hücre içerisinde ALA'nın arttırmasını takiben anti-enflamatuvar yanıt oluştuğunu düşünebiliriz. BChE transfeksiyon işlemi takiben 48 saatlik ALA uygulaması sonrası, kanserli HepG2 hücrelerini (kontrol) apoptozdan çıkarıp, çoğunluğu canlı hücre sayısında artış olmak üzere bir miktar da nekroza sokmaktadır. Bu durum BChE'nin dolaylı olarak (ALA'nın hücre içerisindeki artışını sağlayarak) anti-enflamatuvar etkinliği arttırdığını düşündürmektedir.

Bu çalışmanın amacı lipid metabolizması ile BChE arasında ilişkisinin incelenmesiydi. Elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirildiğinde, BChE transfeksiyon işlemi ile birlikte hücre içerisinde arttırılan ALA ve LA'nın hücre tarafından etkin

kullanımı sonucu başta hücre canlılığında artışa, hücre görünümünde de düzelmelere neden olarak anti-enflamatuvar etkinliğinin artmasına yol açtığını düşündürmektedir. Bir önceki çalışmamızda sedanter genç erkeklere egzersiz ve linoleik asidin farklı izomerlerinden oluşan konjuge linoleik asit (CLA) içeren bir egzersiz ve diyet uygulamıştık (17). Çalışma sonucunda, hem egzersiz hem de egzersiz ile beraber CLA suplementasyonunun serum BChE seviyelerinde düşüş ile beraber artan post-heparin lipoprotein lipaz (LPL) aktivitesi ve insülin duyarlılığı rapor edilmişti. Karaciğerde sentezlenen VLDL miktarında da paralel düşüş gözleendiğinden obezite sınırında olan bu popülasyonda BChE'nin sentetik kapasitenin belirteci olarak değerlendirilebileceği öne sürülmüştü. Ayrıca literatürde artan serum BChE aktivitesini obezite, hepatik yağ içeriği ve hiperlipidemi ile ilişkilendiren çok sayıda rapor bulunmaktadır (15, 74-76). Bu bulgular, güncel çalışma bulguları ile çelişiyor gibi görünse de aslında bir tür hepatoma hücresi olan HepG2 hücrelerine esansiyel yağ alımının BChE ekspresyonu ile artışının proliferasyona ve sonuç olarak yağlı karaciğer oluşumuna neden olabildiğini söyleyebiliriz. Obez kişilerde gözlenen merkezi yağlanma, BChE aracılı proliferasyon kökenli olabilir.

Bütirilkolinesterazın doğrudan lipid metabolizması ile ilişkisini gösterimi hem enzimatik hem de non-enzimatik yollar ile gerçekleşebilir. Bu çalışmada temel gözlemlerimizden biri BChE transfeksiyonunun daha önce sitotoksik etkileri baskın olan LA uygulamasının etkilerini geri çevirmesidir. BChE transfeksiyonu yapılmadan LA uygulanan hücrelerde gözlenen yapışma ve çoğalma gücü, transfeksiyon sonrası azalmış, hayalet hücreler gözlene bile canlılık artmıştır. Biz bu etkinin belki de non-enzimatik aktivite kökenli olduğunu, yani BChE'nin adhezyon molekülü benzerliğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Uygulanan yağ asitlerinden daha doymamış olan ALA ile beraber gözlenen BChE ve hücre canlılığında artış, enzimin proliferasyon ile olan ilişkisini desteklemektedir. ALA, çoklu doymamış yağ asitleri olan eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) sentezinin substratı olarak işlev görür. Bu iki yağ asidi eikosanoid yapıda olup enflamatuvar yanıtta görev alırlar. Son zamanlarda yapılan yayınlar kolinesterazlar ile enflamasyon arasında ilişki olduğuna işaret etmektedir (45,77). Bulgularımızda bize BChE'nin esansiyel yağ asitlerinin

kullanımını arttırarak bu yanıtta katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Şu an yaptığımız çalışmalar ile BChE'nin lipid metabolizması ile ilişkisini açıklamak tam anlamı ile mümkün değildir. Ancak proliferasyon ve hücreye lipid alınımına katkıda bulunduğunu söyleyebiliriz.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bulgularımız BChE'nin esansiyel yağ asitlerinin kullanımını arttırdığını ancak lipid metabolizması ile ilişkili olduğunu söylemek için bulgularımızı destekleyecek başka parametrelere bakmak gerektiğini düşünmekteyiz. Bu parametrelerden bazıları:

- Puc19 kontrol plazmidi verilen karaciğer HepG2 hücrelerini de Oil Red O boyaması yapılmalı.
- Hücre içerisine alınan yağ miktarını belirlemek için GC-MS tayini yapılabilir.
- Kanserli karaciğer HepG2 hücreleri yerine kanserli olmayan normal karaciğer hücrelerinde yapılabilir.
- BChE'nin serumdan kaynaklandığını düşündüğümüz aktivitesini elimine etmek için, ultra culture (serumsuz) besiyeri kullanmak daha iyi olabilir.
- Enflamatuvar yanıt ile ilişkilendirilecekse, enflamasyonla ilişkili parametrelere bakılması gerekir.
- Son olarak BChE ile lipid metabolizması ilişkisine adipositlerde bakılabilir.

KAYNAKLAR

1. Brown SS, Kallow W, Pilz W, Whittaker M, Woronick CL. (1981). The plasma cholinesterases: A new perspective. *Adv Clin Chem*, 22: 1 – 123.
2. Heilborn E. (1993). Molecular biology of cholinesterases: A background and an introduction. *Prog Brain Res* 98: 133-138.
3. Radić Z, Pickering NA, Vellom DC, Camp S, and Taylor P. (1993). Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry* 32: 12074-12084.
4. Friede RL. (1967). A comparative histochemical mapping of butyryl cholinesterase in the brains of four species of mammals, including man. *Acta Anat*, 66: 161-177.
5. Rhytäen RJJ. (1983). Pseudocholinesterase activity in some body fluids. *Gen Pharmacol*, 14: 459-460.
6. Sine JP, Ferrand R, Colas B, Cloarec D, Lehur PA. (1991). Human intestine epithelial cell acetyl- and butyrylcholinesterase. *Mol Cell Biochem*, 108: 145-149.
7. Lockridge O, Blong RM, Masson P, Froment M, Millard CB, and Broomfield CA. (1997). A single amino acid substitution, Gly117His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 36: 786-795.
8. Gorelick DA. (1997). Enhancing cocaine metabolism with butyrylcholinesterase as a treatment strategy. *Drug Alcohol Depen*, 48:159-165
9. L'Hermite, A., Sine, J., Colas, B. (1995). Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase in epithelial cells of rat intestine. *European journal of histochemistry: EJH*, 40 (4), 299-304.
10. Lockridge O. (1988). Structure of human serum cholinesterase. *Bioessays*, 9: 12-128.
11. Lockridge O, and La Du BN (1978). Comparison of atypical and usual human cholinesterase: purification, number of active sites, substrate affinity and turn-over number. *J Biol Chem*, 256: 361-366.

12. Massoullie J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E and Valette FM. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*, 41: 31-91
13. Sine JP, Ferrand R, Colas B. (1990). Embryonic and post-natal changes in activity and molecular forms of mucosal cell butyrylcholinesterase in chicken intestine. *Mol Cell Biochem*, 96: 143-51.
14. Kutty KM, Huang SN and Kean KT. (1981). Pseudochoolinesterase in obesity: hypercaloric diet induces changes in experimental obese mice. *Experientia*, 37: 141 – 142.
15. Jain R, Kutty KM, Huang SN and Kean KT. (1983). Pseudochoolinesterase HDL cholesterol ratio in serum of normal persons and hyperlipoproteinemics. *Clin Chem*, 2916: 1031 – 1033.
16. Van Lith HA, Meijer GW, Haller M and Beynen AC. (1991). Serum pseudochoolinesterase activity in rabbits fed simvastatin. *Biochem. Pharmacol*, 41: 460- 461
17. Bulut S, Bodur E, Colak R, Turnagol H. (2013). Effects of conjugated linoleic acid supplementation and exercise on post-heparin lipoprotein lipase, butyrylcholinesterase, blood lipid profile and glucose metabolism in young men. *Chem Biol Interact.*, 203: 323–329.
18. Çokuğraş, A.N. (2003). Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk J Biochem*, 28 (2), 54-61.
19. Sussman, J.L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. ve diğ erleri. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253 (5022), 872-879.
20. Jokanović, M., Maksimović, M. (1997). Abnormal cholinesterase activity: understanding and interpretation [Bildiri]. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry: journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*.
21. Beach, T.G., Kuo, Y.-M., Spiegel, K., Emmerling, M.R., Sue, L.I., Kokjohn, K. ve diğ erleri. (2000). The cholinergic deficit coincides with A β deposition at the earliest histopathologic stages of Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 59 (4), 308-313.

22. Darvesh, S., Hopkins, D.A., Geula, C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*, 4 (2), 131-138.
23. Arpagaus M., Kott M., Vartsis K.P., Bartels C.F., La Du B.N. and Lockridge O. (1990). Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy, *Biochemistry*, 29, 124 – 131.
24. Soreq H., Zamir R., Zevin – Sonkin D. and Zakut H. (1987). Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16, *Hum. Genet.*, 77, 125 – 128.
25. Gnat A., Prody C.A., Zamir R., Lieman – Hurwitz J., Zakut H. and Soreq H. (1990). Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase m-Rna transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous system tumours, *Cancer Res.*, 50, 1983–1987.
26. Sternfield M., Rachmilewitz J., Loewenstein – Lichtenstein Y., Andreas C., Zimberg R., Ben – Ari S., Soreq H. and Zakut H. (1997). Normal and atypical butyrylcholinesterases in placental development, function and malfunction, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 17, 315 – 332.
27. Krasowski M.D., Mc Gehee D.S. and Moss J. (1997). Natural inhibitors of cholinesterases: implications for adverse drug reactions, *Can. J. Anaesth.*, 44, 525 – 534.
28. Primo – Parmo S.L., Lightstone H. and La Du B.N. (1997). Characterization of an unstable variant of human butyrylcholinesterase, *Pharmacogenetics*, 7, 27 – 34.
29. Brass N., Rácz A., Heckel D., Remberger K., Sybrecht w. and Meese E.U. (1997). Amplification of the genes BCHE and SLCA2A2 in 40 % of squamous cell carcinoma of the lung, *Cancer Res.*, 57, 2290 – 94.
30. Saxena, A., Redman, A.M., Jiang, X., Lockridge, O., Doctor, B. (1997). Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 36 (48), 14642-14651.
31. Lockridge, O., Mottershaw-Jackson, N., Eckerson, H.W., La Du, B.N. (1980). Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum

- cholinesterase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 215 (1), 1-8.
32. Gatley, S.J. (1991). Activities of the enantiomers of cocaine and some related compounds as substrates and inhibitors of plasma butyrylcholinesterase. *Biochemical pharmacology*, 41 (8), 1249-1254.
33. Masson, P., Froment, M.-T., Fortier, P.-L., Visicchio, J.-E., Bartels, C.F., Lockridge, O. (1998). Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1387 (1), 41-52.
34. George, S. T. & Balasubramanian, A. S (1981). The aryl acylamidases and their relationship to cholinesterases in human serum, erythrocyte and liver. *Eur. J. Biochem.*, 121, 177–186.
35. Masson, P., Rochu, D. (2009). Catalytic bioscavengers against toxic esters, an alternative approach for prophylaxis and treatments of poisonings. *Acta Naturae*, 1, 68-77.
36. Darvesh, S., McDonald, R.S., Darvesh, K.V., Mataija, D., Mothana, S., Cook, H. ve diğ erleri. (2006) On the active site for hydrolysis of aryl amides and choline esters by human cholinesterases. *Bioorg Med Chem*, 14 (13), 4586-4599.
37. Guillozet, A., Mesulam, M.M., Smiley, J., Mash, D. (1997). Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Annals of neurology*, 42 (6), 909-918.
38. Masson, P., Froment, M.T., Gillon, E., Nachon, F., Lockridge, O., Schopfer, L.M. (2008). Kinetic analysis of effector modulation of butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of acetanilides and homologous esters. *FEBS J*, 275 (10), 2617-2631.
39. Tayeb, H.O., Yang, H.D., Price, B.H., Tarazi, F.I. (2012). Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacology & therapeutics*, 134 (1), 8-25.

40. Chatonnet, A., Masson, P. (1986). Is the peptidase activity of highly purified human plasma cholinesterase due to a specific cholinesterase isoenzyme or a contaminating dipeptidylaminopeptidase? *Biochimie*, 68 (5), 657-667.
41. Massoulié, J., Sussman, J., Bon, S., Silman, I. (1993). Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Progress in brain research*, 98, 139-146.
42. Layer, P.G. (1995). Nonclassical roles of cholinesterases in the embryonic brain and possible links to Alzheimer disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 9, 29-36.
43. De la Escalera, S., Bockamp, E., Moya, F., Piovant, M., Jimenez, F. (1990). Characterization and gene cloning of neurotactin, a Drosophila transmembrane protein related to cholinesterases. *The EMBO journal*, 9 (11), 3593.
44. Li, B., Duysen, E.G., Lockridge, O. (2008). The butyrylcholinesterase knockout mouse is obese on a high-fat diet. *Chemico-biological interactions*, 175 (1), 88-91.
45. Polachini, C., Spanevello, R., Casali, E., Zanini, D., Pereira, L., Martins, C. ve diğ erleri. (2014). Alterations in the cholinesterase and adenosine deaminase activities and inflammation biomarker levels in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience*, 266, 266-274.
46. Santarpia, L., Grandone, I., Contaldo, F., Pasanisi, F. (2013). Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 4 (1), 31-39.
47. Ofek, K., Soreq, H. (2013). Cholinergic involvement and manipulation approaches in multiple system disorders. *Chemico-biological interactions*, 203 (1), 113-119.
48. Warude, D., Joshi, K., Harsulkar, A. (2006). Polyunsaturated fatty acids: biotechnology. *Critical reviews in biotechnology*, 26 (2), 83-93.
49. SanGiovanni, J.P., Chew, E.Y. (2005). The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Progress in retinal and eye research*, 24 (1), 87-138.

50. Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J., Willett, W.C. (2006). Trans fatty acids and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, 354 (15), 1601-1613.
51. Dehn, P., White, C., Connors, D., Shipkey, G., Cumbo, T. (2004). TOXICOLOGY/CHEMICAL CARCINOGENESIS-Characterization of the Human Hepatocellular Carcinoma (HEPG2) Cell Line as an In Vitro Model for Cadmium Toxicity Studies. *In Vitro-Cellular and Developmental Biology-Animal Section*, 40 (5-6), 172.
52. Lee, M., Cheng, B., Che, C., Hsieh, D. (2000). Cytotoxicity assessment of Ma-huang (Ephedra) under different conditions of preparation. *Toxicological Sciences*, 56 (2), 424-430.
53. Ruffa, M., Ferraro, G., Wagner, M., Calcagno, M., Campos, R., Cavallaro, L. (2002). Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of ethnopharmacology*, 79 (3), 335-339.
54. Park, K.J., Yang, S., Eun, Y.A., Kim, S.Y., Lee, H.H., Kang, H. (2002). Cytotoxic effects of Korean medicinal herbs determined with hepatocellular carcinoma cell lines. *Pharmaceutical biology*, 40 (3), 189-195.
55. ATTC web sitesi (2015). <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HB-8065.aspx#culturemethod>
56. Strober, W. (2001) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, A. 3B. 1-A. 3B. 2.
57. Güleş, Ö., Eren, Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2) 73-78.
58. FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I ürün veri sayfası, BD Pharmingen™ (2015). https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSVerse_Apoptosis_Detection_AppNote.pdf
59. Ramirez-Zacarias, J., Castro-Munozledo, F., Kuri-Harcuch, W. (1992). Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry*, 97 (6), 493-497.

60. Arpagaus, M., Chatonnet, A., Masson, P., Newton, M., Vaughan, T., Bartels, C. ve diğeri. (1991). Use of the polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (11), 6966-6974.
61. George, P. & Abernethy, M. (1983). Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase, *Clinical chemistry*. 29, 365-368
62. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr., Feather-Stone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, 88-95.
63. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
64. Ornstein, L. (1964). Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121 (2), 321-349.
65. Cannon-Carlson, S., Tang, J. (1997). Modification of the Laemmli sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis procedure to eliminate artifacts on reducing and nonreducing gels. *Analytical biochemistry*, 246 (1), 146-148.
66. Karnovsky, M.J., Roots, L. (1964). A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 12 (3), 219-221.
67. Wang, S., Pessah, M., Infante, J., Catala, D., Salvat, C., Infante, R. (1988). Lipid and lipoprotein metabolism in Hep G2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 961 (3), 351-363.
68. Layer, P.G., Willbold, E. (1994). Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 29 (3), III-92.
69. Lucic Vrdoljak, A., Bradamante, V., Radic, B., Peraica, M., Fuchs, R., Reiner, Z. (2005). Butyrylcholinesterase activity and plasma lipids in dexamethasone treated rats. *Acta pharmaceutica*, 55 (2), 177-185.

70. Ballantyne, B. (1968). Histochemical and biochemical aspects of cholinesterase activity of adipose tissue. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 173 (2), 343-350.
71. James, M.J., Gibson, R.A., Cleland, L.G. (2000). Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *The American journal of clinical nutrition*, 71 (1), 343s-348s.
72. Simopoulos, A.P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, 21 (6), 495-505.
73. Mori, T.A., Beilin, L.J. (2004). Omega-3 fatty acids and inflammation. *Current atherosclerosis reports*, 6 (6), 461-467.
74. Chu, M.I., Fontaine P., Kutty, K.M., Murphy, D., Redheendran, R. (1978). Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients, *Clin. Chim. Acta*, 85, 55–59.
75. Kutty, K. M., Jain, R., Huang, S., Kean, K. (1981). Serum pseudocholinesterase: high density lipoprotein cholesterol ratio as an index of risk for cardiovascular disease, *Clin. Chim. Acta*, 115, 55–61.
76. Iwasaki, T., Yoneda, M., Nakajima, A. Terauchi, Y. (2007). Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, serum lipid profile and insulin resistance, *Intern. Med.* 46, 1633–1639.
77. Shenhar-Tsarfaty, S., Berliner, S., Bornstein, N.M., Soreq, H. (2014). Cholinesterases as biomarkers for parasympathetic dysfunction and inflammation-related disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 53 (3), 298-305.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 1028


7 11 2014

Doç.Dr.Ebru BODUR
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Sayın Doç.Drç. BODUR,

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunduğunuz GO 14/500 kayıt numaralı ve "*İnsan Serum Bütirikolinesterazının Karaciğer HepG2 Hücrelerinde Lipid Metabolizması ile Etkileşiminin İncelenmesi*" başlıklı proje, Kurulumuzun 01.10.2014 tarihli toplantısında değerlendirilmiş olup, çalışma materyalinin ticari olarak satın alınmış HepG2 karaciğer hücrelerinde yapılacağı insandan elde edilen primer kültürlerin kullanılmayacağı görülmüştür. Klinik Araştırmalar Yönetmeliği gereği gönüllü insanlar üzerinde gerçekleştirilecek nitelikte olmayan bu tip çalışmalar Etik Kurulların kapsamı dışında kalmaktadır.

Bu yazı Etik Kurul kararı yerine geçmek üzere hazırlanmıştır.


Prof. Dr. Nurten AKARSU
Başkan