

T.C
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tavşanlarda Akut Parasetamol Uygulamasının Karaciğerdeki CuZn-SOD, GSH-
Px ve Katalaz Enzimlerinin mRNA Seviyelerine Etkisi

Hüseyin TÜREL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Yard. Doç. Dr. Müslüm AKGÖZ

EKİM-2007
KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Hüseyin TÜREL'in yüksek lisans tezi olarak hazırladığı "**Tavşanlarda Akut Parasetamol Uygulamasının Karaciğerdeki Cu-Zn SOD, GSH Px ve Katalaz Enzimlerinin mRNA seviyelerine Etkisi**" adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ile kabul edilmiştir.

...../...../2007

Adı Soyadı	İmza
Başkan: Doç.Dr Müslüm Akgöz.....	
Üye :...Doç.Dr Sabri Ulukanlı.....	
Üye :...Yrd.Doç.Dr Yılmaz Çiğremiş.....	
Üye :.....	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../2007 tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Vahit ALIŞOĞLU

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak yayınlanmıştır.

Tavşanlara Parasetamol etken maddesini uygulayarak tavşan karaciğerindeki antioksidan enzimlerin mRNA seviyelerindeki değişiklikler incelendi.

Tez çalışmam boyunca bana her türlü desteği sağlayan, çalışmalarımın her aşamasında iğlisini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren danışman hocam, Sayın Yard. Doç. Dr. Müslüm AKGÖZ'E, çalışmalarım için kendi araştırma laboratuvarını kullanmamıza izin veren ve çalışmalarımın katkılarına esirgemeyen Sayın Yard. Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e, tavşanların yetiştirilmesi, bakımında ve tavşanların kesiminde yardımlarını esirgemeyen Sayın Dinçer ERDAĞ'a ve Sayın Orhan DOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen, sabırla beni destekleyen sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kars – 2007

Hüseyin TÜREL

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ	1
1.1.Parasetamol	1
1.1.1. Kullanım Alanları.....	2
1.1.2. Kullanımı Zararlı Alanlar	2
1.1.3. Uyarılar	2
1.2. Karaciğer	3
1.3. Serbest Oksijen Radikalleri	3
1.3.1. Süperoksit Radikali (O_2^-).....	4
1.3.2. Singlet Oksijen (1O_2) Radikali.....	6
1.3.3. Hidroksil Radikali ($OH \cdot$)	7
1.3.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Radikali	9
1.4. Oksidan Sistemlere Karşı Oluşturulan Antioksidan Sistemler	10
1.4.1. Glutasyon (GSH)	10
1.4.2. Myeloperoksidaz (MPO).....	11
1.4.3. Ksantin Oksidaz (XO)	13
1.5. Çalışmalarımızda Kullandığımız Antioksidan Sistemler	13
1.5.1. CuZn-SOD	13
1.5.2. Katalaz (CAT)	14
1.5.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	15
1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)	15
1.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarının Kullanım Alanları	16
1.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarının Prensipleri	16

1.6.2.1. Denaturasyon	17
1.6.2.2. Bağlanma	17
1.6.2.3. Uzama	17
1.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Bileşenleri	18
1.6.3.1. Kalıp DNA	18
1.6.3.2. Polimerazlar	19
1.6.3.3. Primerler	21
1.6.3.4. dNTP Karışımı	21
1.6.3.5. Tamponlar ve MgCl ₂	21
1.6.4. PZR'nin İşleyişi	22
1.6.5. Geri Transkripsiyon PZR (RT-PZR)	23
2. MATERYAL VE METOTLAR	24
2.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	24
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
2.3. Kullanılan Çözelti Ve Tamponlar	25
2.3.1. RNA Later Saklama Solüsyonunun Hazırlanması	25
2.3.2. RNA Denatüre Solüsyonu Hazırlanışı	25
2.3.3. 6M Guanidin Tiocyanate Hazırlanışı	26
2.3.4. 1M Sodyum Sitrat Hazırlanışı	26
2.3.5. RNA jeli.....	26
2.3.6. RNA'nın RNA jeline yükleme işlemleri.....	27
2.3.7. 10X MOPS Buffer Hazırlanışı.....	27
2.3.8. 0.5 M EDTA Hazırlanışı	27
2.3.9. 5X TBE Çözeltisinin Hazırlanışı	28
2.3.10. DNA Yükleme Tamponunun Hazırlanışı	28
2.4. Tavşanların Yetiştirilmesi ve Parasetamol Uygulaması.....	28
2.5. Standart Fenol-Kloroform Metodu Ile Toplam Rna Ekstraksiyonu	29
2.6. RNA Kit Protokolü	29
2.7. cDNA Sentezi Protokolü	30
2.8. PZR Protokolü	30
2.9. DNA Analizleri.....	31

3. SONUÇ VE TARTIŞMA	32
4. KAYNAKLAR	38
5. Ekler	46
5.1. Ek1. Cu-Zn SOD Gen Dizilimi	46
5.2. Ek2. Glutasyon Peroksidaz Gen Dizilimi	47
5.3. Ek3. Katalaz Gen Dizilimi	48
6. ÖZGEÇMİŞ	50

ÖZET

Parasetamol ağrı kesici ateş düşürücü olarak kullanılan bir ilaçtır. Karaciğer ve böbrekte metabolizma edilir. Diğer birçok ilaçta olduğu gibi Parasetamol de metabolize olurken vücutta serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır. Vücut bu radikalleri ortadan kaldırmak için antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir. Süper Oksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) bu sistemlerin en önemli enzimlerindedir.

Bu tezde Parasetamolün tavşan karaciğerindeki etkileri moleküler düzeyde araştırıldı. Parasetamol grubundaki tavşanlara 500mg/kg vücut ağırlığı oranında intraperitoneal yolla Parasetamol verildi ve uygulamadan 4 saat sonra kesim işlemi yapıldı. Karaciğer dokusundan alınan parçalardan toplam RNA saflaştırıldı ve PoliT primeri kullanılarak ters transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA elde edildi. Polimeraz Zincir Reaksiyonları ile CuZnSOD, GSH-Px, CAT ve kontrol amaçlı GAPDH için spesifik primerler kullanılarak istenilen büyüklükte DNA ürünleri elde edildi. Agaroz jelinde koşturulan enzim RT-PZR bantlarının GAPDH RT-PZR bandına oranları karşılaştırılarak semikantitatif mRNA analizleri yapıldı. Bu analiz sonucunda parasetamol uygulamasının CuZnSOD, GSH-Px, CAT mRNA seviyelerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görüldü.

Anahtar kelimeler ; RT-PZR, mRNA, serbest radikaller, CuZnSOD, GSH-Px, CAT ve GAPDH.

ABSTRACT

Paracetamol is a drug that is used for its analgesic and antipyretic properties. It is metabolized in liver and kidneys. As other drugs, Paracetamol increases the amount of free radicals in the body during metabolism. The body developed several antioxidant defense systems to combat these radicals. Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase are the most important of these enzymes.

In this thesis, the effects of Paracetamol on rabbit liver was studied. Paracetamol was injected intraperitoneally as 500 mg/kg body weight to paracetamol group animals and they were killed 4 hrs later. Total RNA were isolated from liver samples and cDNA was made with PolyT primer in reverse transcription reaction. Desired lengths of DNA from Polymerase Chain Reactions were obtained by using specific primers for CuZnSOD, GSH-Px, CAT and GAPDH control. Enzyme RT-PCR bands from agarose gels were analyzed semiquantitatively by comparing them with GAPDH RT-PCR bands. As a result, it was observed that mRNA levels of CuZnSOD, GSH-Px, CAT was not influenced from Paracetamol application.

Keywords: RT-PCR, mRNA, free radicals, CuZnSOD, GSH-Px, CAT and GAPDH.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Fenol-Kloroform protokolüne göre saflaştırılmış tavşan karaciğeri toplam RNA'ların RNA jelindeki görüntüsü	32
Şekil 2. Quiagen-RNA İzolasyon kitinden elde edilen tavşan karaciğeri toplam RNA'ların DNA jelindeki görüntüsü	32
Şekil 3. Fenol-Kloroform protokolüne göre saflaştırılmış tavşan karaciğeri toplam RNA'ların DNA jelindeki görüntüsü	33
Şekil 4. Tavşan karaciğeri toplam RNA'larının DNA jelindeki görüntüsü	33
Şekil 5. Enzimler ve GAPDH için büyüklüklerin RT-PZR ile belirlenmesi	34
Şekil 6. Enzim mRNA'larının farklı RT-PZR döngülerindeki doğrusal bölgenin belirlenmesi ve kontrol ile karşılaştırılması	35
Şekil 7. Parasetamol uygulaması sonucu CuZn-SOD, GSH-Px ve CAT mRNA seviyelerindeki değişikliklerin semikantitatif olarak belirlenmesi	36

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Primer Dizilimleri.....	31
-----------------------------------------	----

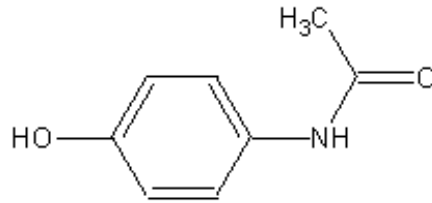
KISALTMALAR DİZİNİ

ROT	Reaktif Oksijen Türleri
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
O₂⁻	Süperoksit Anyonu
OH	Hidroksil Radikali
¹O₂	Singlet (Tekil) Oksijen
SOD	Süperoksit Dismutaz
CAT	Katalaz
GSH-Rx	Glutasyon Peroksidaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
MPO	Miyeloperoksidaz
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
XO	Ksantin Oksidaz
XOR	Ksantin Oksido Redüktaz
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
cDNA	Eşlenik DNA
RT-PZR	Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1-GİRİŞ

Bu çalışma Parasetamol isimli ilacın karaciğer üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmanın moleküler biyoloji ayağını oluşturan kısmıdır. Çalışmanın diğer kısımlarında 6 kontrol ve 6 uygulama grubundaki tavşanlara Parasetamol verilmiş ve parasetamolün karaciğerde oluşturduğu hasarın incelenmesi amaçlanmıştır. Dokulardan kesitler alınarak histopatolojik ve immuno-histokimyasal değerlendirmeler yapılacaktır. Hasar oluşumu başlangıcındaki serbest radikaller ve antioksidanlar ve ilgili moleküller ve enzim sistemleri ayrıca incelenecektir. Bu amaçla Malondialdehit, Glutasyon, toplam Nitrit seviyeleri belirlenecek ayrıca Superoksit Dismutaz, Glutasyon Peroksidaz ve Katalaz enzimlerinin seviyeleri saptanacaktır. Bu tezin amacı ise Parasetamol uygulaması sonucu tavşanların karaciğerindeki Superoksit Dismutaz, Glutasyon Peroksidaz ve Katalaz enzimlerinin mRNA seviyelerindeki değişikliklerin semikantitatif RT-PCR metoduyla ölçülmesidir. Böylece akut böbrek hasarının mekanizması moleküler seviyedeki incelenecektir.

1.1- Parasetamol



Parasetamol'ün (*Asetilaminofenol*) kimyasal yapısı

Kimyasal formülü $C_8H_9NO_2$ olan Parasetamol'ün moleküler ağırlığı 151,17 g/mol, yoğunluğu 1.263 g/cm^3 ve erime noktası $169 \text{ }^\circ\text{C}$ 'dir. Parasetamol

karaciğerde metabolize olur yarılanma ömrü 4 saattir. Vücuttan idrar yoluyla atılır [1].

Parasetamol (Asetaminofen) ağrı kesici ve ateş düşürücü etkiye sahip bir ilaç etken maddesidir. Parasetamol ağızdan alındığında gastrointestinal sistemde hızla emilir. İlaç alındıktan 30-60 dakika sonra maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır. Parasetamol bütün dokulara hızla dağılır. Plazma proteinlerine bağlanması zayıftır. Plazma yarı ömrü 1-4 saattir. İdrarla parasetamolün %1-3' ü değişmemiş olarak atılır ve % 80 i ise biyolojik olarak glukuronid veya sülfat bileşikleri olarak atılır [1]. Analjezik etkisi yeni nesil analjeziklere göre hafif kalsa da gastrointestinal sisteme yan etkisinin hemen hemen hiç olmaması, güvenilirliği ve gebelerde kullanılabilir olması her zaman ön planda olmasına neden olmuştur [1].

1.1-1. Kullanım Alanları

Baş ağrısı, migren, adet sancıları, diş ağrısı, soğuk algınlığı ve gribal enfeksiyonlara bağlı ağrı, nevrojji, nevrit, siyatik, lumbago, kas ve eklem ağrıları, orta kulak ağrıları, sinüzit ve cerrahi operasyonlara veya yaralanmalara bağlı ağrılar ile adet zorluklarından kaynaklanan ağrılarda endikedir. Asetilsalisilik asite duyarlılığı olan hastalarda alternatif ilaç olarak kullanılır [1].

1.1.2- Kullanımı Zararlı Alanlar

İleri derecede böbrek ve karaciğer rahatsızlığı olan hastalarda kullanılmamalıdır. Parasetamole aşırı duyarlılığı olanlarda ve daha önce anemisi olanlarda kullanılması sakıncalıdır.

1.1.3- Uyarılar

Parasetamolün insanlar için 20 gramdan fazla alınmasında fatal risk vardır. Aktif alkolizm, viral hepatit, karaciğer hastalığı ve ağır böbrek fonksiyon bozukluğu olanlarda dikkatle kullanılmalıdır. Kronik alkoliklerde terapötik dozları takiben hepatotoksisite ve karaciğer yetmezliği gelişir. Kronik alkol bağımlılarında güvenli doz saptanamadığından, günde 2 g veya daha düşük dozlar önerilir. Alışılmış terapötik dozlarda kısa süreli olmak şartıyla gebeliğin tüm dönemlerinde kullanılabilir. Yüksek dozlarda devamlı kullanımı annede anemiye, yeni doğan bebekteyse fatal böbrek hastalığına neden olabilir. Ama bunun dışında gebelerde güvenle kullanılabilir [1].

1.2- Karaciğer

Karaciğer, diyaframın hemen altında, sağ tarafta, yaklaşık olarak 2 kilogram ağırlığında koyu kırmızı renkte yumuşak bir organdır [2]. Vücudumuzun gerçek kimya laboratuvarı olan karaciğer iri bir bezdir; içinde 800-900 gram kadar kan bulunur; lob adı verilen sayısız küçük parçacıktan oluşur. Yeri, üst karın bölgesinde ve midenin önündedir.

Karaciğerin görevleri çeşitli olduğu kadar önemlidir de. Hücrelerin enerji kaynağı olan şekeri yapar; yağların özümlemesi ve dolayısıyla sindirim için vazgeçilmez bir madde olan ödü (safra) salgılar; birçok artığın vücuttan atılmasını ve vücudun zehirlerden arıtılmasını sağlar, alkolü süzer ve kanı pıhtılaştıracak maddeleri yapar. Ayrıca birçok ilaç, ancak karaciğerde değişikliğe uğradıktan sonra organizma tarafından kullanılabilir.

Görevinin karmaşıklığı nedeniyle karaciğer nispeten nazik bir organdır; birçok hastalığa tutulabilir. En çok bilineni sarılıktır; derinin sarı bir renk almasıyla beliren bu hastalık safranın iyi boşaltılmamasından ileri gelir. Karaciğerin en tehlikeli hastalıklarından biri alkol sirozudur: bu hastalıkta karaciğer büyür ve görevlerini yerine getiremez [3].

1.3- Serbest Oksijen Radikalleri

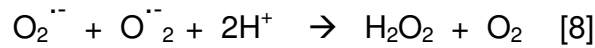
Elektronlar, atomlarının yörüngelerinde bulunurlar. Her bir yörünge en fazla iki elektron tutabilir. Bir serbest radikal basitçe, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran herhangi bir molekül olarak tanımlanabilir. Serbest radikallerin açık bir bağ veya yarıbağ içermeleri kendilerini kimyasal olarak reaktif kılar. Serbest radikallere örnek olarak merkezinde oksijen bulunan süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), kükürt bulunan tiyil (RS^{\cdot}), karbon bulunan triklorometil (CCl_3) ve çiftsiz elektronun her iki atom arasında delokalize olduğu nitrik oksit ($\cdot NO$) verilebilir. Formül içerisindeki noktalar bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronun bulunduğunu göstermektedir. *in vivo* olarak bulunan moleküllerin çoğu radikal olmayıp, eşleşmiş elektronlar içerir [4]. Serbest oksijen radikalleri, oksijenin belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu oluşan çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli oksijen metabolitleri olan, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve singlet oksijenidir ($^1\Delta_g$) [5]. Oksijenin dış moleküler yörüngesine bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronların eklenmesi yaygın şekilde bulunan bu molekülü güçlü bir toksine, bir serbest oksijen radikaline dönüştürür [6]. Metabolik elektronların normal sıralanımında, oksijen toplam dört elektron kabul edebilir. Oksijene bir elektron eklenmesi süperoksit anyonu, iki elektron eklenmesi hidrojen peroksit, üç elektron eklenmesi hidroksil radikali ve dört elektron eklenmesi su oluşumuna neden olur [7].

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

Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar paylaşılmadığında, ayrı ayrı orbitallerde bulduklarında ve spinleri

aynı yönde olduğu zaman en düşük enerji seviyesindedirler. Bu dış orbitallerden her biri birer elektron daha kabul edebilir. Bu orbitallerin tek elektron alması ile süperoksit anyonu (Süperoksit radikali, O_2^-), iki elektron alması ile de peroksit anyonu (O_2^{2-}) oluşur [8].

Süperoksit radikali bir oksitleyici gibi davranarak bir elektron daha alabilir, böylece oluşan peroksi anyonu ortamdan iki proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilir. Veya süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir ve böylece bir indirgeyici (redüktör) olarak davranabilir. Ya da iki süperoksit radikali birbiri ile etkileşerek biri oksitlenirken diğeri ise indirgenir ve böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelir:

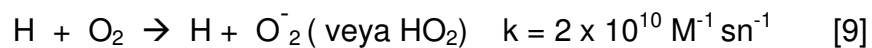


Süperoksit radikallerinin ortamdan temizlendiği bu tepkimeye **dismutasyon tepkimesi** denir.

Canlılarda süperoksit radikallerinin oluşumuna neden olan olay ve etkileri iki grupta toplamak mümkündür.

1-) Çevresel etkiler: Çeşitli kimyasal bileşikler ve fiziksel etkenler canlılarda süperoksit radikali oluşumuna neden olurlar. Bazı koşullarda görünür bölge ışınları da dahil olmak üzere, özellikle bütün yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar (ışınlar) her oksijenli ortamda süperoksit radikalleri oluştururlar. Yüksek enerjili ışıklardan özellikle beta, gama ve X ışınları süperoksit radikali yanı sıra, doğrudan diğer radikallerin oluşumunu da sağlarlar. Böyle bir dalga sulu ortamdan geçince suyun radyolitik parçalanmasına neden olur [9].

Sulu ortam oksijen içeriyorsa, aşağıdaki tepkimelerle süperoksit radikali kolaylıkla oluşur.



Organik moleküllerin bulunduğu sulu oksijenli ortamda radikal oluşumu iki kat daha artar [9].

2-) Canlı organizmalar radikal oluşumuna neden olan çevre koşullarından tümüyle izole edilseler bile eğer moleküler oksijeni metabolize ediyorsa organizmadaki pek çok tepkimelerle O_2^- üretirler. Canlılarda süperoksit anyonu üreten başlıca tepkimeler şunlardır.

a-) Hidrokinonların, lökoflavinlerin ve katekolaminlerin, tiollerin, indirgenmiş boyaların, tetrahidropteridin, ferrodoksin ve hemoproteinlerin otooksidasyonu tepkimelerinde süperoksit radikali üretebilirler [10].

b-) Çeşitli enzimatik tepkimelerde süperoksit radikali oluşur. Bu enzimlere ksantin oksidaz, dihidroorotat dehidrogenaz [11] ve bir grup flavo protein dehidrogenazlar örnek verilebilir [10].

c-) Bazı oksidaz ve hidroksilaz enzimleri de katalitik etkileri sırasında ara ürün olarak süperoksit radikali üretirler. Bunlara mikrozomal hidroksilazlar, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz örnek verilebilir [12, 13].

d-) Canlılarda süperoksit radikallerinin üretildiği bölgelerin başında mitokondri gelir. Moleküller oksijenin en önemli kullanım yeri, mitokondrilerin iç zarındaki elektron transport sistemi olduğundan burada radikal üretiminin olması beklenen bir sonuçtur. Mitokondrideki oksijen üretiminin çok büyük bir kısmından elektron transport sistemi sorumludur. Bu sistemdeki son elektron alıcısı oksijendir. Mitokondri elektron transport sisteminde O_2 üreten iki bölgenin bulunduğu gösterilmiştir. Bunlardan birincisi flavo protein olan NADH dehidrogenazdır ve mitokondri zarında üretilen süperoksit radikallerinin üçte biri bu bölgeden kaynaklanır [14]. İkinci bölge ise koenzim Q-sitokrom b bölgesi olup, ubikinonun otooksidasyonu ile elektron transport sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin üçte ikisini oluşturur. Elektron transport sisteminde kullanılan oksijenin %1-5'i süperoksit oluşumu ile sonuçlanır [15,16].

e-) Önemli ölçüde süperoksit radikalleri fagositoz sırasında fagositoz yapan hücreler tarafından (nötrofil, eozinofil ve makrofajlar) enzimatik olarak üretilirler [10].

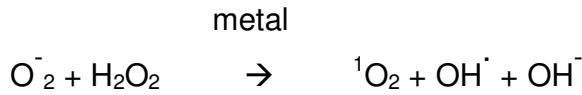
1.3.2. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$) Radikali

Moleküller oksijenin iki dış orbitalindeki paralel salınmakta olan iki elektrondan birinde salınım sınırlamalarının kalkması sonucu, moleküler oksijenin iki elektronu ayrı ayrı veya aynı orbitali işgal edebilirler. Oksijenin uyarılmış bu iki formuna **singlet oksijen** ($^1\text{O}_2$) denir [10,17]. Singlet oksijenin her iki formu da aldığı enerjiyi ışık enerjisi halinde vererek eski durumlarına dönebilirler [18].

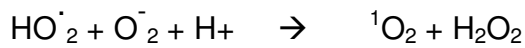
Singlet oksijenin oluşumuna neden olan mekanizmalar şunlardır.

a-) Dioksijen üzerinde pigment aracılı ışık etkisi ile,

b-) Fe katalizli Haber –Weiss tepkimesi ile,

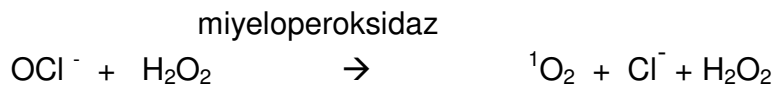


c-) Süperoksit radikali üretilen ortamda kendiliğinden dismutasyon ile,



d-) Süperoksit radikallerinin diaçilperoksitlerle tepkimesinde

e-) Fagositoz yapan hücrelerde fagositoz sırasında H_2O_2 ve halojen bağımlı myeloperoksidaz enzimi ile



f-) O_2^- ve OH^- ile etkileşimi sonucunda,



Karotenler, bilirubin, histidin, metiyonin ve bazı kimyasal bileşikler singlet oksijeni temizleyerek, singlet oksijen bağımlı tepkimeleri inhibe ederler. Bu inhibitör bileşikler olay sırasında oksitlenmezler ve tüketilmezler [10].

1.3.3. Hidroksil Radikali (OH⁻)

O₂⁻'in H₂O₂ ile etkileşerek OH⁻ ürettiğine delil olarak kabul edilen bazı bulgular şunlardır.

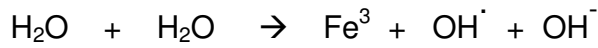
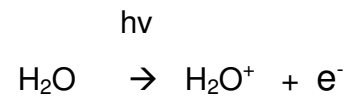
a-) Ksantin–ksantin oksidaz sistemine SOD eklendiğinde, methionalinin etilene çevrilmesi inhibe olur.

b-) Benzoat, mannitol ve etanol gibi OH⁻ ile tepkimesi sonucu bu radikali temizleyen bileşikler de aynı tepkimeyi inhibe eder.

c-) Aynı tepkime ortamında H₂O₂ eklendiğinde, methionalden etilen yapımı hızlanmaktadır [10, 20,21].

in vivo'da hidroksil radikali yapımına neden olabilen önemli tepkimeler şunlardır.

1-) İyonlaştırıcı radyasyonun suya etkisi



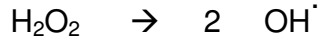
2-) Fenton tepkimesi ile,



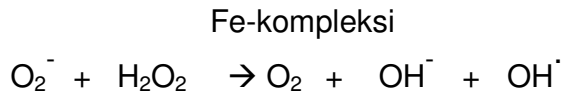
Fenton tepkimesi belirli bir liganta bağlı demir aracılığı ile olur.

3-) Ozona elektron transferleri ile OH[·] oluşabilir. Bu nedenle ozon toksisitesinde OH[·] nin rolü vardır.

4-) Hidrojen peroksidin fotolizisi ile



5-) *in vivo*'da OH[·] üretimi bakımından en önemli tepkime **Haber-Weiss tepkimesi**dir. *in vivo*'da O₂⁻ radikalinin H₂O₂ ile OH[·] üretilmesi, şelat yapmış demir tarafından katalizlenir:



Şelat yapmış demir gereksinimi bakımından bu tepkime Fenton tepkimesine benzer [10, 22].

6-) Radikal tepkimeleri ile oluşabilen bir organik radikal , H₂O₂ ile tepkimeye girerek OH[·] üretebilir [22].

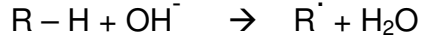
Oksijen radikalleri içinde en reaktif olanı, bu nedenle en toksik etkili olanı hidroksil radikalidir. OH[·] üretildiği yerde hemen her molekül ile tepkimeye girebilir ve radikal tepkimelerini başlatabilir. Hidroksil radikali ise aşırı reaktif ve kısa ömürlü olup, ekstrasellüler alana geçemez [23].

Hidroksil radikalinin katıldığı başlıca tepkimeler beş grupta toplanabilir [10, 24, 25, 26, 27, 28]

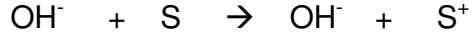
a-) OH[·] eklenme reaksiyonları;



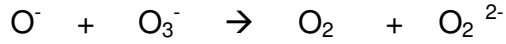
b-) Hidrojen çıkarma reaksiyonları;



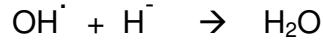
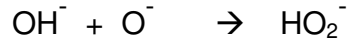
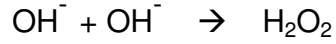
c-) Elektron nakil reaksiyonları;



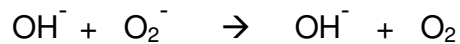
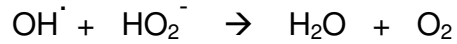
d-) Atom ve yük nakli reaksiyonları;



e-) i) Radikal- Radikal reaksiyonları ;



ii) Dismutasyon reaksiyonları;



1.3.4. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Radikali

Hidrojen peroksit, moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron, süperoksitin ise bir elektron alması ile oluşmaktadır. Hidrojen peroksit uzun ömürlü bir oksidandır. Hidrojen peroksit serbest bir radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri arasına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynamaktadır. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve en zarar

verici oksijen radikali olan hidroksil radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir [29].

Bazı oksidaz enzimleri doğrudan hidrojen peroksit üreir. Örnek olarak 2-hidroksiasit oksidaz, urat oksidaz, glukoz oksidaz enzimleri verilebilir [19]. Sitotoksik oksijen radikallerinin diğer bir grubu da organik peroksitler (ROOH, R= Lipit) ve alkoksil radikali ile (LO[•]) peroksil radikalidir (LOO[•]). Toksik hidroperoksitler okside gluytasyon reduktaz GSSG / GSH peroksidaz sistemi ile memeli hücrelerinde katabolize edilirler [30].

1.4. Oksidan Sistemlere Karşı Oluşturulan Antioksidan Sistemler

Hücrelerde ve ekstraselüler sıvıda sitotoksik oksijen radikallerini zararsız duruma getirmeye çalışan antioksidan savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalardan bazıları şunlardır:

1) Reaktif oksijen radikallerini daha az toksik ürünlere dönüştüren anti oksidan enzim sistemleri: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon redoks siklusu enzimleri (glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz vb. gibi). Süperoksid dismutaz, süperoksid anyonunu enzimatik olarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürür [31]. Hidrojen peroksid ise iki önemli intraselüler enzim olan katalaz ve glutatyon peroksidaz ile su ve oksijene indirgenir [5, 32, 33]

2) Radikalleri yakalayıp nötralize eden antioksidan maddeler: Alfa-tokoferol (E vitamini) ve Askorbik Asit (C vitamini) anti oksidanlar olarak fonksiyon gösterirler. E vitamini hücre membranında lipid peroksidasyonunu önler. Askorbik asit ise sitoplazmada ve ekstraselüler sıvılarda antioksidan etkinlik

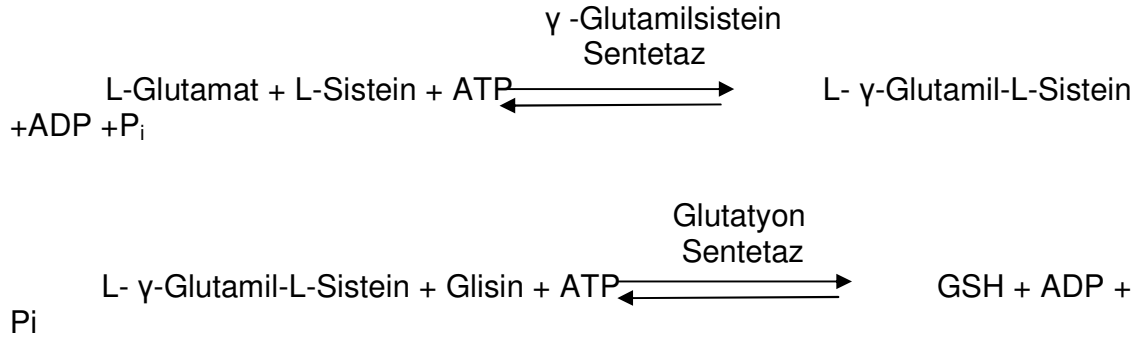
gösterir ve antiproteazların oksidanlarla inaktivasyonunu engeller. Bu gruptaki diğer maddeler, indirgenmiş glutation (GSH), ürik asit, beta-karoten (provitamin A), taurin ve yüksek molekül ağırlıklı anti oksidanlar olan mukus ve albumindir [5, 34, 35].

3) Reaktif oksijen radikallerinin oluşmasını önleyen ve oluşanın yayılmasını engelleyen sistemler: Bunlar H₂O₂ ve süperoksit anyonundan hidroksil radikali oluşmasını sağlayan Haber-Weiss reaksiyonunu katalizleyen demir ve bakır iyonlarını plazmada ve hücrede bağlayan bakır transport proteini serulopazmin ile ferritin, transferin laktoferrin ve mitokondrilerde doğal olarak oluşan serbest radikalleri suya indirgeyen mitokondriyel sitokrom oksidazdır [5].

1.4.1 Glutatyon (GSH)

Bütün hücreler oksidan maddelere karşı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan maddelerden oluşan bir mekanizmaya sahiptir. Enzimatik olmayan maddelerden en önemlisi GSH'tır. GSH, iç ve dış kaynaklı toksik kimyasallara karşı hücrel savunma sisteminde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca GSH, GSH-Px gibi çeşitli enzimler için bir koenzimdir. Bir hücrede, okside glutatyon miktarının artmış olması, oksidasyonun muhtemel bir indeksi olarak kabul edilmektedir [36]. GSH, özellikle dış toksinlere şiddetli şekilde maruz kalan karaciğer gibi organlarda önemlidir. Karaciğer, GSH sentezinin yapıldığı başlıca organdır [37,38]. GSH, karaciğer hücrelerinin sitoplazmasında sentez edilir. Buradan dolaşım/taşıma sistemi ile diğer organ ve dokulara dağılır. Karaciğerdeki yüksek GSH seviyesi, hücrelerin sigortası görevi yapar. GSH seviyesinin az olması hücrelerin serbest radikal hasarına karşı hassasiyetini arttırmaktadır [39, 40].

Tripeptit tiyol olan glutatyon metabolizma, taşıma oksijen ve diğer bileşiklerin toksik etkilerine karşı hücrelerin korunmasında önemli bir fonksiyona sahiptir. GSH, γ -Glutamilsisteinsentataz ve Glutatyon Sentetaz'ın etkileşimleri ile hücre içinde sentez edilmektedir. Hücrelerde GSH sentezi, şu şekilde olmaktadır.



GSH sentezinde 1. basamağı katalizleyen γ -Glutamilsistein Sentetaz'ın aktivitesi, GSH'ın feedback inhibisyonu yoluyla kontrol edilmektedir [41, 42].

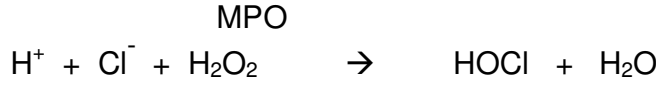
GSH'ın hücre içi seviyesinin herhangi bir şekilde azalması, lipid peroksidasyonuna veya diğer hücrel hasarlara da yol açabilmektedir.

Endojen GSH, proteinlerdeki tiyol gruplarını oksidasyondan korur, Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ile direkt reaksiyona girerek onları detoksifiye eder. GSH, DNA ve protein sentezi, enzim aktivitesinin düzenlenmesi gibi diğer hücrel işlevlerde de koruyucu rol alır. Radikal türlerinin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile GSH, GSSG'ye dönüşür. GSSG ise tekrar Glutasyon Redüktaz (GR) ile NADPH varlığında GSH'a rejenere edilir [43]. Bu şekilde önemli bir rolü olan GSH'ın organizmada yokluğu çeşitli patolojileri de beraberinde getirmektedir [44].

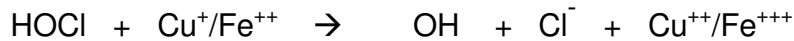
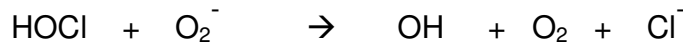
1.4.2. Miyeloperoksidaz (MPO)

Miyeloperoksidaz (MPO), memeli nötrofillerin euzonofilik granüllerinde bulunan bir enzimdir, ayrıca bu enzim insan monositlerinde de bulunmuştur. Bu hücreler tarafından fagositoza uğrayan bakteriler, bu enzimin etkisiyle yok edilmektedir [45]. Bu enzim fagozom içerisine bırakılır. Fagositoz solunum patlamasıyla devam eder ve çok daha fazla oksijen tüketilerek oksidatif patlama meydana gelir. Bu olayların sonucunda H_2O_2 , OH^- ve HOCl 'e dönüştürülerek antibakteriyel aktivite meydana getirilir [46].

Fagositoz, oksijenin toksik ürünlerinin önemli ölçüde katkıda bulunduğu bir olaydır. Bu mekanizmada kullanılan oksijenin tamamı, NADPH oksidaz tarafından enzimatik olarak O_2^- radikaline ve daha sonra O_2^- radikali ise SOD tarafından H_2O_2 'ye dönüştürülür. Fagozomda O_2^- ve H_2O_2 birikimi yalnız başına fagositik fonksiyon için yetersizdir. H_2O_2 , peroksidazlar tarafından kullanıldığı zaman fagositoza katkıda bulunur. Peroksidazlar, H_2O_2 ve bir halojen ile birleştikleri zaman mikroorganizma ve tümörlere karşı vücudun en önemli hücrel savunma sistemlerinden birini oluştururlar. Bu amaçla nötrofil ve monositler MPO içerirler. Bu peroksidazlar fagositik lokositlerin sitoplazmalarında granüller halinde depolanırlar ve fagositoz sırasında fagozom içine boşaltılırlar. Peroksidazlar, H_2O_2 ile birlikte halojenleri aktive ederek toksik ara ürünlere çevirirler. Çoğunlukla toksik ara ürün HOCl' dir. H_2O_2 , bir halojenle birlikte (Cl^- , Br^- , I^-) nötrofil fagozomlarında bulunan bir enzim olan MPO tarafından HOCl' ye çevrilir [47].



Fagositler aktive olduğunda, bakterileri öldürmek için yeterli miktarda ROT üretirler. İleri metabolizma gereği H_2O_2 , MPO tarafından HOCl' ye ve Fe^{++} varlığında ise OH^- radikaline dönüşür. HOCl'de ileri reaksiyonlarla OH^- 'e dönüşebilir. Bu reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.



MPO aktivitesi özellikle doku hasarlanmasının olduğu yerlerde çok yüksek seviyelere ulaşır. Örneğin aterosklerotik lezyonlarda çok yüksek MPO aktivitesinin olduğu bildirilmiştir [48, 49].

1.4.3. Ksantin Oksidaz (XO)

Ksantin Oksidoredüktaz (XOR), son ürün olarak ürik asidin oluşturduğu pürin yıkılmasında son iki basamağını kataliz eder. Memelilerde enzim iki formda bulunmaktadır.

a) İlk formu Dehidrogenaz'dır (XDH: EC 1.1.1.204), elektron alıcısı olarak NAD'yi kullanır ve sonuçta herhangi bir serbest radikal oluşumu söz konusu değildir.

b) İkinci formu Ksantin Oksidaz'dır (XO: EC 1.1.3.22), elektron alıcısı olarak oksijeni kullanır, H_2O_2 ve O_2^- radikali gibi ROT oluşumuna neden olur [50,51].

XO ve XDH, molibdenyum hidroksilaz flavoprotein ailesinin birer üyeleridir. Aynı gen ürününün farklı formlarında bulunurlar. XDH ve XO'un başlıca katalizlediği ana reaksiyonlar hipoksantin'in ksantine, ksantininde ürik aside dönüşüm reaksiyonlarıdır. XO, bakterilerden insanlara kadar çok geniş canlı türlerinde ve bir çok dokuda bulunan bir enzimdir [52].

XOR aktivitesi memelilerde en fazla karaciğer ve ince bağırsakta lokalizedir. İnsan karaciğer ve bağırsağı, parankima hücrelerince zengin dokular olmaları sebebiyle diğer dokulardan daha fazla XOR aktivitesine sahiptir [53].

XO, birçok dokuda ROT'un başlıca kaynaklarından ve hücrel hasarın oluşumunda anahtar bir enzim olarak düşünülmektedir [54].

Doku reperfüzyonu sırasında oluşan O_2 , barsak, deri, iskelet kası, beyin, kalp, akciğer, böbrek ve karaciğeri içine alan çeşitli dokularda iskemi sonrası hasarın kritik bir parçası olarak işe karışmaktadır. XO inhibitörleri ve antioksidan enzimler, iskemi sonrası hasarın alanını önemli derecede sınırlarlar. XO kaynaklı radikaller, doku hasarlarında başlıca sorumlu olarak görülmektedirler [55].

1.5. Çalışmamızda Kullandığımız Antioksidan Sistemler

1.5.1. Cu-Zn SOD

Ökaryot hücrelerde sitazol, nükleer membran ve mitokontri intermembran boşluğunda, eritrositlerde bulunan dismutazdır [56, 57]. Prokaryotlarda çok az bulunmaktadır. Dimer yapıda olup, her birinin moleküler ağırlığı 156-165 kdalton civarında olan birbirine eş iki monomerik subüniteden meydana gelir. Her bir subünitede bir zincir içi disülfid bağı, bir asitlenmiş terminal amino grubu ile bir Cu ve bir Zn atomu içeren bir aktif bölge bulunmaktadır [58]. Cu-Zn SOD'lar polipeptid zincirlerinin amino asit kompozisyonuna bakıldığında temelde iki ortak özellik göstermektedir. Birincisi Tirozin ve Triptofan oranı çok düşüktür. İkinci olarak ise Glisin içeriği çok yüksektir. Yüksek glisin içeriği, polipeptit zincirinde araya giren keskin kıvrımlar sonucu, aşırı derecede beta plakalı tabakalı yapı oluşmasında etkindir. Cu^{+2} iyonu, SOD enzim aktivitesinin oluşması için şarttır. Zn^{+2} ise Cu^{+2} ile birlikte enzimin stabilitesinin sağlanmasında görevlidir. Cu^{+2} nin yerini alacak başka bir metal iyonu yoktur [59]. Eritrositlerde de bulunan enzim, membran lipitlerini peoksidasyondan ve hemolizden, hemoglobini ise methomoglobine oksidasyondan korur. Cu- Zn aktivitesi pH=5.5- 10 arasında stabildir.

1.5.2. Katalaz (CAT)

Hidrojen peroksidi, oksijen ve suya parçalayan bir enzimdir [25]. Katalaz metabolik olarak üretilen peroksitlerin elimine edilmesinde fonksiyoneldir. Katalaz bir çok aerobik organizmada bulunur ve eukaryot dokularının mitokondrilerinde yerleşmiştir [60]. Katalaz yapısında 4 adet "hem" grubu bulunan bir hemoproteindir. Peroksidaz aktivitesi dışında bu enzim, bir hidrojen perokside elektron verici substrat, diğer Hidrojen Peroksidi ise elektron alıcı olarak kullanılabilir. Bu enzim tüm hayvan ve bitkilerde ayrıca bazı bakterilerde bulunmaktadır. Katalaz enzimi, metil ve etil hidroperoksitler, formik asit, fenoller ile hidrojen peroksit gibi küçük moleküllere etkilidir [61]. Lipid hidroperoksitler gibi

büyük moleküllere etki etmezler. Enzim-hidrojen peroksit kompleksi oluşuktan sonra iki çeşit aktivitesi oluşmaktadır.

i) Katalitik aktivite;



ii) Peroksidatik aktivite;



Katalitik etki için iki hidrojen peroksit molekülü reaksiyona girmektedir, ancak peroksidatik etki için bir hidrojen peroksit molekülü reaksiyona girer. Enzimin bu iki aktiviteden hangisini gerçekleştireceğini bulunduğu hücrenin hidrojen peroksit üretim hızı belirler. Çünkü hidrojen peroksit üretim hızı dokulara ve hücrelere göre değişiklik göstermektedir [62]. Katalaz, sitokrom içeren tüm aerobik hücrelerde bulunur, ancak anaerobik hücrelerden sadece radyasyona dayanıklı olanlarda saptanmıştır [63].

Kalp kası ve düz kas hücrelerinde peroksizomlarda, iskelet kasında ise endoplazmik retikulumda Katalaz aktivitesi yüksektir. Eritrositlerde, sitoplazmada ve hücre membranında enzim aktivitesi saptanmıştır [56].

1.5.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir. Molekül ağırlığı 84 kdalton olup 4 Selenyum (Se) atomu içermektedir. Tetramerik yapıda olan enzim sitozolde bulunur.

Glutasyon Peroksidaz sitozol ve mitokondrial matrikste en yüksek aktiviteyi göstermektedir [56].

Fagositlerde bulunan GSH-Px diğer antioksidanlarla birlikte solunum patlaması sonucu oluşan serbest radikallerin oluşturduğu peroksidasyon hasarından hücreyi korur [56, 64, 65, 66].

1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)

PZR yöntemi, bir organizma veya bir mutant gene ilişkin sağlam veya parçalanmış DNA veya RNA parçasının *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem saç teli ve sperm gibi değişik dokulardan elde edilen 1-2 hücreden bile sonuca ulaşılmasını sağlar.

PZR yöntemi, bir gen veya DNA bölgesinin bu bölgeye bağlanan oligonükleotid primerler aracılığı ile bir dizi replikasyon döngüsü geçirerek çoğaltılması işlemidir. PZR yönteminde sözü edilen her replikasyon döngüsü; i) DNA'nın denatürasyonu, ii) Primerlerin bağlanması ve iii) Primerlerin uzaması, olmak üzere 3 aşamadan oluşur. Bu döngüler tekrarlanarak istenen sayıda hedef DNA bölgesi elde edilir. Her döngüde oluşan ürün bir öncekinin 2 katıdır. Böylece yaklaşık 20 döngülük bir reaksiyon sonucunda yaklaşık 1 milyon DNA kopyası elde edilir [67].

1.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarının Kullanım Alanları

- 1-) Hedef DNA'nın çoğaltılması
- 2-) DNA'daki mutasyonların belirlenmesi
- 3-) Dizi analizi için DNA'ların çoğaltılması
- 4-) Laboratuvar şartlarında kontrollü mutasyon oluşturulması

1.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonlarının Prensibi

PZR, nükleik asitlerin *in vitro* şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş, bir test tüp sistemidir. Hedef DNA/RNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna imkan verir [67,68,69]. *in vivo* şartlarda bölünen bir hücrede DNA'nın replikasyonu

çeşitli enzimler tarafından düzenlenen ve genomun kopyalanması ile sonuçlanan bir işlemdir.

Bir test tüpü içerisinde gerçekleştirilen PZR'da *in vivo* çoğalma örnek olarak alınmıştır. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, özel bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir. Kullanılan polimeraz enzimine bağlı olarak kopyalanarak çoğaltılacak olan bölgenin uzunluğu Taq DNA polimeraz için 2 kb'dan küçük, daha komplike enzim veya enzim karışımları ile 5 kb'dan daha büyük hatta 40-50 kb kadar olabilmektedir[67].

in vivo şartlarda DNA replikasyonu esnasında enzimler ilk olarak DNA'nın çift zincirli yapısını bozarak tek zincirli hale geçişini sağlar. Daha sonra RNA polimeraz sentezlenir ve replikasyon başlangıç bölgesinde tek zincirli hale dönüştürülmüş DNA zincirlerinden birisine tamamlayıcı RNA'nın oluşumu sağlanır. Bu DNA/RNA heterodupleksi DNA polimerazın saldırısı için bir başlatıcı bölge rolü oynar. Böylece DNA'nın tamamlayıcısı sentezlenir. PZR çalışmalarında reaksiyonun gerçekleşmesi için küçük miktarda hedef DNA (1-100 ng kadar) içeren örnek çalışma solüsyonu içerisine ilave edilir. Daha sonra örnekteki çift sarmal DNA'nın tek sarmal DNA'ya dönüştürülmesi sağlanır. Tek sarmal DNA iplikçiklerinin karşısı 20-30 baz çifti uzunluğundaki sentetik oligonükleotid diziler, RNA/DNA heterodubleksini oluşturmak üzere primer gibi kullanılır. Spesifik bir bölgenin amplifikasyonu için hedefi sınırlamak amacıyla ikinci primer kullanılır. Primerlerden birisi tek iplikçikli DNA zincirinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, ikincisi de diğer zincir üzerinde sonlandırıcı bölgeye bağlanır. Taq DNA polimeraz enziminin yardımıyla primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren her tek zincirli DNA zincirinin tamamlayıcısı oluşturulur. Böylece iki adet çift sarmal DNA oluşur. Oluşan çift sarmal DNA'lar yeni amplifikasyon için kalıp görevini üstlenirler. Bu işlem 30 siklus tekrarlandığında birkaç saat içerisinde, hedefin milyarlarca kopyası elde edilebilir. PZR temel olarak tekrarlayan üç basamaklı bir yöntemdir [62]. Bu basamaklar sırasıyla denaturasyon, bağlanma ve uzamadır.

1.6.2.1. Denaturasyon

Çift iplikçikli DNA'nın birkaç saniye 94-96 °C ısı ile tek iplikli DNA'ya ayrılmasıdır. Bazı çalışmalarda, amplifikasyon siklusları başlamadan önce 3-5 dakikalık bir ön denatürasyon işleminin, özellikle denatürasyonu zor olan kalıp DNA'lar için yararlı olduğu bildirilmiştir [68].

1.6.2.2. Bağlanma

Örnek, birkaç dakika 30-60 °C de tutularak, primerin (spesifik sentetik oligonükleotidler) tek iplikçikli DNA'daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlanır. Bu hidrojen bağlarının yardımı ile olur. Bağlanma ısı sadece DNA/DNA eşleşmesine imkan sağlayacak kadar yüksek olmalıdır. Primerlerin yapısı erime derecelerine göre hesaplanarak optimize edilebilirse de, yaklaşık olarak 20 baz çifti uzunluğa sahip primerlerin kullanılması halinde 54 °C olarak belirlenmesi optimal sonuçları vermektedir [67].

1.6.2.3. Uzama

Polimeraz enzimi yardımı ile tek iplikçikli DNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5' → 3' yönde uzamasıdır.

DNA zincirinin tamamlayıcısını sentezlemesi için 65-72 °C derece birkaç dakika beklenir. Taq DNA polimerazı optimal uzama ısısında yani 72-78 °C arasında 2000 nükleotid/dakika hızında çalışır. Ancak tüm sikluslarda enzimin aynı performansı göstermesi beklenemez. Başlangıç sikluslarında, dakikada bir kb uzunluğunda uzama beklenirken, siklus sonlarına doğru uzama hızı bir miktar azalır.

Ayrıca özellikle multipleks PZR yapıyorsa yani aynı anda birden fazla hedef bölgenin uzatılması söz konusu ise, o zaman enzimin tutunması ile nükleotidleri bularak bağlanması için daha uzun süreye ihtiyaç duyulacaktır. Bu süre iki dakika kadar olabilir. Ancak ısının 72 °C olması küçük uzunluktaki ürünlerde denatürasyon problemi yaratacağı için kalıp noksanlığına bağlı olarak

azalmaya ve özgül olmayan ürünlerin açığa çıkmasına neden olacaktır. Bu nedenle ısı 65 °C altında tutulmalıdır.

Bağlanma sikluslarını takiben, orijinal DNA segmenti yeni tamamlayıcı DNA'lar ve yeni kalıp DNA'lar oluşturur. Böylece her PZR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkmaktadır.

Amlifikasyondan sonra PZR ürünleri genellikle agoroz jel üzerindeki kuyucuklara yüklenir ve daha sonra elektroforeze tabi tutulur. PZR çalışmalarında klasik agorozun yanı sıra Nu-Sieve agar da kullanılmaktadır. Bu son agar kısa sürede özellikle küçük amlifikasyonların gösterilmesinde, klasik agorozdan daha başarılı bulunmuştur. Bu agarın daha saydam olması, jelde boyanmış bantların daha net görülmesini sağlamaktadır [67].

1.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Bileşenleri

PZR'nın temel bileşenleri kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tamponlar ve MgCl₂'dür [70].

1.6.3.1. Kalıp DNA

PZR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA genom kitaplıkları halinde, ya araştırma laboratuvarları ve kliniklerden ya da ticari olarak elde edilebilir.

PZR'de kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA'da kullanılabilir. Kalıp olarak RNA kullanılacaksa total RNA ya da poli(A) RNA'dan önce klasik yolla cDNA elde edilir, ya da *Thermus thermophilus* kaynaklı rekombinant TthDNA polimeraz enzimi kullanımı ile aynı tüpte RNA'dan DNA ürününün elde edilmesi tek kademeli olarak yapılabilir. Eğer yüksek molekül ağırlıklı genomik DNA kalıp olarak kullanılacaksa, DNA kısmi kesim yapan NotI ya da SfiI gibi restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra kullanılmalıdır. Genellikle kalıp DNA'da hedef dizinin konsantrasyonu bilinmediğinden, PZR'nin pozitif

kontrol DNA ile optimizasyonu faydalıdır. Optimizasyon çalışmalarında normalde kullanılmış bir DNA parçası için nanogram, genomik DNA için ise mikrogram düzeyindeki miktarlar kullanılır [70].

1.6.3.2. Polimerazlar

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozit trifosfattan uzun polinükleotit zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına primerlere gerek duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmaları ile, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır [70].

Termostabil (sıcaklığa dayanıklı) DNA polimeraz enziminin PZR de kullanılmaya başlanması araştırma ve klinik laboratuvarlarında rutin olarak yapılan deneylere teknolojik olarak büyük bir avantaj sağlamıştır. Önceleri kullanılan *Escherichia coli*'nin DNA polimeraz I enziminin klenow fragmenti sıcaklığa dayanıklı olmadığı için her PZR döngüsünde denatürasyon aşamasından sonra yeniden enzim ekleme zorunluluğu duyulmaktaydı. Ancak günümüzde kullanılan termostabil DNA polimerazlarla bu sorun ortadan kalktığından enzimin amplifikasyonun başlangıcında tüplere konulması yeterli olmaktadır

Termostabil DNA polimerazlardan PZR'de en yaygın olarak kullanılan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimerazdır. Taq DNA polimerazın polimerizasyon oranı (nükleotit / saniye) enzim için en uygun sıcaklık olan 70-80 °C de 35-100 dür. Bu enzime kalıptan ayrılmaksızın kalıba ilave ettiği ortalama nükleotid sayısı da yüksektir. Taq DNA polimeraz Amplitaq zincirinin uzayan ucundan nükleotidleri uzaklaştıran 5'→ 3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Amplitaq , Taq DNA polimerazın *E.coli*'de klonlanmış ve modifiye edilmiş rekombinant formudur. Amlitaq'ın özellikleri Taq DNA

polimerazınki ile aynıdır, ama Amplitaq rekombinant olduğundan saflığı Taq DNA polimerazdan daha fazladır ve PZR'de tercih edilir. Ancak bakteriyal DNA'ların çoğaltılmasında Amplitaq yerine Taq DNA polimeraz kullanımı daha güvenlidir. Çünkü Amplitaq *E.Coli*'de klonlandığından bakteriye ait kontaminant DNA taşıyabilir. Bununla birlikte özellikle bakteri DNA'larının çoğaltılması amacı ile Perkin-Elmer Cetus firması düşük DNA içerikli özel bir Amplitaq, LD üretmiştir. Yine aynı firmanın ürettiği rekombinant Amplitaq'ın değiştirilmiş bir tipi olan Stoffel fragmenti 5'→3' ne eksonükleaz aktivitesi taşımaktadır; Taq ve Amplitaq'dan iki kat daha termostabil olup aynı zamanda magnezyum konsantrasyonunun daha geniş sınırlarında optimum aktivite gösterir; buna bağlı olarak PZR koşullarının optimizasyonu için zaman kaybını ortadan kaldırır. Stoffel fragmenti yüksek termostabilitesi nedeni ile yüksek denatürasyon sıcaklıklarının kullanılmasını gerektiren , özellikle G-C çiftleri bakımından zengin olan yada kompleks sekonder yapıya sahip olan kalıp DNA'ların çoğaltılması için tercih edilir. 5'→3' eksonükleaz aktivitesinin bulunmayışı plazmid DNA'sı gibi halkasal kalıpların çoğaltılmasının daha etkin bir şekilde gerçekleşmesi için önemlidir. Taq, Amplitaq ve Amplitaq Stoffel fragmenti DNA polimerazları PZR sonunda oluşan DNA ürününün 3' ucuna bir adenin nükleotidi eklerler. Eğer PCR ürünü klonlanacaksa bu tek baz fazlalığı dikkate alınmalıdır [70].

VentTM DNA polimerazı termofilik bir arke olan *Thermococcus litoralis*'den izole edilmiştir. VentTM DNA polimeraz geni *E.coli*'de klonlanmıştır. Eksonükleaz aktivitesi taşımayan Vent (exo⁻)TM ve yüksek termostabilite gösteren diğer bir tipi de (Deep VentTM) geliştirilmiştir. VentTM DNA polimerazın termostabilitesi Taq DNA polimerazdan daha fazladır ve 8-13 kilo baz çiftlik ürün oluşturma yeteneğindedir. VentTM DNA polimeraz hata düzeltme özelliği olan 3'→5' eksonükleaz aktivitesi göstermesi nedeniyle yanlış baz eşleşmelerinin oluşumunu engellediğinden Taq DNA polimerazdan 5-15 kat daha fazla doğrulukta oluşturur. VentTM DNA polimeraz küt uçlu fragmentleri %95'den fazla oluşturduğundan , PZR ürünlerinin doğrudan klonlanmalarını kolaylaştırır. Ancak bu enzimin 3'→5' eksonükleaz aktivitesi nedeniyle primerlerin yok edilmesi sorun

oluşturur. Bu sorunun ortadan kaldırılması için enzim reaksiyona en son eklenmeli ve 3'- fosforotioat içeren primerler kullanılmalıdır [70].

Pfu DNA polimeraz hipertermofilik bir arke olan *Pyrococcus furiosus*'dan izole edilmiştir. Enzim hem 5' → 3' hem de 3' → 5' eksonükleaz aktivitesine sahiptir. Pfu DNA polimerazın doğruluğu Taq DNA polimerazdan 12 kat daha fazladır. dNTP'lerin yokluğunda enzimin 3' → 5' eksonükleaz aktivitesi kalıp ve primerlerin yıkımı ile sonuçlanacağından enzim, reaksiyona VentTM polimeraz gibi en son eklenmelidir. Pfu DNA polimerazın genetik mühendisliği ile geliştirilmiş tipi olan Pfu DNA polimeraz (exo⁻)'nun spesifik aktivitesi Pfu DNA polimeraz'dan 10 kat daha fazla olmasına karşın, hata giderme yeteneği olan 3' → 5' eksonükleaz aktivitesi yoktur.

Thermus thermophilus'dan izole edilen beş DNA polimerazdan ikisi PZR'de kullanılır. Termostabil bir enzim olan ve genetik mühendisliği ile geliştirilmiş Tth DNA polimeraz 70 °C dolayında etkin bir şekilde ters transkriptaz aktivitesi gösterir.

UITmaTM DNA polimerazı *Thermotoga maritima* DNA polimerazının değiştirilmiş rekombinant tipidir. *T.maritima* (Tma) hipertermofilik bir bakteri olup, 90°C üstündeki sıcaklıklarda ürer. UITmaTM DNA polimeraz Amplitaq DNA polimerazdan çok daha yüksek bir termostabilite gösterir. Bu enzim 5' → 3' eksonükleaz aktivitesi göstermezken, 3' → 5' eksonükleaz hata düzeltme aktivitesine sahiptir. Bu aktivite, enzim, primer ve MgCl₂'ün bir arada bulunduğu PZR koşullarında primerin 3' ucunu istenmeyen şekilde değiştirebilir. Bu durum reaksiyon karışımına enzim eklenmesinden önce denatürasyon için ısıtma yapılarak ("Hot-start" tekniği) azaltılabilir. UITmaTM DNA polimerazı çoğaltılan DNA'da yüksek düzeyde doğruluk gerektiğinde kullanılmalıdır [70].

1.6.3.3. Primerler

Gen çoğaltılması dahil PZR'nin bir çok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere ihtiyaç vardır. Genel olarak kullanılan kalıp ve yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotid

uzunluğundadır. Oligonükleotid primerler, primer sentezi yapan laboratuarlardan ya da ticari olarak da elde edilebilirler. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır.

1.6.3.4. dNTP Karışımı

Optimal dNTP konsantrasyonu; (1) $MgCl_2$ konsantrasyonuna, (2) reaksiyon koşullarına, (3) primer konsantrasyonuna, (4) çoğaltılmış ürünün boyuna, (5) PCR döngüsü sayısına bağlıdır. Yapılacak PZR için en uygun dNTP konsantrasyonu deneysel olarak belirlenmelidir.

1.6.3.5. Tamponlar ve $MgCl_2$

PZR'da kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılan Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tampondur. Diğer enzimler içinde benzeri tamponlar bulunmakta ve bunlar çoğunlukla satın alınan enzimle birlikte 10x konsantrasyonda sağlanabilmektedir. $MgCl_2$ 'ün reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonu değişebilmekle beraber genellikle 0,5-5,0 mM'lık değerler arasında çalışılır. Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile çözülebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve çift iplikli DNA'nın T_m değerini (T_m Değeri: Çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalmasına yol açan sıcaklık derecesi) arttırmaya ve ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar. Bu nedenle $MgCl_2$ 'ün PCR'nin özgülüğü ve ürün verimi üzerinde çok etkisi vardır. Genellikle optimum $MgCl_2$ konsantrasyonu olarak 1,0-1,5 mM 'lik değerler tercih edilir. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonu, ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün birikimine yol açar. $MgCl_2$ içeren tamponlar kullanılıyorsa, ayrıca $MgCl_2$ kullanımına gerek yoktur. Eğer tampon $MgCl_2$ içermiyorsa, hazır olarak elde edilen 25mM konsantrasyondaki $MgCl_2$ solüsyonu ayrıca sulandırım yapmadan final konsantrasyonu 2,5 mM olacak şekilde uygun miktarda reaksiyon karışımına eklenir.

1.6.4. PZR'nin İşleyişi

Termostabil DNA polimerazları ve farklı sıcaklık derecelerini istenilen süreler için otomatik olarak ayarlayabilen PZR aletlerinin ("thermal cyclers") kullanıma sunulması, PZR'in verimi ve kullanımında önemli gelişmelere yol açmıştır. Verimli bir PCR için; (1) denatürasyon, (2) primerlerin bağlanması, (3) primerlerin uzaması, (4) döngü sayısı, (5) PZR makinesinin sıcaklık iniş ve çıkış süreleri önemlidir. Polimeraz zincir reaksiyonu mikrotüplerde gerçekleşir. Amaca göre farklı PZR tüpleri ve değişik sıcaklık dereceleri kullanılabilir [70].

Başlangıç denatürasyonu için genomik DNA gibi kompleks kalıpların denatüre olmasını sağlamak üzere yüksek sıcaklıklar (95-100 °C) kullanılır. Ancak PZR sırasında genellikle en etkin denatürasyon sıcaklığının 92-95 °C olduğu saptanmıştır. Denatürasyonu ardışık primerin bağlanması aşamasındaki Tm/bağlanma sıcaklığı oranının saptanması, PZR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle başarılı bir PZR için kullanılan çeşitli formüller arasında en sık kullanılanı şu şekildedir [70].

$$[(A+T\text{'lerin sayısı}) \times 2 \text{ } ^\circ\text{C} + (G+C\text{'lerin sayısı}) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C}]$$

Çoğu zaman bu formülle hesaplanan Tm değerinin 3-5 °C altındaki sıcaklıklar bağlanma sıcaklığı olarak seçilir ve daha sonra optimum sıcaklık değeri denenerek saptanır. Yukarıda verilen formül, boyu en fazla 20 nükleotid olan primerler için geçerlidir. 20 nükleotitten daha uzun olanlar için geliştirilmiş başka formüller kullanılır.

Primerlerin uzaması aşamasında genellikle Taq/Amplitaq DNA polimerazların polimerizasyon aktivitesi için çoğu zaman iki dakika yeterli olmakla birlikte, eğer uzun DNA parçası çoğaltılıyorsa süre arttırılır. PZR ürünü olan tüm moleküllerde reaksiyonun tamamlanmasını garanti altına almak için son döngünün uzama süresi çoğunlukla uzun (10-15 dakika) tutulur.

Toplam döngü sayısı 25-35 arasındadır. Döngü sayısının arttırılması halinde istenmeyen ürünler fazlalaşırken, istenilen ürünlerde herhangi bir artış

meydana gelmez. Bu yüzden 40'dan fazla döngüden oluşan PZR reaksiyonları genellikle başarılı sonuçlar vermez [70].

1.6.5. Geri Transkripsiyon PZR (RT-PZR)

RNA PZR olarak da adlandırılan RT-PZR iki aşamalı olup RNA'dan tamamlayıcı DNA sentezi (geri transkripsiyon) ve tamamlayıcı DNA'nın da standart PZR yoluyla çoğaltılması aşamalarını kapsar. RT-PZR tek aşamalı bir reaksiyonla da gerçekleştirilebilir. T.thermophilus(Tth) DNA polimerazı gibi bazı polimerazlar Mangan varlığında hem RNA hem de DNA kalıp ipliklerini kullanabildiğinden tüm işlem aynı tüpte tek aşamada yapılabilmektedir.

RT-PZR, mRNA veya viral RNA miktarlarının belirlenmesi ile RNA düzeyinde gen anlatımı çalışmalarında oldukça duyarlı bir yöntemdir. Aynı zamanda “Message amplification phenotyping-MAPPING-” olarak da bilinen bu yöntem az sayıdaki hücreden aynı anda fazla miktarda RNA'nın analizini de olası kılar. Ayrıca RNA PZR, hücresel bir RNA örneğindeki tüm mRNA'lardan PZR yoluyla cDNA kitaplıklarının oluşturulması için de yararlı bir yöntemdir. Böylece, çok az sayıdaki, hatta tek bir hücreden ya da çoğaltılamayan hücrelerden bile cDNA kitaplıklarının kurulması gerçekleştirilebilir.

cDNA sentezinde kullanılacak çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ters transkriptaz enzimleri vardır. Bunlara örnek olarak “avian myeloblastosis virus” (AMV) ve “Moloney murine leukemia virus” (MMLV) revers transkriptazları verilebilir [70,71].

2. MATERYAL VE METODLAR

2.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- 1- Biorad-MyCycler marka PZR cihazı
- 2- Denver Instrument marka terazi
- 3- Fine Pix S 5600 model dijital fotoğraf makinesi ve kırmızı filtre
- 4- Biorad marka elektroforez güç kaynağı
- 5- Jenco marka 6173 model pH metre
- 6- Hettich-zetrifugen marka micro 200 model masaüstü santrifüj cihazı
(14000 rpm)
- 7- Kika marka Ultra turrax T 25 model homejenizasyon cihazı.
- 8- Dahian Scientific marka Wise Clave model otoklav cihazı
- 9- Biohit marka hassas otomatik pipetler ve uçları
- 10- 100 ul , 500 ul, 1500 ul'lik ependorf tüpleri
- 11- Labart marka vorteks
- 12- Yellow line marka manyetik karıştırıcı

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1- EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$; FW: 372.24; Sigma no: E5134)
- 2- Tris Baz ($C_4H_{11}NO_3$; FW: 121.14 ; Sigma no: T6066-)
- 3- Borik asit (H_3BO_3 ; FW:61.83 ; Sigma no: B6768)
- 4- EtBr ($C_{21}H_{20}N_3.Br$; FW: 394.32; Sigma no: E8751)
- 5- Gliserol ($C_3H_8O_3$; FW: 92.09; Sigma no: G5516)
- 6- Bromofenol Blue ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$; FW: 669.96 Sigma no: B0126)
- 7- Agaroz (Sigma No: 5093)
- 8- Sodyum Sitrate tribasik dihidrat ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$; FW:294.1; Sigma
no: C8532)
- 9- Sodyum Asetat (CH_3COONa ; FW: 82.03; Sigma no: S3272)

- 10- Formaldehit (CH_2O ; FW; 30.03; Fluka. 476087-11)
- 11- Formamid (CH_3NO ; FW: 45.04; Fluka:47671)
- 12- Guanidin Tiyosiyanat ($\text{CH}_5\text{N}_3.\text{CHNS}$; FW:118.16; Sigma no: G9277)
- 13- Sodyum Hidroksit (NaOH ; FW:40.00; Sigma no: S8045)
- 14- Hidroklorik asit (HCl ; FW:36.46; Sigma no: H1758-1 l)
- 15- Konsantre Asetik Asit ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$; FW:60.05; Sigma no:A9967)
- 16- DEPC $\text{O}(\text{COOC}_2\text{H}_5)_2$; FW: 162.14; sigma no:D5758)
- 17- Beta-merkaptotanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$; FW: 78.13; Sigma no: M3148)
- 18- Sodyum Klorit (NaCl ; FW: 58.44; Sigma no: S3014)
- 19- Amonyum Sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; FW132.14; Sigma no: A4915)
- 20- Lityum Klorit (LiCl ; FW:42.39; Sigma no: L9650)
- 21- MOPS, ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$; FW:209.26; Sigma no: M1254)
- 22- Parasetamol (Atabay İlaç Fabrikası A.Ş.)
- 23- Serum (0,09 luk NaCl içeren çözelti, Pfizer ilaç)
- 24- Rompun (1 ml'de 23.32 mg ksilazin hidroklorür içerir, Bayer ilaç)
- 25- Ketalar 50 Mg 1 Flakon (ketamin HCl)
- 26- dNTP (Invitrogen)
- 27- Superscript (Invitrogen)
- 28- Primer (Operon veya Midland, Teksas, USA)
- 29- Taq polimeraz (Sigma)

2.3. Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

2.3.1. RNA Later Saklama Solüsyonunun Hazırlanışı

70 gr Amonyum Sülfat, 100ml DEPC ile işlenmiş su
25 mM Sodyum Sitrat (pH=5,2)
10 mM EDTA

2.3.2. RNA Denature Solüsyonu Hazırlanışı

4M Guanidin Tiyosiyonat

25 mM Sodyum Sitrat (pH=7)

%0,5 lik Sarkosil

%1 Beta-Merkaptoetanol (kullanmadan önce eklenir, 1 ay stabildir)

50 ml RNA Denature Solüsyonu Hazırlanışı

- 4M Guanidin Tiyosiyonat

Bunun için aşağıda hazırlanışı gösterilen 6M'lık Guanidin Tiyosiyonat çözeltisinden ne kadar alınacağı hesaplandı.

$$50 \text{ ml} \times 4 \text{ M} = 6 \text{ M} \times V_2$$

$$V_2 = 33,3 \text{ ml alındı}$$

- 25mM Sodyum Sitrat, pH=7.0

Bunun için daha önce hazırlanmış olan 1M Sodyum Sitrat çözeltisi kullanılır. 1M Sodyum Sitrat çözeltisinden ne kadar alınacağı hesaplandı

$$25 \text{ mM} \times 50 \text{ ml} = 100 \text{ mM} \times V_2$$

$$V_2 = 1,25 \text{ ml alındı}$$

- % 0,5'lik Sarkosil için 0,25 ml alınıp karıştırıldı

- En son olarak Beta-merkaptoetanol'dan son hacim % 1 olacak oranda karıştırıldı

- Ve üzerine 50 ml'ye kadar DEPC ddistile su ilave edildi

2.3.3. 6M Guanidin Tiyosiyonat Hazırlanışı

- 100 ml'lik Guanidin tiyosiyonat hazırlamak için;

35.4 gr Guanidin Tiyosiyonat alındı ve 50 ml DEPC dd su içerisinde çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı.

2.3.4. 1M Sodyum Sitrat Hazırlanışı

-100 ml'lik Sodyum Sitrat hazırlamak için; 29 gr Sodyum Sitrat 60 ml DEPC dd su içerisinde çözüldü, pH asetik asitle 7.0 olarak ayarlandı ve DEPC dd su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.3.5. RNA Jeli

- 50 ml jel için
- 0,5 gr agaroz
- 36 ml dd su içerisinde mikrodalga fırında ısıtılır
- 60 °C'ye kadar soğutulur, termometre kullanılabilir
- 5 ml 10X MOPS (pH=7.0) eklenir
- 9 ml Formaldehit eklenir ve çeker ocak içinde jel tankına dökülür

2.3.6. RNA'nın RNA Jeline Yükleme İşlemleri

10 ul RNA

2 ul 10X MOPS

4 ul Formaldehit

10 ul Formamid

1 ul EtBr karıştırılır. 10 dakika 85 °C'de ısıtılmış su içerisinde bekletilir.

Daha sonra buz içerisinde konur ve kısca santrifüj edilir. Üzerine RNA jel yükleme tamponundan 3 ul eklenir ve RNA koşturma jelinde koşturulur. Jelin üzerinde kullanılan tampon 1 x MOPS çözeltisidir.

2.3.7. 10 x MOPS Buffer Hazırlanışı

- 0,4 M MOPS

- 0,1 M Sodyum Asetat

- 20 mM EDTA

- 1000 ml için

83,6 gr MOPS

13,6 gr Sodyum Asetat

20 ml 0,5 M EDTA çözeltisi karıştırılır ve üzerine 1000 ml'ye yakın bir hacime kadar dd su eklenir ve çözeltinin pH'ı NaOH ile 7.0 olarak ayarlanır ve 1000 ml'ye dd su ile ayarlanır.

2.3.8. 0,5 M EDTA Hazırlanışı

186,1 gr EDTA 800 ml dd su içerisinde çözülür. NaOH ile pH = 8.0'e ayarlanır ve çözeltinin toplam hacmi 1000 ml'ye tamamlanır.

2.3.9. 5X TBE Çözeltisinin Hazırlanışı

- 0.4 M Tris base

- 0.4 M Boric Acid

- 20 mM EDTA

1000 ml 5X TBE çözeltisi hazırlamak için

54 gr Trise Base

27,5 gr Borik Asit

20 ml 0.5 M EDTA çözeltisi

900 mL dd su içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Çözeltinin pH'ı 8.0 oluncaya kadar HCl eklenir. Çözeltinin toplam hacmi 1000 ml'ye tamamlanır.

2.3.10. DNA Yükleme Tamponu Hazırlanışı

- 400 µl gliserol,

- 300 µl 5 X TBE,

- 300 µl dd su,

Çok az miktarda Bromofenol Blue boyası eklenir ve yükleme tamponunun rengi mavi oluncaya kadar 1 M NaOH eklenir.

2.4. Tavşanların Yetiştirilmesi ve Parasetamol Uygulaması

Bu çalışmada Yeni Zellanda ırkı beyaz erkek tavşanlar kullanıldı. Tavşanlar %50-60 nemli ortamda, 16-19 °C Sıcaklıkta 12 saat aydınlık 12 saat karanlık esasına göre suni yem ve ot ile beslendiler. Tavşanlar 6-7 aylık ve ortalama 3000-4000 gr oluncaya kadar büyütüldü. Uygulama (6 adet) ve kontrol grubu (6 adet) olarak ikiye bölündü. Uygulama gurubundaki tavşanlara kesimden 4 saat öncesinde 500 mg Parasetamol/kg oranında serum fizyolojik içerisinde çözülerek intraperitoneal olarak uygulandı. Kontrol gurubuna ise aynı hacimde serum fizyolojik verildi. Tavşanlara kesimden 20 dakika önce Rompun 1 ml/kg ve Ketalar 1 ml/kg intramusküler uygulandı. Tavşanlar batın orta trasesinden thoraks bölgesine doğru bistüri ve makas yardımı ile açıldı. Tavşanın karaciğerinden 5 gr'lık parçalar alındı ve bunlar daha küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra tavşanın kaburgaları makas yardımı ile kıkırdak bölgelerinden kesilerek göğüs kafesi açıldı. Tavşanın aort damarı kesilerek ex edildi. 2x2x2 mm boyutlarında kesilen karaciğer örneklerinden yaklaşık 200 mg RNA Later saklama çözeltisi içinde -30 C^o'de analize kadar saklandı.

2.5. Standart Fenol-Kloroform Metodu ile Toplam RNA Ekstraksiyonu

1- 100 mg karaciğer/ml denatürasyon solüsyonu olacak şekilde homojenizasyon tütüpüne kondu ve 40 saniye homojenize edildi

2- Örnekler eppendorf tüpleri içinde 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi

3- Santrifüj sonrası süpernatant başka tüpe alındı ve aynı hacimde fenol kloroform izoamilalkol (25:24:1) eklendi ve 1 dakika vortekslendi

4- 5 dakika 12 000 g de santrifüj edildi ve süpernatanta 1/10 oranında 3M Sodyum Asetat eklendi

5- Fenol kloroform (1:1) çözeltisinden aynı hacimde eklendi, vortekslendi ve 12 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve bu işlem bir kere daha tekrarlandı

6- Süpernatant üzerine aynı oranda isopropanol karıştırılıp -20 °C'de 20 dakika bekletildi ve 14 000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi

7- Dipteki RNA çökeleği %70'lik ethanolle yıkandı ve 100 ul dd su içerisinde çözülerek -30 °C saklandı.

2.6. RNA İzolasyonu Kit Protokolü

Bu işlem için QIAGEN RNA Mini İzolasyon Kiti kullanıldı.

1- Yaklaşık 100 mg doku parçası alındı ve % 5 (w/v) doku olacak şekilde kit içerisindeki RLT çözeltisi içine kondu

2- 13 500 rpm hızda 5mm'lik uçla buz üzerinde 40 saniye homojenize edildi

3- Homojenattan 600 ul alındı (30 mg doku)

4- 10 dakika 18 000 rpm'de (4 °C) de santrifüj edildi

5- Süpernetant kısmı yeni eppendorf tüpüne alındı ve üzerine aynı hacimde %70 ethanol (DEPC dd su ile hazırlandı) eklendi

6- Çözeltinin 600 ul'si filtreye kondu ve altındaki tüple beraber 10 000 rpm 15 saniyede santrifüj edildi

7- Alt tüpteki sıvı atıldı ve tüp tekrar filtreye takılarak geriye kalan çözelti de filtreye eklendi ve yukarıdaki gibi sanrifüj edildi

8- Alttaki tüpteki sıvı atıldı ve filtreye RWI solüsyonundan 700 ul eklendi ve 10 000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi

9- Alttaki tüp atıldı ve filtrenin altına yeni bir tüp takıldı (2 ml) ve filtreye 500 ul RPE solüsyonu ilave edildi (kullanmadan önce RPE için 4 kat etanol eklendi) ve 15 saniye 10 000 rpm'de santrifüj edildi

10- Alttaki sıvı atıldı ve filtreye 500 ul RPE eklendi ve 2 dakika 10 000 rpm'de

santrifüj edildi

11-) Alttaki tüp atıldı ve filtre yeni bir eppendorf içerisine takıldı ve filtreye 50 ul RNAse içermeyen su eklendi ve 1 dakika 10 000 rpm'de santrifüj edildi

12-) Filtreye tekrar 50 ul RNAse içermeyen su konularak tekrar 1 dakika 10 000 rpm'de santrifüj edildi alttaki tüpteki saf toplam RNA hemen -30 oC'de saklandı

2.7. cDNA Sentezi Protokolü

cDNA sentezi için Invitrogen firmasının ürettiği SuperScript II ters transkriptaz enzimi kiti kullanılmıştır. cDNA sentezi firmanın önerdiği şekilde yapılmıştır.

100 µl'lik PZR tüpüne

- 6 µl dd su
- 5 µl RNA (yaklaşık 2.5 ug toplam RNA)
- 1 µl primer (4 pmol gen spesifik primer veya 100 pmol Poli T primeri)

- 1 µl dNTP (10 mM) eklendi, karıştırıldı ve

65 °C'de 5 dakika PZR makinesinde ısıtıldı

- 4 µl 5x First Strand tamponu

- 2 µl DTT eklendi

42 °C'de 2 dakika ısıtıldı

- 0.5 µl SuperScript II ters transkriptaz enzimi eklendi ve karıştırıldı

PZR makinesinde 42 °C'de 50 dakika ve 70 °C'de 15 dakika ısıtıldı ve -20 °C de saklandı.

2.8. PZR Protokolü

PZR için enzim olarak Taq Polimeraz kullanıldı

- 1 µl cDNA
- 2,5 µl 10 x PZR Tamponu
- 0,25 µl dNTP (10 mM)

- 0,25 µl ileri primer (100 pmol/ul)
- 0,25 µl geri primer (100 pmol/ul)
- 0,25 µl Taq Polimeraz enzimi
- 20.50 µl dd su

100 µl'lik PZR tüpünde karıştırdı ve PZR işlemine tabi tutuldu.

Tablo 1. Primer Dizilimleri

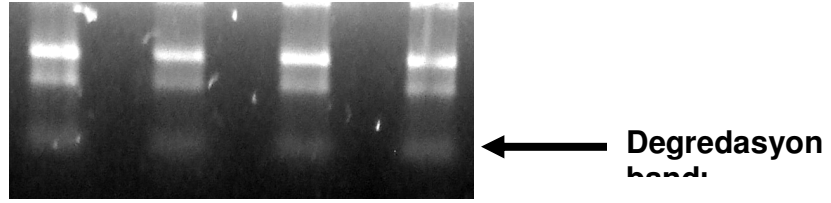
Primer Adı	Primer Dizilimi	Baz sayısı	Kaynak
CuZnSOD F CuZnSOD R	GTGTGCGTGCTGAAGGGCGA CATTTCACCTTTGCCCAAGTC	379	72
GAPDH F GAPDH R	TGGTCACCAGGGCTGCTTTTAACT GCTAAGCAGTTGGTGGTGCAGGA	424	72
CAT F CAT R	AGGGTGGTGCTCCCAACTACTAC GGCTTCTGGGAGTTGTACTGGTC	262	Kendi tasarımımız
GSH-Px F GSH-Px R	GGAGAACGCCAAGAATGAGG GATGTCGATGGTGGGGAAG	253	Kendi tasarımımız

2.9. DNA Analizleri

1,5 gr agaroz 100 ml 1X TBE  zeltisi içerisinde mikrodalga fırında 1 dakika kadar ısıtılarak  z nmesi sağlandı. Biraz soğutulduktan sonra  zelti içerisine 1 µl EtBr eklendi ve tarakları yerleştirilmiş elektroforez tankına döküldü. Yarım saat beklendikten sonra donan jelden taraklar çekilerek uzaklaştırıldı ve jelin üzerini örtecek kadar tank içerisine 1 X TBE  zeltisi eklendi. Tarak dişlerinin jel üzerinde oluşturdukları kanallara DNA'lar DNA yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi ve 100 voltta yarım saat koşturuldu. Jel tanktan alınarak ultraviyole işığının üzerinde incelendi. DNA bantlarının fotoğrafları çekildi ve ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) programında analiz edildi.

3. SONUÇ VE TARTIŞMA

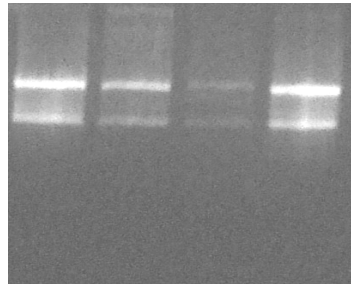
Bu amaçla tavşanlara Parasetamol uygulaması yapıldıktan 4 saat sonra kesim işlemi yapıldı ve diğer işlemler için bütün hayvanlardan örnekler alınırken bizim deneylerimiz için sadece uygulama ve kontrol grubundan 3'er tavşandan karaciğer örnekleri alınarak RNA Later çözeltisi içerisinde -30 °C de saklandı. Bu örneklerden öncelikle Fenol-Kloroform protokolüne göre toplam RNA saflaştırılması yapıldı ve elde edilen RNA'lar RNA jelinde koşturuldu (Şekil 1.)



Şekil 1. Fenol-Kloroform protokolüne göre saflaştırılmış tavşan karaciğeri toplam RNA'larının RNA jelindeki görüntüsü.

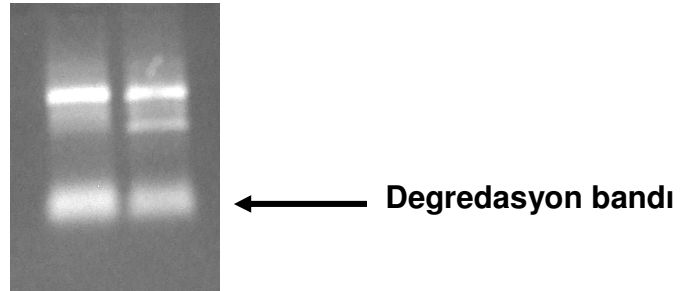
Koşturma sonucu Şekil 1'de görüldüğü gibi RNA bantlarının alt kısımlarında degradasyon bantları gözlemlendi. Daha sonra bu protokol yeni çözeltiler hazırlanarak dört kez daha tekrarlandı ancak aynı sonuçlar elde edildi.

Bunun üzerine Qiagen-RNA İzolasyon Kiti kullanılarak protokole uygun şekilde saflaştırma yapıldı. Elde edilen RNA'lar da öncelikle RNA jelinde koşturuldu ve yine aynı degradasyon bantları görüldü. Degradasyonun RNA jelinden kaynaklanabileceği düşünülerek RNA jeli yerine DNA jeli kullanılarak RNA'lar tekrar koşturuldu ve ribosomal RNA'ların parçalanmadan kaldıkları gözlemlendi (Şekil 2)



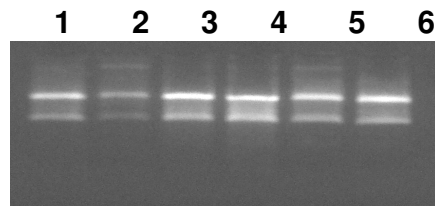
Şekil 2. Quiagen-RNA İzolasyon kitinden elde edilen tavşan karaciğeri toplam RNA'ların DNA jelindeki görüntüsü

Böylece sorunun RNA jelinden kaynaklandığı görüldü. Fenol-Kloroform metodu ile elde edilen RNA'lar bir de DNA jelinde koşturuldu fakat yine degradasyon bantları gözlemlendi (Şekil 3).



Şekil 3. Fenol-Kloroform protokolüne göre saflaştırılmış tavşan karaciğeri toplam RNA'ların DNA jelindeki görüntüsü

Bu sonuçlardan sonra, bütün örneklerin RNA saflaştırması işlemlerinde Qiagen firmasının RNA izolasyon kiti kullanıldı. RNA'ları jelde koşturmanın amacı RNA'ların bütünlüğünü test etmek ve farklı örneklerin ribozomal RNA bantlarını birbiriyle karşılaştırmak olduğu için DNA jelini kullanmayı pratikliği açısından uygun gördük. Deneylerde 3 adet kontrol ve 3 adet Parasetamol uygulama grubundaki tavşanların karaciğerleri kullanıldı. Bütün saflaştırılan RNA'lar DNA jelinde koşturularak RNA'ların bütünlüğü test edildi (Şekil 4) ve cDNA reaksiyonlarında aynı miktarda RNA ekleyebilmek için bu RNA bantlarının sinyal intensitesi ölçüldü ve aynı miktara karşılık gelecek şekilde farklı hacimlerde toplam RNA cDNA sentezi reaksiyonuna eklendi.



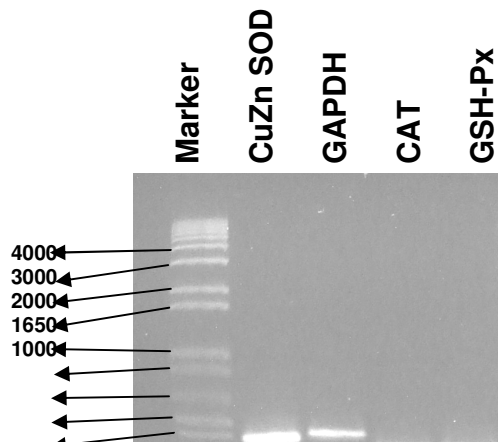
Şekil 4. Tavşan karaciğeri toplam RNA'larının DNA jelindeki görüntüsü. (1,2,3 sırasıyla Parasetamol uygulama grubu 1, 2 ve 3'ü; 4, 5, 6'da sırasıyla parasetamol kontrol grubu 1, 2 ve 3 'ü gösterir.)

Örneklerden cDNA sentezi için 18 T den oluşan PoliT18 primeri tüm mRNA'lardan cDNA sentezi için kullanıldı.

Çalışmamızda hayvan olarak tavşan kullandığımız için, literatürde seviyelerindeki değişikliklere bakacağımız CuZn-SOD, GSH-Px, Katalaz enzimlerinin mRNA tespitinde kullanılacak primerler araştırıldı. Tavşan CuZn-SOD geni için uygun primerler bulundu (72, Ek1) ve mRNA seviyesi değişmeyen genlerden GAPDH primer çifti de bu çalışmada kullanıldı (72, Ek1). İstenen büyüklükte DNA'lar elde edildi (Şekil 5).

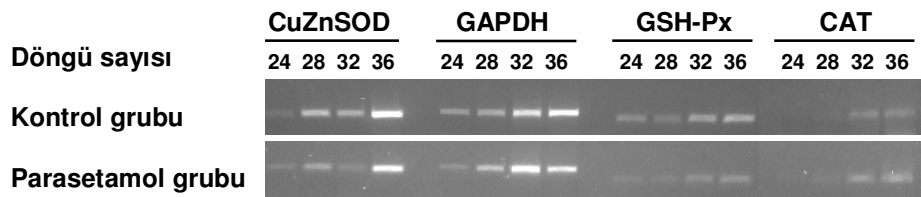
Tavşan GSH-Px geni için literatürde bulunan primer çifti çalışmadığı için Tavşan GSH-Px geninden Primer3 programı (<http://frodo.wi.mit.edu/>) ile kendi dizayn ettiğimiz primer çiftini kullandık ve 45°C den 65°C ye kadar farklı sıcaklıkları deneyerek en iyi bağlanma sıcaklığını 60°C olarak tespit ettik ve arzu edilen büyüklükte ürünler elde edildi (Ek2 ve Şekil 5).

Tavşan Katalaz mRNA dizilimi DNA databankasında bulunamadığı için tavşana en yakın hayvan olan fare ve sıçan mRNA'ları karşılaştırılarak eşlenikliğin en fazla olduğu bölgelerden primer çiftleri yine Primer3 programı ile dizayn edildi. Bu primer çiftleri 45°C den 65°C'ye kadar farklı sıcaklıklarda denenerak en iyi bağlanma sıcaklığı 45°C olarak belirlendi. İstenen büyüklükte DNA elde edildi (Ek3 ve Şekil 5).



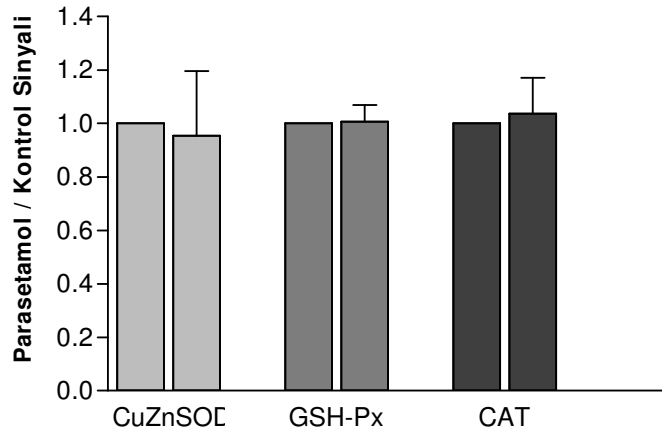
Şekil 5. Enzimler ve GAPDH için büyüklüklerin RT-PZR ile belirlenmesi. DNA örnekleri %1.5 Agaroz jelinde DNA Markeri (1 kb Plus - Invitrogen) ile koşturuldu.

En uygun sıcaklık tespit edildikten sonra enzimlerin mRNA seviyelerindeki değişimleri belirlemek için semikantitatif RT-PZR yöntemi kullanıldı (73). Her enzim ve GAPDH farklı PZR döngülerinde (24, 28, 32, 36) PZR'ye tabi tutuldular. Bütün örneklerin PZR işlemleri bittikten sonra her örnek için enzimler aynı DNA jelinde koşturuldu (Şekil 6).



Şekil 6. Enzim mRNA'larının farklı RT-PZR döngülerindeki doğrusal bölgenin belirlenmesi ve kontrol ile karşılaştırılması. Parasetamol uygulama ve kontrol grubu tavşanlarının karaciğerlerinin cDNA'larının farklı döngülerdeki PCR sonuçlarının DNA jelindeki görünümü. %1.5 Agaroz jeli kullanıldı.

İşlem her bir grup için 2 kez tekrarlandı. Jellerin resimleri çekildi ve DNA bantlarının kantitatif analizleri ImageJ programıyla yapıldı. Farklı mRNA'lar farklı döngülerde doygunluğa ulaştı. Grafikler çizilerek doğrusal bölgelerdeki sinyaller karşılaştırma için kullanıldı. CuZn-SOD ve GAPDH için 24 ve 28. döngüler, GSH-Px için 24, 28 ve 32. döngüler ve CAT için 32 ve 36. döngüler doğrusal bölgede kalmaktadır. Kontrol ve parasetamol grubundaki DNA sinyalleri GAPDH DNA bandına oranlandı ve daha sonra da kontrol grubuna göre normalize edildi (Şekil 7). Student's t-testi analizi sonucunda parasetamol grubundaki CuZnSOD, GSH-Px ve CAT enzimlerinin mRNA seviyelerinin kontrol grubuna göre değişmediği gözlemlendi ($p>0.05$).



Şekil 7. Parasetamol uygulaması sonucu CuZn-SOD, GSH-Px ve CAT mRNA seviyelerindeki değişikliklerin semikantitatif olarak belirlenmesi. Parasetamol ve kontrol grubu tavşanlarının karaciğer CuZnSOD, GSH-Px ve

CAT mRNA'ları RT-PCR sonrasında GAPDH genine oranlandı ve sinyal kontrol grubuna göre normalize edildi. Her enzim için soldaki bar kontrolü sağdaki de uygulamayı gösteriyor. Her grup için 3 örnek ve her örnek için 2 jel kullanıldı. Hata çubukları standart sapmayı gösteriyor.

Bu tez hazırlandığı sırada henüz CuZnSOD, GSH-Px ve CAT enzimlerinin seviyelerini belirlemek için biyokimyasal deneyler ve dokulardaki okdatif hasarın belirteci histopatolojik ve immuno-histokimyasal analizler devam ettiği için bu deneylerin sonuçları ile ilgili bir karşılaştırma yapılamamıştır. Eğer Parasetamol uygulama grubunda CuZnSOD, GSH-Px ve CAT enzimlerinin seviyelerinde bir değişiklik meydana gelirse bunun mRNA sentezinden sonraki translasyon basamaklarını etkilediğini söyleyebiliriz. Literatürde antioksidan enzimlerin mRNA seviyelerindeki değişimle birlikte enzim aktivitesinin de değiştiğini ve bazı durumlarda da enzim aktivitesindeki değişikliğin mRNA seviyelerindeki değişiklikten kaynaklanmadığını gösteren örnekler bulunmaktadır.

Aksenov ve arkadaşları [74] tarafından oksidatif stresle alakalı olduğu bilinen Alzheimer hastalığının incelendiği çalışmada kontrol grubu ve Alzheimerli hastaların beyinlerinin hipokampus, arka paryetal lobülü ve beyincik bölgelerindeki oksidatif stres genlerinden Mn-, CuZn-superoksit dismutazları (Mn- ve CuZn-SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GSSG-R) enzimlerinin mRNA'larının beta-aktin and siklofilin marker mRNA'larına oranlarına RT-PCR yoluyla bakıldı. Mn-SOD mRNA/beta aktin oranının Alzheimerli beynin bütün bölgelerinde değişmediği gözlemlendi fakat Cu,Zn-SOD mRNA/beta-aktin mRNA oranında arka paryetal lobülünde bir artış gözlemlendi. Hipokampus ve arka paryetal lobülündeki CAT, GSHPx, and GSSG-R genlerinin mRNAlarının beta aktin genine oranlanmış seviyelerinde bir artış gözlenirken bu artış beyincik bölümünde gözlenmedi.

Gan ve arkadaşları [75] tarafından Se-eksizi olan sıçanlara fazla miktarda Selenyum verilmesinin GSH-Px enziminin aktivitesi ve mRNA seviyesi üzerine etkileri RT-PZR yöntemiyle sıçanların karaciğerinde, böbreklerinde ve testislerinde araştırılmıştır. Çalışmada 20, 40 ve 80 mikrog/Se/kg/gün olacak

şekilde 15 gün boyunca intraperitoneal vermiştir. 20 mikrog/Se/kg/gün verildiğinde kontrol grubuna göre Selenyum grubundaki hayvanların karaciğer ve testislerindeki GSH-Px aktivitelerinde ve mRNA seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Fakat 40 ve 80 mikrog/Se/kg/gün verildiğinde hem GSH-Px aktivitesinde hem de mRNA seviyelerinde ciddi bir düşüş gözlenmiştir. Böbreklerde ise GSH-Px aktivitesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

Sadi ve ark. [76] Diyabet hastalığında antioksidan enzimlerden SOD ve katalazın reaktif oksijen türlerini süpürme etkisini streptozotokin ile diyabet modeli oluşturulmuş ratların karaciğer dokularında RT-PZR ile mRNA seviyelerini karşılaştırarak, Western-blot analizi ile protein seviyelerine bakarak ve enzim aktivitelerini belirleyerek incelemiştir. Kontrol grubuna göre bu hayvanların SOD ve katalaz mRNA'ları, protein seviyeleri ve enzim aktiviteleri daha düşük bulunmuştur. Ratlara kuvvetli bir antioksidan olan Vitamin C verildiğinde ise SOD ve katalaz aktiviteleri artmasına rağmen mRNA ve protein seviyelerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Diğer bir antioksidan olan Lipoik asid verildiğinde ise SOD ve katalaz enzimlerinin mRNA seviyeleri değişmemiş fakat protein seviyeleri ve enzim aktiviteleri artmıştır. Bu verilerden lipoik asidin diyabetlerde oksidatif hasarı önlemede transkripsiyonu değiştirmeden translasyonda etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1 - <http://tr.wikipedia.org/wiki/Parasetamol> sitesinden 10.09.2007 tarihinde saat 22:20 itibariyle yapılan taramadan elde edilen sonuçlar.
- 2- <http://www.medikalsozluk.com/organlar/karaciger.asp> sitesinden 10.09.2007 tarihinde saat 22:58 itibariyle yapılan taramadan elde edilen sonuçlar.
- 3- <http://www.saglik sayfam.com/anatomi/karaciger.html> sitesinde 10.09.2007 tarihinde saat 23:15 de yapılan taramadan elde edilen sonuçlar.
- 4- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, E.C., "Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now ?", Review Article., J Lab Clin Med., 119(6): 598-620, (1992).
- 5- Kayaalp, S.O., "Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji", 6. baskı, Cilt 2., Feryal matbaacılık, Ankara, 1629-1631 s., (1992).
- 6- Paller, S.P., Nath, K.A., "Radical thoughts about kidneys", Editorials, J Lab Clin. Med., 118 (5) : 415-417, (1991).
- 7- Kayaalp, S.O., "Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji", 5. baskı, Cilt 2., Feryal matbaacılık, Ankara, 1569 s., (1990).
- 8- Fridowich, I., "süperoxide dismutases". Ann. Rev. Biochem. 44: 147-159, (1975)
- 9- Klug, D., Rabani, J., "Adirect demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis", J. Biol. Chem. 247: 4839-4842, (1972)

10- Kılınç, K.; Oksijen Radikalleri : Üretilmeleri, Fonksiyonları ve Toksik Etkileri, Biyokimya Dergisi, Cilt : X, Sayı:2, 60-89, 1985

11- Aleman, V.; Handler, P.; (1967)Dihydroorotate Dehydrogenase, The Journal of Biological Chemistry, Vol: 242, No.18, Issue of September 25, 4087-4096.

12- Badwey, J. A., Karnowsky, M.I., (1980), Active Oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. Ann. Rev. Biochem. 49: 695-726.

13- Hamilton, A.H., Libby, R.D., (1973) The valence of copper and the role of superoxide in the D-galactose oxidase catalyzed reaction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 55: 333-340

14- Bovers, A. (1984) Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. Packer,L. (ed) Methods in Enzymology, cilt 105, 429-435

15- Pigeolet, E.; Corbister, P.; Houbion, A.; Lambert, D.; Michiels, C.; Raes, M.;Zachary,M.D., Remacle, J.; (1990) Glutathione Peroxidase, Superoxide Dismutase, and Catalase Inactivation by Peroxides and Oxygen Derived Free Radicals, Mechanism of Ageing and Development, 51, 283-297

16- Turrens, J.F., Boveris, A., (1980) Generation of Superoxide Anion by the NADH dehydrogenase of Bovine Heart Mitochondria, Biochem J., 191, 421-427

17- Wefers, H.; (1984) Singlet Oxygen in biological Systems, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 18, 91-1004

- 18- Badwey , J.A., Karnovsky, M.I., (1980) Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 695-726
- 19- Southorn, A.P., Powis, G., (1988) Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reactions, *Mayo Clin. Proc.*, 63:381-389
- 20- Gregory, E.M., Fridowich, I., (1973). Oxygen toxicity and superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* 114: 1193-1197
- 21- Beauchamp, C., Fridowich, I., (1978). A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 245: 4641-4646
- 22- Wilson, R. L (1979) . Hydroxyl radicals and biological damage in vitro : What relevance *in vivo*. *Ciba Foundation Symposium 65 (new series)*. 19-35
- 23- Laurindo FRM, da Luz PL., Uint L., et al. Evidence for superoxide radical-dependent coronary vasospasm after angioplasty in intact dogs. *Circulation.* 83 (5): 1705-1715, 1991
- 24- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., ; Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease : An Overview, *Methods in Enzymology. Part B.* Edited by. Packer, L., Glazer, A. N., Academic Press., Inc. San Diego, Vol: 186, pp:1-85, 1990
- 25- Czapski, G.; Reaction of OH, *Method in Enzymology*, Academic Press, Florida, Vol:105, 209-215, 1984
- 26- Mackay, J. W., Bewley, G. C.; The Genetics of Catalase in *Drosophila melanogaster* ; Isolation and Characterization of Acatlasemic Mutans, *Genetics*, 122: 643-652, July 1989

27- Olakanmi, O., McGowan, S. E., Hayek, B. M., Britigan, E. B.; Iron Sequestration by Macrophages Decreases the Potential for Extracellular Hydroxyl Radical Formation, *The Journal of Clinical Investigation*, 91, 889-899, 1993

28- Çiğremiş, Y.; Sigara tiryakilerinde eritrosit içi süperoksid dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri, Malatya, 1997.

29- Scott, M.D., Lubin, B. H. , Zuo, L., Kuypers, F. A.; Erythrocyte Defense Against Hydrogen Peroxide: Preeminent Importance of Catalase , *J. Lab. Clin. Med.* Vol:118, Number: 1, 7-16, July 1991

30- Tribble, D. L., Jones, D. P., Oxygen Dependence of Oxidative Stres, *Biochemical Pharmacology*, Vol: 139, No:4, pp: 729-736, 1990

31- McCord, J. M., Fridovitch, I.,; Superoxide dismutas; an enzymic function for erytrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244: 6049-6055, 1969

32- Roos , D., Weening R. S., Wyss, S.R.; Protection of human neutrophils by endogenous catalase: studies with cells from catalase deficient individuals. *J ClinInvest.* 65:1515-1522, 1980

33-Chenge, B., Sies, H., Boveris, A.; Hydroperoxide metabolism, 59: 527-605, 1979

34- Simpson P. J., Lucchesi B.R.; Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury, Informative review. *J Lab Clin. Med.* 110 (1) : 13-30, 1987

- 35- Niki E., Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr.* 54 (6 Suppl): 1119S-11245S,1991
- 36- Therond, P., Rousselot, D.B., Spraul, A.D., Conti, M. And Legrand, A., Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 3 (2000) 373-384
- 37- Vina, J., Estrela, J.M., Guerri, C., Romero, F.J. ; Effect of Ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes, *Biochem J.*, 188 (1980) 549-552
- 38- Callans, C., Wacker, L.S. and Mitchell, M.C., Effect of ethanol feeding and withdrawal on plasma glutathione elimination in the rat, *Hepatology*, 7 (1987) 496-501
- 39- Nordberg, J., Arner, E.S.J., Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thiredoxine system, *Free Radical Bio. Med.*, 31(2001) 1287-1312
- 40- Skrzydlewska, S. and Farbiszewski, R., glutathione consumption and inactivation of glutathione-related enzymes in liver, erythrocytes and serum of rats after methanol intoxication, *Arch. Toxicol.* 71 (1997) 741-745
- 41- Berman, M. O., Shagrin, B., Evert, D.L. and Epstein, C.; impairments of brain and behavior the neurological effects of alcohol, *Alcohol Health Res. World*, 21 (1997) 65-75
- 42- Yan, N., and Meister, A.; Amino acid sequence of rat kidney γ -glutamylsisteine synthesis, *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 1588-1593

43- Luperchio, S., Tamir, S., and Tannenbaum, S.R.; NO-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells, *Free Radical Bio. Med.*, 21 (1996) 513-519

44- Ignazio, G., Giangluigi, V., Carlo, S., Paolo, B., and Emanuele, A.; Oxidation of circulating proteins in alcoholics; role acetaldehyde and xanthine oxidase, *J. Hepatol.*, 25 (1996) 28-36

45- Andrews, P.C. and Krinsky, N.I., Human myeloperoxidase and hemi myeloperoxidase, *Method Enzymol.*, 132 (1986) 369-370

46- Klebanoff, S.J., Waltersdorff, A.M. and Rosen, H., Anti-microbial activity of myeloperoxidase, *Method Enzymol.*, 105 (1984) 339-403

47- Markert, M., Andrews, P.C. and Babior, B.M.; Measurement of O₂ – production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils, *Method. Enzymol.*, 105 (1984) 358-365

48- Hazen, S.L., Zhang, R., Shen, Z., Wu, W., Podrez, E.A., MacPherson, J.C., Schmitt, D. And et al, Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes, *Circ. Res.*, 85 (1999) 950-958

49- Carr, A.C., McCall, M.R. and Frei, B.; Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species reaction pathways and antioxidant protection, *Arterioscl. Throm. Vas. Biol.*, 20 (2000) 1716-1723

50- Marti, R., Varela, E., Pascual, C. And Segura, R.M.; Determination of xanthine oxidoreductase forms: influence of reaction conditions, *Clin. Chim. Acta*, 303 (2001) 117-125

51- Linder, N., Rapola, J. And Raivio, K.O.; Cellular expression of Xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues, *Lab. Invest.*, 79 (1999) 967-974

52- Terada, L.S., Leff, J.A. and Repine, J.E.; Measurement of xanthine oxidase in biological tissues, *Method. Enzymol.*, 186 (1990) 651-656

53- Pritsos, C.A.; cellular distribution, metabolism and regulation of xanthine oxidoreductase enzyme system, *Chem. Biol. Int.*, 129 (2000) 195-208

54- Lee, C., Liu, X. And Zweier, J.L.; Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 9369-9376

55- Çiğnemiş, Y.; Kronik alkol ve sigara kullanımına maruz bırakılan erkek ratların böbrek dokularının histopatolojik ve malondialdehit, nitrik oksit, ksantin oksidaz, ksantin dehidrogenaz, miyeloperoksidaz, glutatyon yönünden incelenmesi; *Malatya* (2003) s: 28-47

56- Sun, Y., Oberley, W.L., Elwell, H.J.; Antioxidant Enzyme Activities in Normal and Transformed Mouse Liver Cells, *J. Cancer*, 44, (1989) 1028-1033

57- Bolann, B.J., Ulvik, R.J.; Improvement of a Direct Spectrophotometric Assay for Routine Determination of Superoxide Dismutase Activity, *Clin. Chem.*, 37/11, (1991) 1993-1991

58- Oberley, L.W., Buettner, G.R.; Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review, *Cancer Research*, 39, (1979) 1141-1149

59- Forman, H.J., Fridovich, I.; Superoxide Dismutase: A Comparison of Rate Constants, *Arch. Biochem. Biophys.*, 158, (1973) 396-400

60- Zel, A., Dadoo, R., Geer, B.W., Heinstra, P.W.H.; The involvement of Catalase in Alcohol Metabolism in *Drosophila Melanogaster* Larvae, Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol.287, No.1, (1991) 121-127

61- Sichak, S.P.; Failure of Benzene and Phenol to Serve as Substrates for the Peroxidatic Action of Catalase, Journal of Toxicology and Environmental Health, 31: (1990) 227-233

62- Sohal, R.S., Farmer, K.J., Allen, R.G., Cohen, N.R.; Effect of Age Oxygen Consumption, Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione, Inorganic Peroxides and Chloroform-Soluble Antioxidants in Adult Male Housefly, *Musca Domestica*, Mechanisms of Ageing and Development, 24 (1983) 185-195

63- Perey, M.E., Catalase: An old enzyme with a New Role ?, Can. J. Biochem. Cell Biol., Vol. 62, (1984), 1006-1014

64- Akkuş, İ.; Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, 1-81, (1995) Konya

65- Kraus, R.J., Ganther, H.E.; Reaction of Cyanide with Glutathione Peroxidase, Biochem. Biophys. Res. Comm., 96:1116-1122, (1980)

66- Paglia, D.E., Valentine, W.N.; Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase, J. Lab. Clin. Med., Vol. 70, no. 1, 158-169, (1967).

67- Durmaz, R., (2004). "Uygulamalı Moleküler Biyoloji", İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya

68- Tomkins L.S., The use of molecular methods in infectious diseases. N Engl. J.Med.

(1992) ;327 (10):1290-7

69- Buimer, M., Van Doornum G.J.J.; et al. Detection of chlamydia trachomatis and Neisseria

gonorrhoeae by ligase chaine reaction- based assays with clinical specimens from various

sites: implications for diagnostic testing and screening. J. Clin. Microbiol (1996);34:2395-400.

70- Temizkan, G. , Yilmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Etan, H., Sarıkaya, A.T., ve Arda, N.,

(2004). “Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler”, İstanbul Üniversitesi BİYOGEN

yayımları. İstanbul.

71- Howe, C. (1997) ; Gene Cloning and Manipulation, Cambridge University Pres.

72- Hiltunen T, Luoma J, Nikkari T, Ylä-Herttuala S., Induction of 15-lipoxygenase mRNA and protein in early atherosclerotic lesions. Circulation. 1995 Dec 1;92(11):3297-3303.

73- Marone M., Mozzetti S., De Ritis D., Pierelli L, Scambia G., Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample, Biol. Proced. Online 2001;3(1): 19-25

74- Aksenov MY, Tucker HM, Nair P, Aksenova MV, Butterfield DA, Estus S, Markesbery WR., The expression of key oxidative stress-handling genes in

different brain regions in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 1998 Oct;11(2):151-64.

75- Gan L, Liu Q, Xu HB, Zhu YS, Yang XL., Effects of selenium overexposure on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase gene expressions and activities. *Biol Trace Elem Res.* 2002 Nov;89(2):165-75

76- Sadi G, Yılmaz O, Güray T., Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. *Mol Cell Biochem.* 2007, sayı verilme aşamasında.

5. EKLER:

5.1. Ek1. Cu-Zn SOD Gen Dizilimi

Tavşan Cu-Zn SOD enziminin mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No. Z22644

```
1  gaattcggcaccgaggcgtcctgcagcgtctcccgccccctcgctgcccgaccggagcg
      5' gtgtgctgctgaagggcga 3'
61  cgccgctgctggagtcctggcgacgaaggctgtgtgctgctgaagggcgacggcccggtc
121 gaggccaccatccacttcgagcagaaggggaacagggcccgtggtggtcaagggacgcata
181 acaggactgaccgaaggcctgcacgagttccatgtccaccagtttgagataatagacaa
241 ggctgtacgagtgacggccctcactttaatcctctatccaaaaaacatgggggaccgaag
301 gatgaagagaggcacgtgggcgacctgggtaatgtgactgcaggcagcaatggtgtcgct
361 gatgtgtaattgaagattctgtgatctcactctcgggagatatgtccgtcattggccgc
      3' ctgaaccgttccacctttac 5'
421 acgctggtggtccacgagaaagaagacgacttgggcaaaggtggaatgacgagagtaca
```

5.2. Ek2. Glutasyon Peroksidaz Gen Dizilimi

Tavşan Glutasyon Peroksidaz enziminin mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No: X13837

```
1 cccgctttgtctcacaccatgtgtgctggctcgatggcggcggtgccagctctgtgtac
61 tccttctcagcgcacccgctggccggcgaggagcccgtgaacctgggctccctgcggggc
121 aaggtgctgctcattgagaatgtggcgctcgctctgaggcactacggtccgggactacacc
181 cagatgaacgagctgcaagagcgcctcgggccccggccctggctgctcggttcccg
      5' ggagaacgccaagaatgagg 3'
241 tgcaaccagtttgggcatcggagaacgccaagaatgaggagattctgaattccctcaag
301 tatgtccggcctggaggcgggttcgagcccaacttcatgctcttccagaagtgcgaggtg
361 aacggcgccaaggccagcccgcctcttcgccttctcgcgggaggccctgccgcccccagc
421 gacgacccactgcgctcatgaccgaccccaagttcatcacctggtgcccgggtgtgccgt
481 aacgacgtttcctggagcttcgagaagttcctgggggccccgatgggtgttcccgtgcgc
      3' gaaggggtggtagctgtag 5'
541 aggtacagccgcgcttccccaccatcgacatcgagcccgacatccaagccctgctgtcc
601 aaggggtctggcgggtgcttagggcgccccctaccctggctgcttgccagtggcctgctgc
661 tctctgggggtttcatccatgagggcggttccccgaaaacaaatggaggaacgcctgatg
721 tccgggaaacccccaggtggcgctgggtcctgtccatccc
```

5.3. Ek3. Katalaz Gen Dizilimi

Sıçan Katalaz enziminin mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No: NM_012520

```
1 attgcctacccccgggtggagaccgtgctcgccggccctcttgctcacgttctgcagct
61 ctgcagctccgcaatcctacaccatggcggacagccgggaccagccagcgcaccagatga
121 agcagtggaaggagcagcggggcccctcagaaacccgatgtcctgaccaccggaggcggga
181 acccaataggagataaaacttaatatcatgactgcggggccccgagggcccctcctcgttc
241 aagatgtggttttcaccgacgagatggcacactttgacagagagcggattcctgagagag
301 tggatcatgcaaagggagcaggtgcttttgatactttgaggtcaccacagatattacca
361 gatactccaaggcaaaggtgtttgagcatattggaagaggactcctattgccgtccgat
421 tctccacagtcgctggagagtcaggctcagctgacacagttcgtgacctcgtgggtttg
481 cagtgaattctacactgaagatggtaactgggacctcgtgggaaacaacaccctattt
541 tcttcatcagggatgccatgttgtttccatcctttatccatagccagaagagaaaccac
601 aaactcacctgaaggaccctgacatggctctgggacttctggagtctttgtccagagtctc
661 tccatcaggttactttcttgttcagcgcaccgagggattccagatggacatcggcacatga
721 atggctatggctcacacacctcaagctgggttaatgcgaatggagaggcagtgactgca
781 agttccattacaagactgaccagggcatcaaaaactgcctgttgaagaggcaggaagac
841 ttgcacaggaagaccggattatggcctccgagatcttttcaatgccatcgccagtggca
901 attacccatcctggactttttacatccaggtcatgactttcaaggaggcagaaaccttc
961 catttaatccatttgacctgaccaaggtttggcctcacaaggactaccctcttataccag
1021 ttggcaaactggtcttaaacagaaatcctgctaattattttgctgaagttgaacagatgg
1081 cttttgacccaagcaacatgccccctggcattgagcccagcccggacaagatgctccagg
1141 gccgcctttttgcttaccagacactcaccgccaccgctgggaccaaactatctgcaga
1201 tacctgtgaactgtccctaccgtgctcgcggtggccaactaccagcgcgatggccccatgt
5' agggtggtgctccaactactac 3'
1261 gcatgcatgacaaccagggtggtgctccaactactaccccaacagcttcagcgcaccag
1321 agcagcagggctcggccctggagcaccatagccagtgctctgcagatgtgaagcgttca
1381 acagtgctaatgaagacaacgtcactcaggtgcgacattctatacgaaggtgtgaatg
1441 aggaggagaggaaacgcctgtgtgagaacattgccaaccacctgaaagatgctcagcttt
1501 tcattcagaggaaagcgggtcaagaatttcactgacgtccaccctgactacggggcccag
3' ctggatcatgttgaggggtcttcgg 5'
1561 tccaggctcttctggaccagtacaactcccagaagcctaagaatgcaattcacacctacg
1621 tacaggccggctctcacatagctgccaagggaaaagctaacctgtaagcaggggtgctc
```


ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Samsun ili Kavak ilçesinde doğdu. İlk ve Orta okulu Samsun'un Kavak ilçesinde okudu. Lise öğrenimimi Havza Sağlık Meslek Lisesi'nde tamamladı. 1997 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne kayıt yaptırdı ve Haziran 2001 tarihinde mezun oldu. 2001 yılından itibaren sağlık memuru olarak Kars Devlet Hastanesinde görev yapmakta.