



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NERİUM OLEANDER DİSTİLATININ YÜKSEK KOLESTEROLLÜ DİYET UYGULANMIŞ RATLARIN KARACİĞER DOKULARINDAKİ GEN İFADE DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN MİKROARRAY YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Burcu Asena ODABAŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs-2013
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NERİUM OLEANDER DİSTİLATININ YÜKSEK KOLESTEROLLÜ DİYET UYGULANMIŞ RATLARIN KARACİĞER DOKULARINDAKİ GEN İFADE DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN MİKROARRAY YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Burcu Asena ODABAŞI

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gökhan KARS

2013, 98 Sayfa

Jüri
Yrd. Doç. Dr. Gökhan KARS
Doç. Dr. Emine ARSLAN
Prof. Dr. A. Levent BAŞ

İnsanda eritrositler dışında bütün hücreler tarafından sentezlenebilen kolesterol, oldukça önemli bir biyolojik moleküldür ve miktarı çeşitli mekanizmalarla kontrol edilir. Bu çalışmada, yüksek kolesterollü diyet ve kolesterole etki ettiği düşünülen *Nerium oleander* (NO, zakkum) yapraklarından elde edilen distilatın rat karaciğerinde gen ifade düzeylerine etkisi mikroarray teknolojisi ile araştırılmıştır. Çalışmada, normal diyet grubu (ND), kolesterol diyet grubu (KD) ve zakkum distilatı ve kolesterol kombine diyet uygulanan grup (ZKD) olmak üzere üç farklı rat grubu kullanılmıştır Bu diyetler uygulandıktan sonra sakrifiye edilmiş ratların karaciğer dokuları hazır olarak temin edilmiştir. Karaciğer dokusunda gerçekleşen toksikolojik ve metabolik yolların ilişkili olduğu genlerin ifadesi Affymetrix GeneChip® Rat Genome 230 2.0 array çipi kullanılarak ve sonrasında Affymetrix® Arrays Partek® Genomics Suite™ 6.6 programı ile analiz edilerek belirlendi.

Analiz sonuçlarına göre, yüksek yağlı diyet rat karaciğerinde 3000'e yakın genin ekspresyon seviyelerinde değişimlere neden olmuştur. Ayrıca CYP39A1, SOAT1, SC4MOL genleriyle birlikte kolesterol metabolizmasıyla ilgili 46 adet gende ekspresyon değişiklikleri saptanmıştır. KD grubunda ifadeleri artan ya da azalan bazı genlerin düzeylerinin, yüksek yağlı diyet ve *Nerium oleander* distilatı birlikte uygulanan ZKD grubunda normal diyet uygulanmış ND grubundakilere daha yakın olduğu bulunmuştur. Bulgular, *Nerium oleander* distilatının yüksek yağlı diyetin etkisini düşürücü bir gıda ek maddesi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Kolesterol, rat, mikroarray, *Nerium oleander, zakkum*

ABSTRACT

MS THESIS

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF *NERİUM OLEANDER* DITILLATE ON GENE EXPRESSION LEVEL IN THE LIVER OF RATS FED WITH HIGH CHOLESTEROL DIET USING MICROARRAY METHOD

Burcu Asena ODABAŞI

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOLOGY

Advisor: Assist. Prof. Dr. Gökhan KARS

2013, 98 Pages

Jury
Yrd. Doç. Dr. Gökhan KARS
Doç. Dr. Emine ARSLAN
Prof. Dr. A. Levent BAŞ

In humans, cholesterol is synthesized by all cells except red blood cells, a significant amount of the biological molecule and is controlled by a variety of mechanisms. In this study, high-cholesterol diet and cholesterol are thought to influence the level of gene expression in the liver of rats Nerium oleander (NO, zakkum) effect of distillate obtained from the leaves was investigated by microarray technology. In this study, the normal diet group (ND), cholesterol diet group (KD) and oleander Distillate and cholesterol in your diet combined group (ZKD) group of rats were used in three different. These diets of rats were sacrificed and liver tissues after the application is provided as a ready. Toxicological and metabolic pathways that occur in liver tissue is associated with the expression of genes using Affymetrix GeneChip ® Rat Genome 230 2.0 array chip, and then were analyzed by Affymetrix® Arrays Partek® Genomics Suite™ 6.6 program.

According to the results, high-fat diet led to changes in levels of expression of the gene rat liver 3000. In addition, CYP39A1, SOAT1, SC4MOL gene expression changes in 46 genes related to the metabolism of cholesterol were. In addition, CYP39A1, SOAT1, SC4MOL gene expression changes in 46 genes related to the metabolism of cholesterol were determined. Increasing or decreasing the levels of expression of certain genes in the KD group, along with high-fat diet, and Nerium oleander distillate the ZKD group is closer to the normal diet of group ND was applied. The findings lowering effect of Nerium oleander distillation is a food with high fat diet may indicate additional item.

Keywords: Cholesterol, rat, microarray, *Nerium oleander, nerium*

ÖNSÖZ

Kolesterol vücut için gerekli bir madde olmasına rağmen, yüksek oranda bulunması vücutta ciddi rahatsızlıklarla yol açmaktadır. Kanda aşırı miktarda bulunan kolesterol, yavaş yavaş damar duvarında birikmektedir ve bu birikim sonucu o damarda daralma, tıkanma ortaya çıkmaktadır. Kolesterol hangi damarda birikmişse, o damarla ilişkili sorunlar ve hastalıklar görülmektedir. Yüksek kolesterolü düşürmek amaçlı kullanılan ilaçların başında statinler gelmektedir. Statinlerin başta böbrek ve karaciğer yetmezliği gibi yan etkileri bulunmakta ve bu sebeple kolesterol düşürücü etkisine sahip yeni etken maddeler araştırılmaktadır. Bu amaçla, *Nerium oleander'*in lipit düşürücü etkisi göz önünde bulundurularak, yüksek kolesterol tedavisi için yeni bir gıda ek maddesi olabilir.

Tezimin her aşamasında benden bilgilerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Gökhan Kars'a ve Yrd. Doç. Dr. Meltem Demirel Kars'a, rat karaciğer dokularını sağlayan Prof. Dr. Ahmet Levent Baş'a, tez projemi destekleyerek gerekli maddi olanağı sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne, desteklerini benden esirgemeyen anneannem, dedem, annem Rahime Carı ve eşim Ahmet Suat Odabaşı'na teşekkürlerimi sunarım.

Burcu Asena ODABAŞI

KONYA-2013

İÇİNDEKİLER

TEZ BİLDİRİMİ iii

ÖZET iv

ABSTRACT v

İÇİNDEKİLER vii

1. GİRİŞ 1

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 4

2.1. KOLESTEROL 4
2.1.1 Kolesterol Metabolizması 8
2.1.2. Kolesterol ve Kalp Damar Hastalıkları 14
2.1.2.1. Hiperlipidemiler 14
2.1.3. Statinler 16
2.1.3.1. Statinlerin kimyası ve fonksiyonel özellikleri 17
2.2. *Nerium oleander* 18
2.3. MİKROARRAY TEKNOLOJİSİ 23
2.3.1. Mikroarray Teknolojisi Nedir? 23
2.3.2. Mikroarray Teknolojisinin Gelişimi 24
2.3.3. Mikroarray Üretim Teknikleri 25
2.3.3.1. Fotolitografik maskeleme yöntemi 25
2.3.3.2. Yüzey temaslı spotlama yöntemi 26
2.3.3.3. Püskürtme yöntemi 26
2.3.4. Mikroarray Teknolojisinin Kullanım Alanları 26
2.3.4.1. SNP analizinde kullanımı 26
2.3.4.2. Array – karşılaştırmalı genomik hibridizasyon 27
2.3.4.3. DNA metilasyonu tespitinde kullanımı 28
2.3.4.4. Organizmaların identifikasyonunda kullanımı 29
2.3.4.5. Protein mikroarray 29
2.3.4.6. Ekspresyon analizi ve mikroarray teknolojisi 30
2.3.4.6.1. Ekspresyon analizinin basamakları 31
2.3.4.6.1.1. Mikroarray platformunun temini 31
2.3.4.6.1.2. RNA ekstraksiyonu 33
2.3.4.6.1.3. İşaretli cDNA hazırlanması 33
2.3.4.6.1.4. cDNA ile mikroarray platformunun hibridizasyonu ve yıkama 33
2.3.4.6.1.5. Cihazda tarama ve hibridizasyon varlığının gösterilmesi 34
2.3.4.6.1.6. Verilerin yazılım aracılığıyla analizi 35
2.3.5. Toksikogenomik 36
2.3.5.1. Toksikogenomik araştırmalarda mikroarray teknolojisinin kullanımı 36
2.3.6. Farmakogenomik 38
2.3.6.1. Farmakogenomik araştırmalarda mikroarray teknolojisinin kullanımı 38

3. MATERYAL VE YÖNTEM 40

3.1. Hayvan Ve Doku Materyali 40
3.1.1 Serum lipid düzeylerinin belirlenmesi 41

3.2. RNA İzolasyonunda Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması 42
3.3. Dokulardan RNA İzolasyonu 42
3.4. RNA Kalitesinin Ve Miktarının Belirlenmesi.....44
3.4.1. Spektrofotometrik Ölçümler.....44
3.4.2. Elektroforez 45
3.4.2.1. Jel hazırlanması.....45
3.4.2.2. RNA Örneklerinin Agaroz Jele Yüklenmesi 45
3.5. Gen Ekspresyon Analizleri İçin Mikroarray Çiplerinin Seçilmesi.....46
3.6. RNA Amplifikasyon Aşamaları 48
3.7. Mikroarray Analiz Çalışması 51
3.7.1. Array Verilerinin Programa Aktarılması Ve Kalite Kontrol.....51
3.7.2. Örnek Gruplarının Belirlenmesi 53
3.7.3. Veri Analizinin Uygulaması.....53
3.7.4. ANOVA (Analysis Of Variance) Kullanılarak Gen Ekspresyon Değişimlerindeki Anlamlı Farklılıklarının Belirlenmesi.....55
3.7.5. Gen listelerinin oluşturulması.....58

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....60

4.1. Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları.....60
4.2. Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü 61
4.3. Mikroarray Sonuçları.....62

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 86

KAYNAKLAR 87

ÖZGEÇMİŞ.....98

SİMGELER KISALTMALAR

C	**:** Karbon
OH	**:** Hidroksil
YA	**:** Yağ asidi
mg	**:** Miligram
dL	**:** Desilitre
ml	**:** Mililitre
CM	**:** Şilomikron
ApoA-I	**:** Apolipoprotein-A1
ApoA-II	**:** Apolipoprotein-A2
ER	**:** Endoplazmik retikulum
NADPH	**:** Nikotin amid adenin dinükleotid fosfat
CO_2	**:** Karbon dioksit
HMGR	**:** 3-hidroksi-3 metilglutaril redüktaz
A. B. D.	**:** Amerika Birleşik Devletleri
Apo-B	**:** Apolipoprotein-B
SREBP	**:** Sterol düzenleyici hormon
CYP450	**:** Sitokrom P450
h	**:** Saat (hour)
FITC-insulin	**:** Fluorescein isothiocyanate-insulin
ng	**:** Nanogram
ICAM-1	**:** Hücre içi adezyon molekülü
TPA	**:** 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
PCR	**:** Polimeraz zincir tepkimesi (Polymerase Chain Reaction)
UV	**:** Ultraviyole
SNP	**:** Tek nükleotid polimorfizmi
CGH	**:** Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon
HELP	**:** HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR
ChIP	**:** Kromatin immunopresipitasyonu
MPID	**:** Multi-Pathogen Identification

cy3 : Siyanin 3

cy5 : Siyanin 5

dT : Deokaitimin

DNB : 1,3-dinitrobenzen

INH : İzoniazid

RNA : Ribonükleik asit

DNA : Deoksiribonükleik asit

cDNA : Komplementer (tamamlayıcı) DNA

OD : Optik dansite

µg : Mikrogram

NO : *Nerium oleander*

mRNA : Mesajcı RNA

KD : Kolesterol diyeti

ND : Normal diyeti

ZKD : Zakkum distilatı eklenmiş kolesterol diyet

DMAPP : Dimetil alil difosfat

HMG-KoA : 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA

BLBP : Beyin yağ bağlama proteini

SMO : Sterol-C4-metil oksidaz

ATP : Adenozin trifosfat

FFA : Serbest yağ asidi

HGA : İnsan büyüme hormonu

LDL-C : LDL-Kolesterol

LDLR : Low-density lipoprotein reseptör

LDL : Low-density lipoprotein

L-FABP : Karaciğer tipi yağ bağlanma proteini

FHA : Familial Hypoalphalipoproteinemia

KE : Kolesteril ester

HDL : Yüksek yoğunluklu lipoprotein

VLDL : Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

LCAT : Lesitin kolesterol asil transferaz

CLA : Conjugated linoleic asid

DEHP : Di-2-etilheksil-ftalat

Apo-E : Apolipoprotein-E
FSH : Folikül uyarıcı hormon
CERP : Cholesterol efflux regulatory protein
HDL-K : HDL-Kolesterol
GP1 : Glikozil-fosfatidil inosilat
TNF : Tumor necrosis factor
TRAIL : Tumor necrosis factor-related apoptosis-incuding ligand
AKT1 : Serine-threonine kinaz
ACC : Asetil-KoA karboksilaz
E-FABP : Epidermal yağ asidi bağlanma proteini
TRAP : Tartarat dirençli asit fosfataz
RCT : Reverse cholesterol transport
Apo-CII : Apolipoprotein-CII
Apo-CIII : Apolipoprotein-CIII
RCT : Ters kolesterol transportu (Reverse cholesterol transport)
ApoB-100 : Apolipoprotein-B100
W.H.O. : Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
PP : Pirofosfat
FISH : Fluoresan in situ hibridizasyon
rpoB : RNA polymerase subunit beta
rRNA : Ribozomal RNA
kcal : Kilo kalori
kg : Kilo gram
Ca : Kalsiyum
P : Fosfat
NaCl : Sodyum klorür
gr : Gram
ml : Mili litre
µl : Mikro litre
rpm : Revolutions per minute
dk : Dakika
DEPC : Dietil pirokarbonat
DMSO : Dimethyl sulfoxide

BSA : Bovine serum albumin

DTT : Dithiothreitol

dNTP : Deoxyribonucleotide triphosphate

RNase : Ribonuclease

DI water : Distilled water

mAmper : Miliamper

EtBr : Etidyum Bromür

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

MW : Megawatt

dH_2O : Distile su

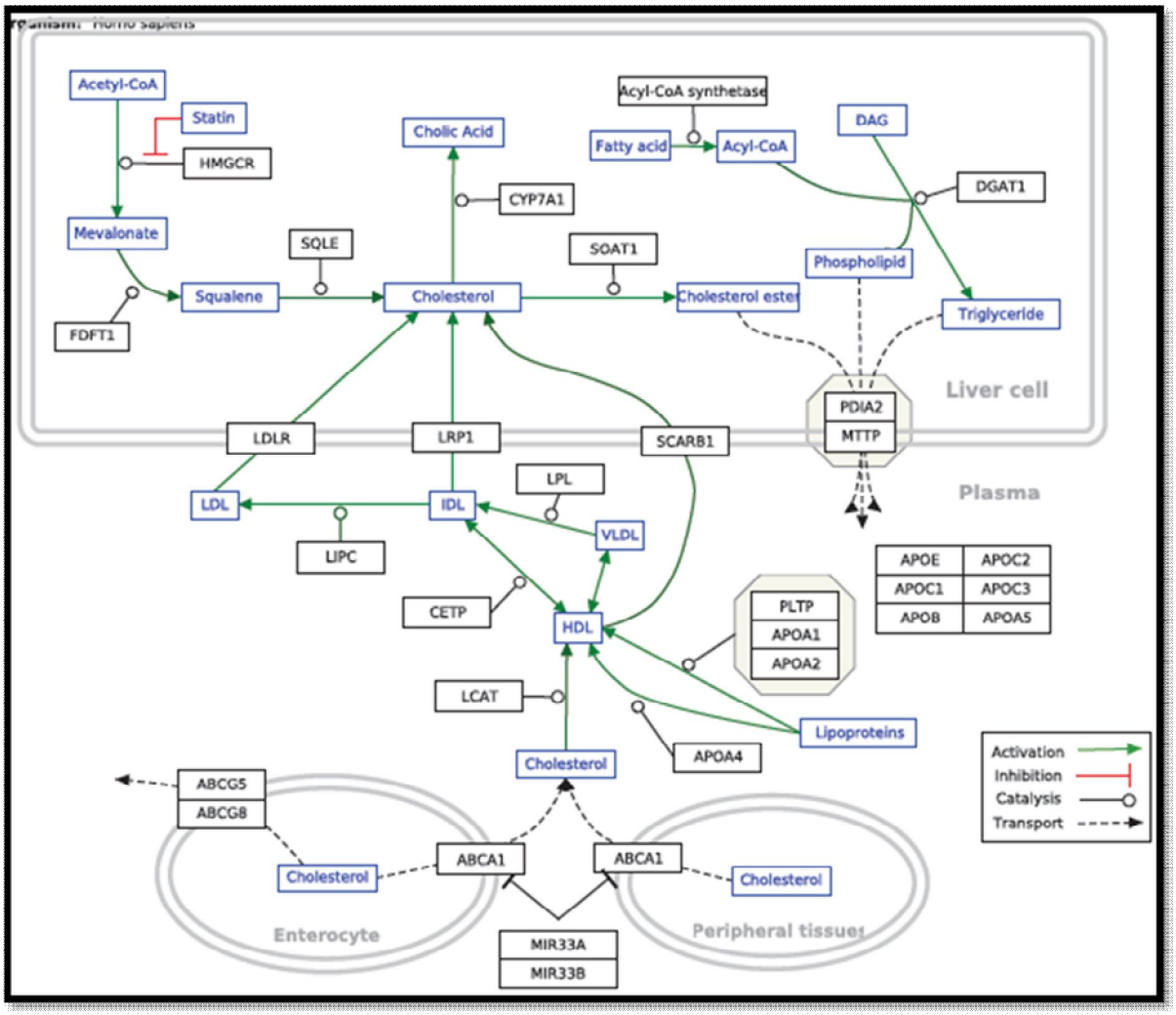
NaOH : Sodyum hidroksil

TAE : Tris Asetat EDTA

1. GİRİŞ

Kolesterol, beyin, sinirler, kalp, bağırsaklar, kaslar, karaciğer başta olmak üzere tüm vücutta yaygın olarak bulunan ve bazı hormonların, D vitamininin ve yağları sindiren safra asitlerinin üretiminde kullanılan bir steroldür. Lipitlerin ayrı ve özelleşmiş bir tipi olan kolesterol, yaşam için mutlaka gerekli olan bir maddedir (Tok, 2007). Vücuttaki kolesterolün yarıdan fazlası sentezle, geri kalanı ise diyetten sağlanır.

Kolesterol sentezinin ön maddesi Asetil-KoA olup, sentez mevalonik asit ve skualen üzerinden yürür. Kolesterol biyosentezinde, sentez ve düzenleme için pek çok enzim ve protein görev almaktadır (Şekil 1). HMG-KoA (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA) sentaz enzimi, kolesterol sentezi için bir öncüdür. Bu enzim, izoprenoid/mevalonat sentezinin ilk basamağını katalizler.



Şekil 1. Kolesterol metabolizması (Anonymous, 2011)

Kolesterol bütün hücre zarlarının bir bileşenidir ve safra tuzları, steroid hormonlar ve D vitamininin öncül maddesidir. Vücudun belli başlı dokularında sürekli kolesterol sağlanması önemlidir. Kolesterol sentezi ve kullanımı vücutta tam olarak düzenlenmektedir. Bu şekilde aşırı birikimi ve depolanması önlenmektedir. Kolesterolün damar çeperinde anormal depolanması klinik önem taşımaktadır. Kolesterolün aşırı birikimi, karaciğerde sentezi azaltılarak önlenebilmektedir. Bu amaçla, kolesterol sentez inhibitörü olan statinler kullanılmaktadır (Aktürk, 2006). Statinler karaciğerde kolesterol sentezini durdurarak kan kolesterol düzeyini değiştirirler (Aktürk, 2006). Kolesterolü kontrol altına almak için kullanılan tıbbi kaynakların yanı sıra, kullanılan geleneksel bitki tedavilerinin bir kısmı bilimsel

çevrelerce dikkate alınmakta ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bu alandaki çalışmaları desteklemektedir.

Zambakgiller (*Apocynaceae*) familyasında yer alan zakkum (lat. *Nerium oleander*, NO), çok eski yıllardan beri zehirli olduğu bilinen ve halk arasında değişik kanser türleri, astım gibi pek çok hastalıkta kullanılan bir bitkidir. NO yapraklarının farmakolojik etkileri bulunmaktadır.

Önceden devam eden bir çalışmada, ratlarda bir gruba yüksek yağlı diyet uygulanmış, bir gruba yüksek yağlı diyet ile birlikte *Nerium oleander* (zakkum) distilatı uygulanmıştır. Bir gruba da normal diyet uygulanmıştır (kontrol grubu). Yapılan biyokimyasal testlerde yüksek yağlı diyet ile birlikte *Nerium oleander* (zakkum) distilatı uygulanmış ratların kolesterol seviyelerinde önemli düşüşler olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada da bu ratlardan alınan karaciğer dokularındaki genlerin gen ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler mikroarray teknolojisi ile incelenmiştir. Bu analizler sonucunda *Nerium oleander* yaprağından elde edilmiş olan distilatın kolesterol metabolizmasındaki genlerin ifadelerine etkisi belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen genetik analizler önceden yapılan çalışmaları aydınlatıcı ve tamamlayıcı niteliktedir. Bu çalışma ile bitki özütünün (*Nerium oleander*) temin edilen karaciğer dokusundaki etki mekanizmaları, kolesterol biyosentez regülasyonu, Affymetrix GeneChip Rat Genome Array ve biyoinformatik bazlı analiz programı (Partek, PGS 6.6) kullanarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmda, yüksek yağlı diyetin ve bu diyet ile birlikte uygulanan bitki özütünün karaciğer dokusunda gen ekspresyon düzeyinde meydana getirdiği değişimi belirlemek ve toksikogenomik analizlerle pek çok metabolik yoldaki etkisini görmek amaçlanmıştır.

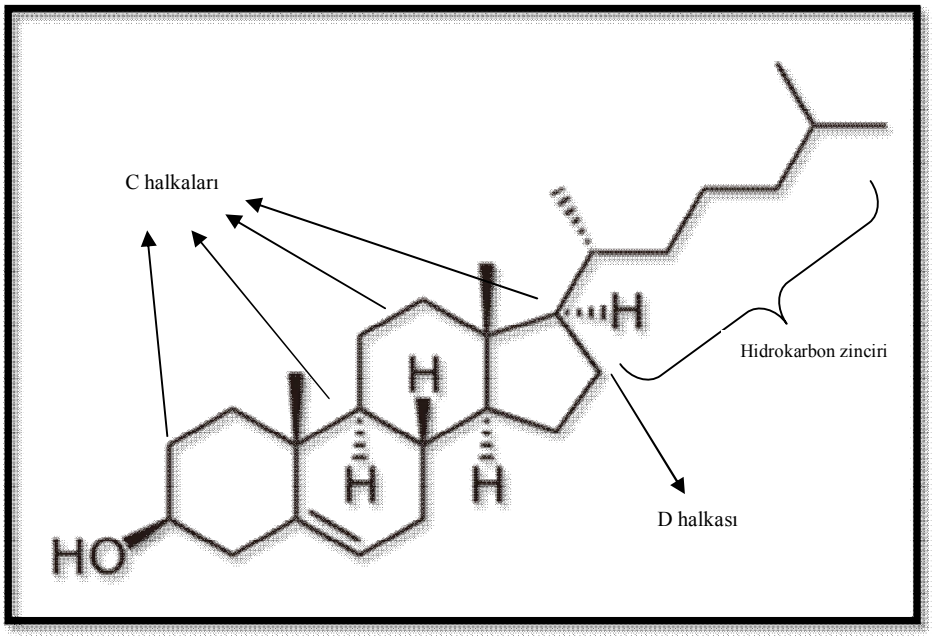
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. KOLESTEROL

Fransız kimyacı M.E. Chevreul tarafından 1815 yılında bulunan kolesterolün yapısının ve biyosentez yollarının açıklanması günümüze kadar devam etmiştir. 20. yy başlarında kolesterol izole edilmiş ve kısmen tanımlanmıştır. Ancak yapısı hakkında yeterli bilgi elde edilememiştir. Bundan sonraki yüzyılda kolesterolün yapısı ve metabolizmasını düzenleyen mekanizma açıklanmış, biyosentez yolları bulunmuştur (Vance ve Vanden, 2000).

Doğada hayvansal organizma ve yağlı tohumlarda serbest veya esterleşmiş halde bulunan ve bir alkoloid olan steroller, hayvanlarda zoosterol, bitkilerde fitosterol adını alır. Zoosterollerin en önemlisi kolesteroldür ve sütte de doğal olarak bulunur. Kolesterol hayvansal yağlarda serbest ve uzun zincirli yağ asitleri ile esterleşmiş haldedir.

Kolesterol yapısında dört tane karbon (C) halkası birleşerek steroid çekirdeğini oluşturur. D halkasına bağlı olarak da 8'li dallı bir hidrokarbon zinciri bulunur. Yan zinciri 8-10 C atomludur ve 3. C'unda bir -OH bulunur (Şekil 2.1.1). Oldukça hidrofobiktir. Plazma kolesterolünün çoğu 3. C'da bir YA (yağ asidi) ile esterleşmis durumdadır.



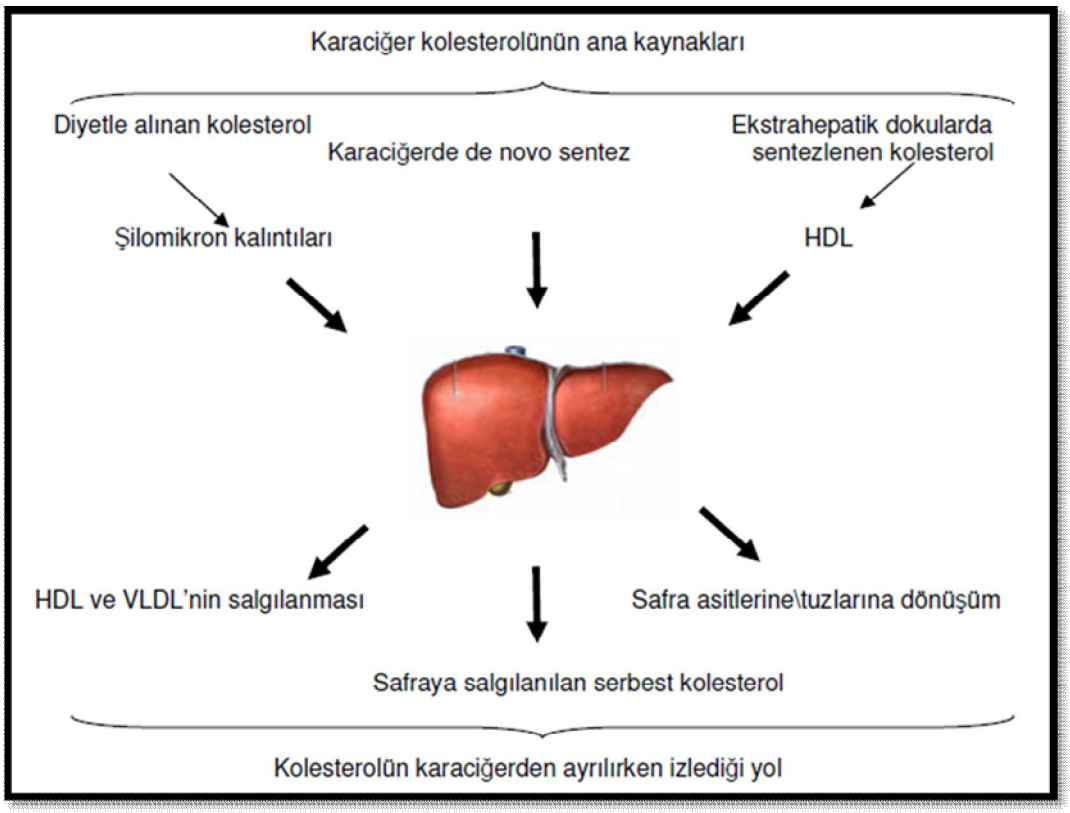
Şekil 2.1.1 Kolesterolün yapısı

Kolesterolün molekül ağırlığı 386,64 gram/mol kapalı formülü cholest-5-n-3β-ol-$C_{27}H_{46}O$, erime noktası 149 °C'dir. Kolesterol, beyin, sinirler, kalp, bağırsaklar, kaslar, karaciğer başta olmak üzere tüm vücutta yaygın olarak bulunan ve bazı hormonları, D vitamini ve yağları sindiren safra asitlerinin üretiminde kullanılan bir steroldür. Lipitlerin ayrı ve özelleşmiş bir tipi olan kolesterol, yaşam için mutlaka gerekli olan bir maddedir (Tok ve Aslım, 2007). İnsanlarda, hemen hemen tüm dokularda sentezlenmekle birlikte karaciğer, bağırsak, adrenal korteks, over ve testiste en yüksek düzeydedir. Vücuttaki kolesterolün yarıdan fazlası sentezle, geri kalanı ise diyetten sağlanır. İnsanda günlük kolesterol sentezinin yaklaşık olarak %10'u karaciğerde, %15'i ise bağırsaklarda gerçekleşir (Hişmioğulları, 2006). Kolesterol sentezi, hem sitozol hem de endoplazmik retikulumda (ER) bulunan enzimlerle birlikte meydana gelir.

Vücudun belli başlı dokularına sürekli kolesterol sağlanması önemlidir. Bu gereksinimi karşılamak üzere bir seri kompleks taşıma, biyosentetik ve düzenleyici mekanizmalar gelişmiştir. Karaciğer, vücudun kolesterol dengesinin düzenlenmesinde merkezi bir role sahiptir (Champe ve Harvey, 1997).

Kolesterol karaciğerdeki kolesterol havuzuna bazı kaynaklardan gelir. Bunlar; diyetle alınan kolesterol, ekstra-hepatik dokularda sentezlenen kolesterol ve karaciğerde

de novo sentez sonucu oluşan kolesteroldür. Kolesterol esasen, karaciğer ve bağırsaklarda, yağ, protein ve karbonhidrattan sentezlenir (Tok, 2007). Karaciğer kolesterolünün kaynakları ve kolesterolün karaciğerden ayrılma yolları Şekil 2.1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1.2. Karaciğer kolesterolünün kaynakları ve kolesterolün karaciğerden ayrılma yolları (Champe ve Harvey, 1997)

Gıdalarla alınan kolesterol miktarı, vücutta sentezlenen miktarın %20'si kadardır. Gıdalarla alınan kolesterol ya serbest halde ya da yağ asitleri ile esterleşmiş haldedir. Esterleşmiş kolesterol ince bağırsak lümeninde pankreatik kolesterol esteraz enzimi tarafından hidroliz edilir, serbest kolesterol ve yağ asitlerine parçalanır. Serbest kolesterol ince bağırsak tarafından emilir (Seçkin ve Metin, 2003).

Vücutta sentezlenen kolesterol ile beslenme yolu ile alınan kolesterol arasında bir denge vardır. Bu denge organizma tarafından ayarlanır. Eğer gıda ile alınan kolesterol miktarı artarsa vücutta sentezlenen kolesterol miktarı azalır, böylece denge

korunur. Hasta kişilerde ise karaciğerin kontrol sistemi bozulmuştur. Kandaki kolesterol seviyesini, sadece diyet değil, aynı zamanda vücutta üretilen kolesterol de etkiler (Metin, 1998). Diyetle alınan doymuş yağlar ve kolesterol kan kolesterol düzeyinin artmasına neden olur. Ulusal Kolesterol Eğitim Programı insanda bulunacak kolesterol durumlarını sınıflandırılmıştır (Çizelge 2.1.1).

Çizelge 2.1.1. Vücutta bulunacak kolesterol durumları (Öner, 2004)

160-200 mg/dL Toplam Kolesterol	İstenen miktar
200-239 mg/dL Toplam Kolesterol	Şüpheli, yüksek
240 mg/dL – veya yukarı Toplam Kolesterol	Yüksek
HDL Seviyesi	40 mg/dL yukarı
LDL Seviyesi	100 ml/dL veya aşağı olmalıdır

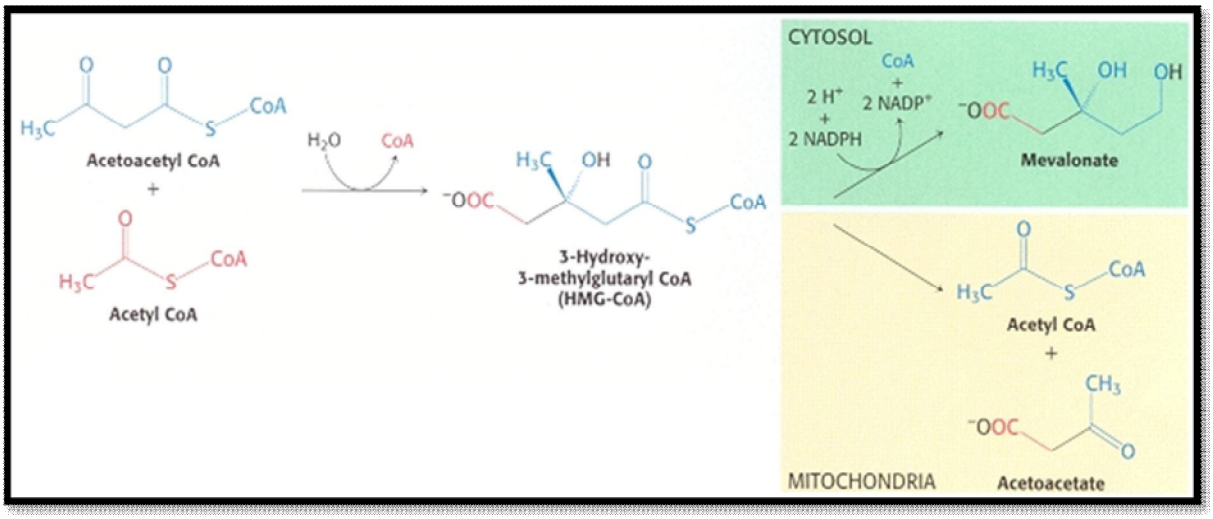
Kolesterol kanda lipoproteinler vasıtası ile taşınır (Anar, 1998). Plazma lipoproteinleri apolipoproteinler olarak adlandırılan özgün proteinler ve lipidlerin moleküler kompleksleridir. Lipoprotein partükülleri şunlardır: Şilomikronlar (CM) , çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL), düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) , yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL).

Şilomikronlar, lipoproteinlerin en büyükleri ve dansitesi en küçük olanlarıdır; yüksek oranda trigliserid içerirler. Şilomikronlar, ince bağırsak epitel hücrelerinin düz endoplazmik retikulumunda sentezlenirler; sonra lenfatik sisteme geçerler, daha sonra juguler (boğaz) venden kan dolaşımına katılırlar. Şilomikronlar, diyetteki trigliseridlerin (kolesterol dahil) ince bağırsaktan diğer dokulara taşınması ile ilişkilidirler. VLDL'ler endojen trigliserid bakımından oldukça zengindir. Diyet yakıt olarak gerekenden daha fazla yağ asidi içerirse, yağ asitleri karaciğerde trigliserid haline dönüştürülürler; oluşan endojen trigliseridler VLDL'lerin yapısına katılır. VLDL, karaciğerde sentezlenen trigliserid ve kolesterolü ekstrahepatik dokulara taşır. LDL'ler VLDL artığı olarak damar içinde sentezlenir. LDL'ler, trigliserid içerikleri çok az, kolesterol ve kolesterol esterlerinden zengin lipoproteinlerdir. LDL partüküllerinin ana işlevi periferik dokulara kolesterol sağlamaktır. Bunu hem hücre yüzeyine temas ettiklerinde hücrelerin

membranları üzerine serbest kolesterolü bırakarak hem de apolipoprotein B- 100' ü (ApoB-100) tanıyan hücre zarlarındaki reseptörlere bağlanarak yaparlar (Tokullugil ve ark., 1997). HDL'ler, karaciğerde ve ince bağırsak duvarında sentezlenirler. Karaciğerde ve ince bağırsak duvarında sentezlenen HDL, diskoidal şekillidir; ApoA-I (apolipoprotein A-I), ApoA-II (apolipoprotein A-II), lesitin ve serbest kolesterol içerir. Yeni sentezlenen ve kan dolaşımına bırakılan HDL, dolaşımdaki diğer lipoproteinlerden kolesterol esterlerini toplar ve küre şekilli olgun HDL şekline dönüşür. Kolesterol yönünden zenginleşen HDL, karaciğere dönünce kolesterolü bırakır; böylece HDL, kolesterolü dokulardan karaciğere taşımış olur. Araştırmacıların bir kısmı HDL' nin kolesterolü arterlerden uzaklaştırıp karaciğere taşıdığını, bir kısmı da HDL'nin aşırı kolesterolü aterosiklerotik plaklardan uzaklaştırdığını ve böylece plak oluşumunu engellediğini ileri sürmektedir. Bu nedenle HDL "iyi kolesterol " olarak bilinir (Anar, 1998).

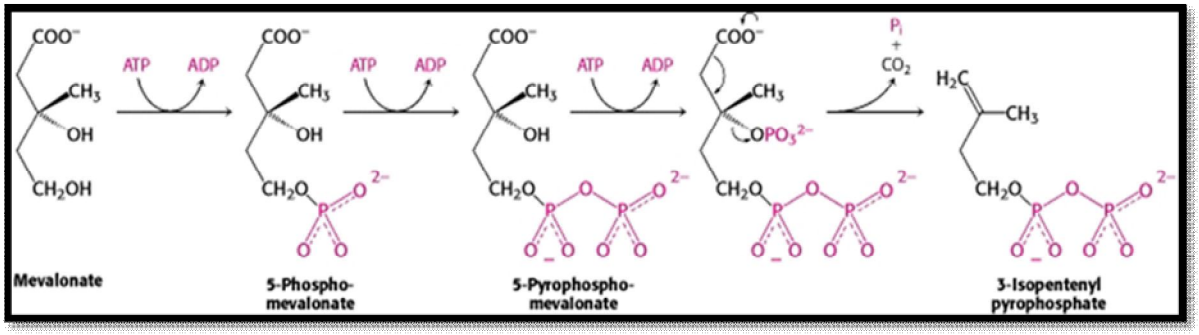
2.1.1 Kolesterol Metabolizması

Kolesteroldeki tüm karbonlar (27 Karbon) asetil KoA'dan gelir. NADPH (nikotin amid adenin dinükleotit fosfat) biyosentezde indirgeyicidir. Sentez hem sitozol hem de ER'da bulunan enzimlerle beraber mitokondride gerçekleşir. Başlangıçta bir mol asetoasetil-CoA'dan HMG-CoA oluşur. Daha sonra HMG-CoA, HMG-CoA redüktaz (HMGR) enzimin ve NADPH'ın etkisiyle, mevalonik asit (3,5-dihidroksi-3-metilvalerik asit)'e indirgenir. Mevalonat oluşumu sitozolde gerçekleşir (Berg ve ark., 2002) (Şekil 2.1.1.1).



Şekil 2.1.1.1. Asetil CoA'dan mevalonat oluşumu (Berg ve ark., 2002)

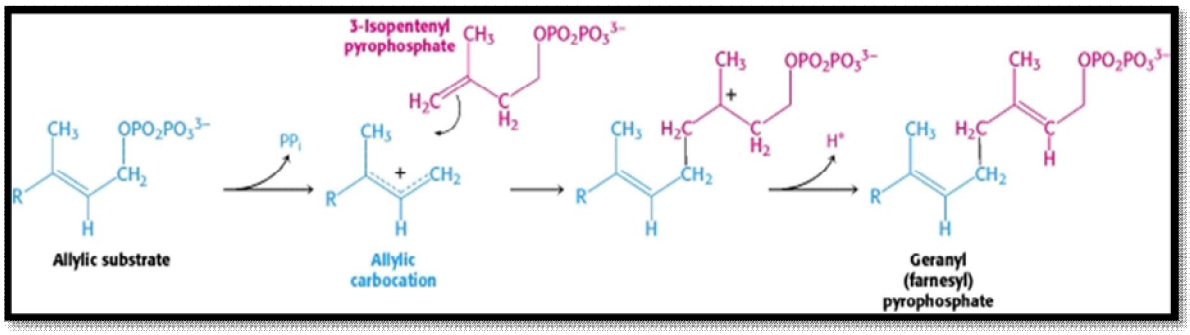
Mevalonat üç ayrı kinaz (mevalonat kinaz, fosfomevalonat kinaz, pirofosfomevalonat kinaz) tarafından fosforile edilerek 3-fosfo-5-pirofosfa mevalonatı oluşturur. Yapıdan üç fosfat ve bir CO_2 (karbon dioksit) ayrılması ile de izopentenil pirofosfat oluşur (Şekil 2.1.1.2).



Şekil 2.1.1.2. Mevalonattan izopenteril pirofosfat oluşumu (Berg ve ark., 2002)

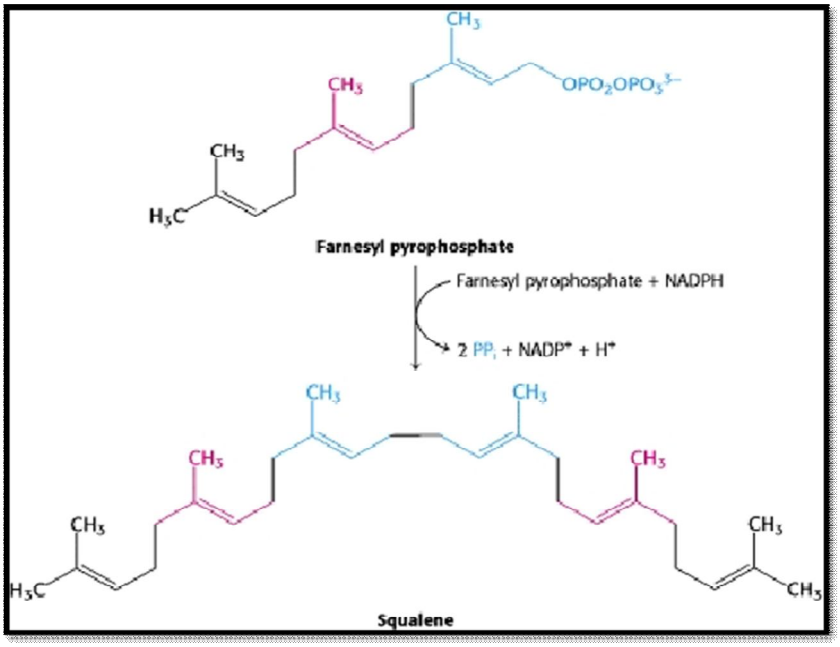
İzopentenil pirofosfat izomeraz enzimi ile dimetil allil pirofosfata izomerize edilir. Ardından prenil transferi gerçekleşir. Bu transfer için izopenterilpirofosfat ve dimetilallil pirofosfatın ortamda dengeli karışım oluşturmaları gereklidir. Prenil transferaz enzimi izopenteril pirofosfat'ın 4-dimetilallil pirofosfat 1. karbonları ile kondenzasyonunu sağlayarak geranilpirofosfat oluşturur. Bir diğer prenil molekülü

zincire katılarak karbon zinciri uzar ve farsenil (geranil) pirofosfat meydana gelir (Şekil 2.1.1.3).



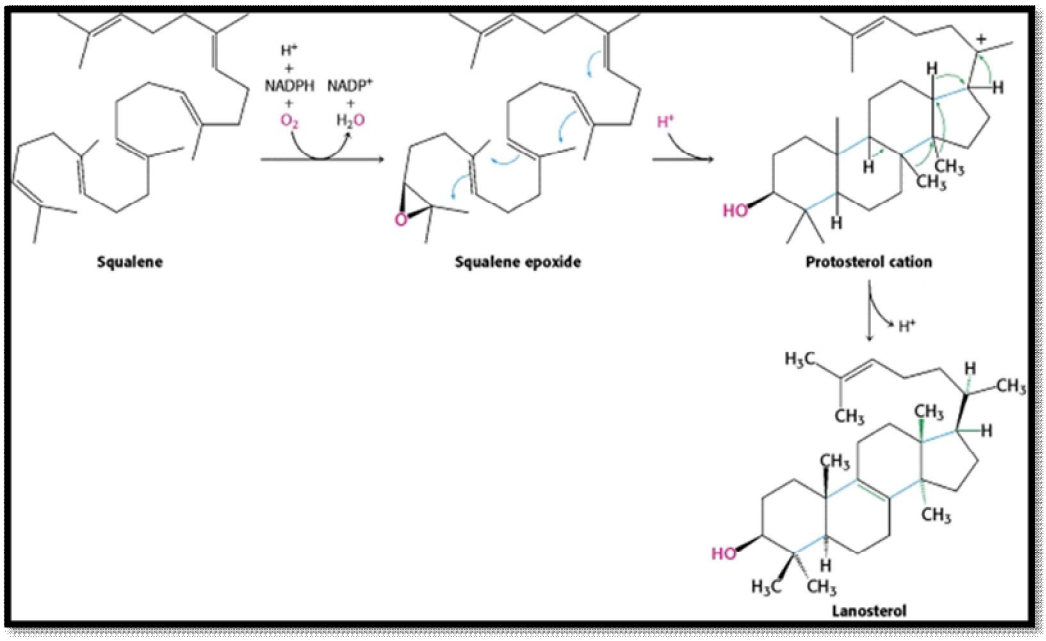
Şekil 2.1.1.3. İzopentenil pirofosfattan farnesil oluşumu (Berg ve ark., 2002)

Daha sonra iki molekül farnesil pirofosfat skualene dönüşür. Reaksiyonda iki mol pirofosfat serbest hale geçer. Bir numaralı karbon indirgenir ve bu reaksiyon için NADPH gereklidir (Şekil 2.1.1.4).



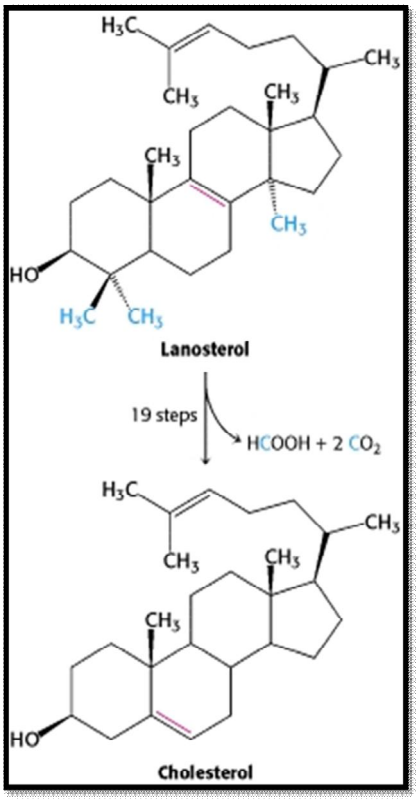
Şekil 2.1.1.4. Farnesil pirofosfattan skualen oluşumu (Berg ve ark., 2002)

Skualenden, skualenin hidroksilasyonu ve halka kapanması reaksiyonlarından sonra, lanosterol oluşur (Şekil 2.1.1.5).



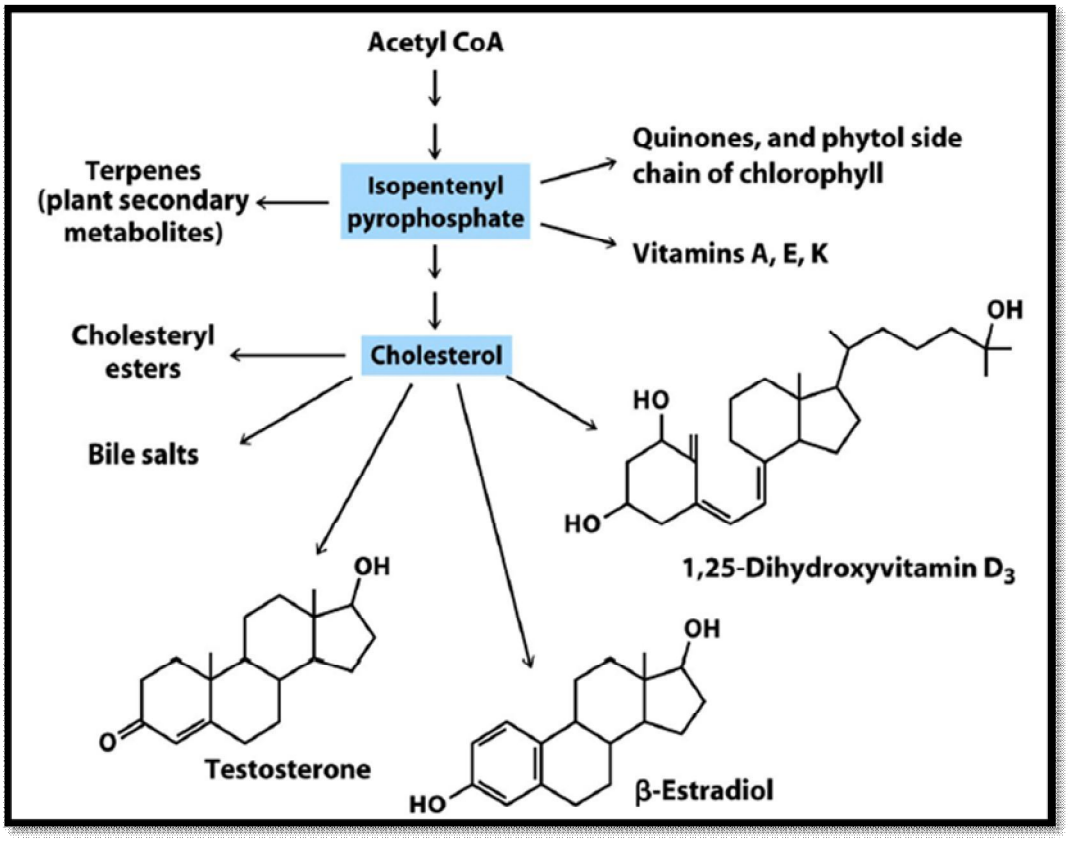
Şekil 2.1.1.5. Skualenden lanosterol oluşumu (Berg ve ark. 2002)

Lanosterolün kolesterole dönüşümüne kadar yaklaşık 19 reaksiyonun olduğu bildirilmektedir (Berg ve ark., 2002). Lanosterolden 3 adet metil grubunun CO_2 şeklinde ayrılması ile kolesterol oluşur (Şekil 2.1.1.6).



Şekil 2.1.1.6. Lanosterolden kolesterol oluşumu

Kolesterol karaciğerden özellikle safra ile salgılanır, bağırsaklara geçer ve emilir. Emilen kolesterol lenf ve kan yolu üzerinden karaciğere gelir ve tekrar safra ile salgılanır. Yani kolesterol entero-hepatik dolaşıma uğramaktadır. Kolesterol sentezi ara ürünlerinden olan isopentenil pirofosfat terpenler, kolesterol ve kolesterol esterleri, vitamin A, E ve K, testesteron, yağ asitleri gibi birçok maddenin öncüsüdür (Şekil 2.1.1.7).



Şekil 2.1.1.7. İzopentenil pirofosfatın öncü olduğu maddeler

Kolesterol sentezinin hızı diyetle alınan kolesterol miktarıyla düzenlenir. Diyet ve sentezden gelen kolesterol hücre zarı yapımında ve steroid hormonların ve safra asitlerinin yapımında kullanılır. Kolesterol hücresel kaynağı üç mekanizma ile sağlanır:

1. HMGR aktivitesi ve düzeylerinin regülasyonu

2. Hücre içi serbest kolesterol fazlasının regülasyonu

3. Plazma kolesterol düzeylerinin LDL reseptör-aracılı alım ve HDL-aracılı zıt transport yoluyla regülasyonu

Kolesterol, HMGR'nin bir feed-back inhibitörü olarak etkir. HMGR aktivitesi üzerinde insülinin uyarıcı, glukagonun inhibe edici etkisi bu hormonların diğer metabolik geçitleri üzerinedir. Kolesterol düzeyinin yükselmesi HMGR geninin ekspresyon düzeyini düşürür. Tersine, düşük kolesterol düzeyleri genin ekspresyonunu

arttırır. İnsülin, HMGR sentezini arttırmak suretiyle kolesterol metabolizmasını uzun vadeli regüle eder.

2.1.2. Kolesterol ve Kalp Damar Hastalıkları

Dünya Sağlık Örgütü (W.H.O) kalp ve damar hastalıklarının insan hayatını tehdit eden hastalıklar arasında birinci sırada yer aldığını bildirmiştir. Kalp ve damar hastalıkları; Türkiye'de de ölüm ve kalıcı sakatlıklara yol açan ve giderek artan en önemli sorunlardan birisidir. Kalp ve damar hastalıklarına neden olan faktörlere kardiyovasküler risk faktörleri adı verilir. Kanda total kolesterol ve LDL-Kolesterolün (LDL-K) yüksek olması ve HDL-Kolesterolün (HDL-K) düşük olması önemli birer kardiyovasküler risk faktörüdür.

Türkiye'de 6 milyon kişide kan kolesterol düzeyi sınırda yüksek (200-239 mg/dl) ve 2 milyon kişide de yüksek (240 mg/dl) olarak bulunmuştur. Total kolesterol 240 mg/dl üzerinde olanların kalp hastalığı riski 200 mg/dl altında olanlara göre iki kat daha Açlık kan yağlarının (kolesterol, trigliserid gibi) yüksek olmasına hiperlipidemi adı verilir. Kan lipidlerinin normal sınırlarda olmasına normolipidemi, normal sınırların altında olmasına hipolipidemi denir.

2.1.2.1. Hiperlipidemiler

1. Tip I hiperlipoproteinemi (hiperşilomikronemi)

Hiperşilomikronemi serum gliserit seviyesindeki yükselme ile beraber olup, santrifüj edilen kan örneğinde tüpün en üstünde krem şeklinde bir tabaka oluşturması ile kolayca teşhis edilir. Trigliseritlerin hidrolizinden sorumlu olan lipoprotein lipazın inaktive olması, sindirilmiş yağların dolaşımdan eliminasyonunu engeller (Satar, 1996).

2. Tip IIa hiperlipoproteinemi (familyal hiperkolesterolemi)

Beta lipoprotein, özellikle kolesterol artışı ile karakterizedir (Satar, 1996). Plazmada şilomikron görülmezken trigliserid normal, kolesterol artmıştır. LDL-K artmıştır. LDL karaciğer tarafından alınmadığı için, fazla LDL özellikle makrofajlar tarafından alınır; bu da aterosikleroza neden olur.

3. Tip IIb hiperlipoproteinemi (familyal kombine hiperlipidemi)

Trigliserid, total kolesterol, LDL-K ve VLDL yüksektir. Koroner kalp hastalığı riski çok yüksektir ve 25-40 yaşlarında başlar. Koroner arter hastalığı olanların yaklaşık %30'unda bu lipoprotein metabolizma bozukluğu olduğu iddia edilir (Stavropoulos ve Crouch, 1974).

4. Tip III hiperlipoproteinemi (mikst hiperlipidemi, dis-beta lipoproteinemi)

Serum trigliserit ve VLDL seviyesinde artma sözkonusudur. Kolesterol seviyesinde de artış gözlenir. Betalipoprotein metabolizmasındaki patoloji neticesinde oluşan şilomikron dizeylerinde artış ile karakterizedir (Satar, 1996).

5. Tip IV hiperlipoproteinemi (familyal hipertrigliseridemi)

Serum trigliserit ve VLDL seviyesinde artma sözkonusudur. Kolesterol seviyesi yüksektir. LDL normal veya düşük iken, HDL sıklıkla normalden düşük bulunur (Satar, 1996). Koroner kalp hastalığı riski artmıştır.

6. Tip V hiperlipoproteinemi (endojen ve eksojen hipertrigliseridemi)

Tip I ve IV'ün aynı anda görülmesidir. HDL ve LDL düşükken kolesterol ve trigliserid düzeyleri yüksektir (Stavropoulos ve Crouch, 1974). Bilinmeyen sebeplerden dolayı VLDL ve şilomikron artmıştır. Pankreatit ve koroner kalp hastalığı riski vardır.

Serumda yüksek lipid miktarı ile insanlarda koroner kalp hastalıkları ve aterosikleroz arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Anonymus, 1993). Yüksek kan kolesterol düzeyine sahip olan kişiler, yüksek aterosikleroz riski taşırlar. Aterosikleroz, orta ve büyük arterlerin iç yüzeylerinde kolesterol ve kolesterol esterlerinin ve hücre yıkım ürünlerinin biriktiği kronik bir hastalıktır.

Kandaki toplam plazma kolesterolünün azalması kalp hastalıkları riskini azalttığı, Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D) Lipit araştırma kliniği programında belirtilmiştir (Gilliland, 1985). Amerika'da her yıl 65 milyon kişide kalp ve damar hastalıkları tespit edilmekle ve bir milyon kişi bu hastalıktan hayatını kaybetmektedir (McNamara, 1991).

Kalp damar hastalığından ölüm sıklığı ile plazma kolesterol konsantrasyonu arasında orantılı bir ilişki vardır. Yüksek total plazma kolesterol düzeyi ile koroner arter hastalığı arasında da bir bağlantı vardır, ancak kan LDL-K düzeyi ile kalp hastalığı arasında daha güçlü bir ilişki söz konusudur. Kolesterolün depo edilmesi ya da parçalanmasında en belirleyici ilişkinin LDL-K/HDL-K oranı olduğu kabul edilmektedir. Kan kolesterolünün yaklaşık olarak % 80' i LDL' de taşınır. Bunun aksine, yüksek HDL-K düzeyleri, kalp hastalığı riskini azaltır.

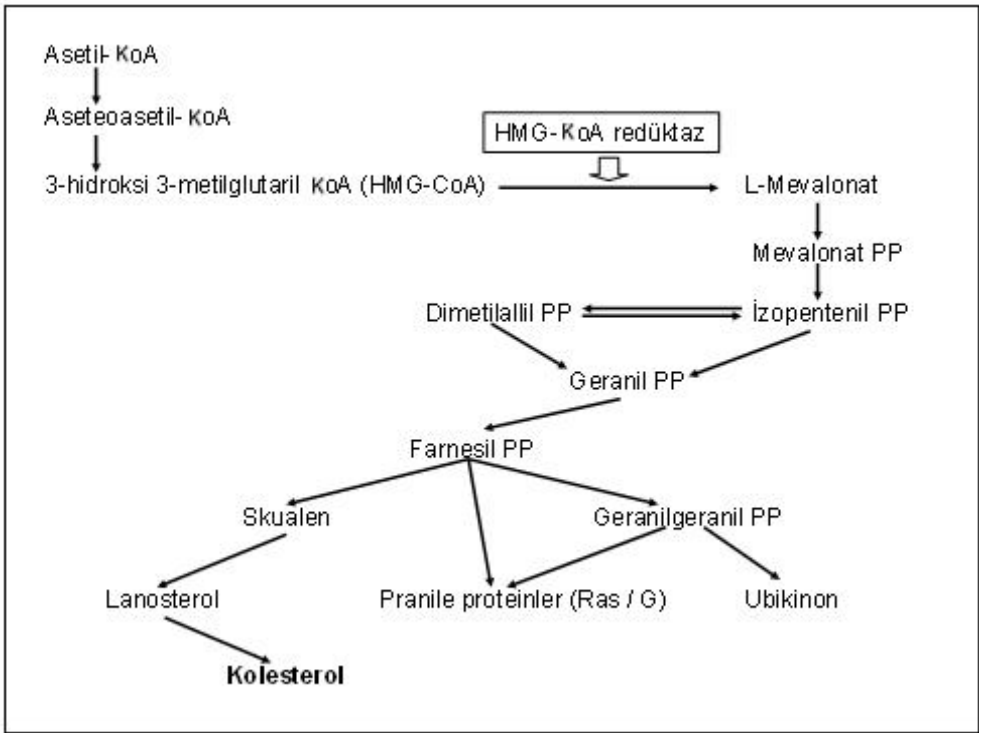
Yüksek kolesterol içeren diyetle beslenen bireylerde, karaciğerde kolesterol miktarı yükselir ve bu durumda LDL reseptörlerinin üretimi baskı altında tutulur. Genetik veya diyet nedeniyle oluşan reseptör eksikliğinde plazma LDL seviyesi, LDL üretiminin artması ve LDL alımının azalması nedeniyle artar. (Voet ve Voet, 1995).

2.1.3. Statinler

Gelişmiş ve gelişmekte olan birçok ülkede kardiyovasküler hastalıklar en önemli ölüm nedenidir. Metabolik sendromun kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde önemli rolü bulunmaktadır (Isomaa ve ark., 2001).

Statinler kolesterol biyosentezinde önemli rolü olan HMGR'yi geri dönüşümlü inhibe ederek, plazma kolesterol, LDL-K, apo-B (apolipoprotein B) ve trigliseritleri düşürür, HDL-K düzeyini ise yükseltir (Gotto, 1995). Bu olay sonucu, karaciğer hücrelerindeki kolesterol ve lipoprotein düzeyinin düşmesi, bu hücrelerin yüzeyindeki LDL reseptörlerinin dansitesinde (yoğunluğunda) artmaya (reseptör aşırı ifadesine) yol açar. Böylece, söz konusu ilaçlar hem lipoprotein sentezini azaltmak, hem de apo-B içeren lipoproteinlerin karaciğer hücrelerine ve diğer hücrelere girişini ve orada yıkımını arttırmak suretiyle kanda LDL-K ve total kolesterol düzeyini düşürürler. Hipertrigliseridemiyi de bir dereceye kadar düşürebilirler.

Oral olarak alınan statinler etkilerini HMGR enzimini kompetitif bir şekilde inhibe ederek gösterirler. Bu enzim HMG-KoA'nın L-mevalonat'a dönüşmesini katabolize eder ve bunun inhibisyonu sonucu statinler L-mevalonat'ın oluşturacağı kolesterolü önlemiş olur (Kaplan, 2007).



Şekil 2.1.3.1 Asetil KoA'dan kolesterole dönüşüm seması. KoA: koenzim A, PP: pirofosfat

2.1.3.1. Statinlerin kimyası ve fonksiyonel özellikleri

Statinlerin kimyasal şekilleri üç parçaya ayrılabilir; birincisi hedef enzimin substratı olan HMG-CoA analoğu olan kısım; ikincisi substrat analoğu olan kısma kovalent bağlı olan ve statini enzime bağlama işlevini gören kompleks bir hidrofobik halka yapısı; üçüncüsü ilaçların çözünme özelliklerini, dolayısıyla pek çok farmakokinetik özelliklerini belirleyen halka yapılarına bağlı yan gruplardır.

Statinler, ağırlıklı olarak otuzun üzerinde üyesi bulunan sitokrom P450 (CYP450) enzim ailesi tarafından metabolize edilirler (Bottorff ve Hansten, 2000).

Statinlerin büyük bir kısmı, ağırlıklı olarak karaciğer tarafından metabolize edildikten sonra safra yoluyla atılır (Knopp, 1999). Statinlerin primer etkisi, LDL-K düzeyini azaltmaktır.

Statinlerin hipolipidemik etkisi, kolesterol biyosentezinin baskılanmasına bağlıdır. Ayrıca karaciğerde kolesterol sentezini inhibe ederek kan kolesterol düzeyini değiştirirler ve bu şekilde de LDL reseptör geninin ekspresyonunda artışa sebep olurlar. Hepatositler, içindeki serbest kolesterol miktarının azalmasına cevap olarak membrana bağlı sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinler (SREBP), proteazlar tarafından membrandan ayrılır ve çekirdeğe transloke olurlar. Ardından transkripsiyon faktörleri LDL reseptör geninin sterole cevap veren bölümüne bağlanarak taranskripsiyonun ve LDL reseptör sentezinin artmasına sebep olur (Brown ve Goldstein, 1986). Sonuçta karaciğerde LDL reseptör aktivitesi artar, bu durum LDL'nin karaciğerden direkt alımını uyararak LDL-K düzeylerinin azalmasına yol açar. LDL öncüllerinin (VLDL) karaciğerde alımının artması da, VLDL'nin LDL'ye dönüşümünü azaltarak LDL düzeylerini azaltabilir. VLDL'nin karaciğerde üretiminin azalması ve VLDL kalıntılarının katabolizmasının artması, statinlerin trigliserid düzeyi üzerindeki etkisine katkıda bulunur. 250 mg/dl'nin üzerindeki trigliserid seviyeleri statinler tarafından çoğunlukla düşürülür ve düşme oranı LDL-K sağlanan düşme yüzdesine benzerdir (Stein ve ark., 1998).

2.2. *Nerium oleander*

Zambakgiller (*Apocynaceae*) familyasında yer alan zakkum (lat. *Nerium oleander*, NO), batıda, güney Portekiz'den başlayarak bütün Akdeniz sahilleri boyunca Suriye'de, Batı ve Güney Anadolu'nun dere yataklarında yetişir. Yazın çiçeklenen ve uzun bir çiçeklenme devresine sahip olan zakkumun meyvesi bakla şeklindedir. Yapraklar mızrak biçiminde, sivri uçlu, 6-30 cm uzunluk ve 1-3 cm genişlikte, derimsi, orta damar alt yüzde dışarı doğru çıkık, yan damarlar orta damara hemen hemen dikey ve birbirlerine paralel, her iki yüzde de tüysüzdür. Çiçekler dal uçlarında toplanmış, korolla 5 parçalı, pembe veya kırmızı nadiren beyaz renkli, kaliks parçalı, 5-7 mm uzunluktadır. Meyve 10-18 cm uzunlukta, boyuna çizgili, olgunlaşma döneminde bir

yandan açılır. Tohumlar 4 mm kadar uzunlukta ve tüylüdür. Kokusuz ve keskin lezzetlidir (Baytop ve ark., 1989).



Şekil 2.2.1. *Nerium oleander* (zakkum) bitkisinin doğadaki görüntüsü

Bitkinin organlarının tamamında bulunan bileşiklerin % 0,049'unu kateşik bileşikler, %0,014'ünü steroller, % 4,3'ünü ursolik asit teşkil etmektedir. Ayrıca az miktarda uçucu yağ, sapogenin, siyanogenetik glikozit, flavon glikozitleri, vitamin C, eser miktarda Vitamin K ve karoten bulunduğu bildirilmektedir (Ergun, 1992).

Bitkinin farklı kısımlarının incelenmesi sonucunda değişik glikozitler, triterpenler ve uzun zincirli bileşiklerin varlığı ortaya konmuştur (Siddiqui ve ark., 1995; Begum ve ark., 1999; Zia ve ark., 1995). NO'nun yaprakları farmakolojik etkili iki glikozit grubu içermektedir. Bunların steroid glikozitler ve flavon glikozitleri oldukları belirtilmiştir (Gorlich, 1961). Bitkideki başlıca kardiak glikozit, oleandrin olarak adlandırılmıştır (Siddiqui ve ark., 1990). Diğer glikozitlerden bazıları neriin, folinerin rosagenin, kornevin, psüdokuranin, rutin, kortenerin, olendomisin, adinerin, isoadinerin, oleandrin-4, oleandrin-6, desasetil oleandrin, neriin D, neriin E, neriin F, neriantin, odorosid A, odorosid H, neritalosid, gitoksigenin, strospesid ve ürekitoksindir (Yamauchi, 1975).

Bitkinin organlarında ana bileşik olan oleandrin kardioaktif ve diüretik etkili olup kalbi stimüle etmektedir. Oleandrin, neriin ve diğer digitoksin benzeri glikozitlerin kardiyak bozuklukların tedevaisinde, digitalis ve oubain'in yerine başarıyla kullanılabilir olduğu bildirilmiştir (Ergun, 1992).

Bitkinin kök, yaprak ve kabuk gibi değişik organları Porto Riko, Küba, Kuzey Afrika, Venezuela, Hindistan, Libya, Antiller, Fas, Arjantin gibi ülkelerde halk arasında değişik kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Yaprakların kaynatma, yakı, merhem, dekoksiyon (demleme); kabukların toz, dekoksiyon; köklerin ise pasta ve lapa şeklinde hazırlanarak kullanıldığı belirtilmiştir (Ergun, 1992)

NO bitkisinin zehirliliği çok eski zamanlardan beri bilinmektedir. Bitkinin taşıdığı kimyasal bileşikler insan ve hayvanlarda akut zehirlenmelere neden olmuştur. Zehirlenmeyi ortadan kaldırmak için zaman zaman kaynatma ve kurutma işlemleri uygulanmışsa da dal ve yapraklardan suya geçen maddelerden dolayı suyun içilmesi hallerinde zehirlenmeler görülmüş ve rapor edilmiştir (Baytop, 1989)

Çizelge 2.2.1. *N. oleander*'in insan ve hayvan türlerindeki letal dozları gösterilmiştir (Siddiqui ve ark., 1990).

Türler	Preparasyon	Yol	Doz
İnsan	Yaprak	Oral	Bir yaprak
At	"	"	0.005% v.a. veya 15-20 g
Sığır	"	"	0.005% v.a. veya 10-20 g
Koyun	"	"	0.015% v.a. veya 1-5 g
Tavuk	"	"	15g
Ördek	"	"	3g
Kaz	"	"	6g
Kedi	Oleandrin	i.v.	0.101 mg/kg
"	"	s.c.	0.15 mg/kg
"	"	oral	0.4-0.5 mg/kg
Köpek	"	i.v.	0.135 mg/kg
"	"	oral	0.5 mg/kg

v.a.=vücut ağırlığı i.v.=intravenöz s.c.=subkütan

Bitkinin halk arasında kullanıldığı hastalıklar astım, değişik kanser türleri, zona, sıtma, ekzama, cüzzam, siğil ve tümörler, döküntülü hastalıklar, göz hastalıkları şeklinde sayılabilir (Siddiqui ve ark., 1987)

Nerium oleander ekstraktı kanser tedavisinde uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. İlk olarak 8. yüzyılda Arap hekimleri tarafından kanser tedavisinde kullanılmıştır (Karaca, 2008). Türk hekimlerinden de Opr. Dr. Ziya Önel, *Nerium oleander* yapraklarından hazırladığı bir sulu ekstraktı kullanarak bazı kanser türlerinde başarılı sonuçlar aldığını belirtmiştir (Baytop, 1989). Bu bitkinin uluslararası patenti A.B.D'de anvirzel adı ile alınmıştır (Pathak ve ark., 2000).

Smith ve ark. (2001), *Nerium oleander*'in bir ekstraktı olan anvirzel üzerine çalışmışlardır. Çalışma sonucunda, anvirzel ve oleandrinin; prostat kanser hücre serilerinde, antitümör aktivitelerinin, kanser tedavilerine katkı sağlayabileceğini belirlemişlerdir.

Yazıhan N. ve ark. (2012), NO ekstraktının karaciğer ve adiposit hücrelerinde glukoz alımına ve insulin bağlanmasına etkilerini incelemişlerdir . Farklı dozlarda insulin (1-20 IU/ml) ve NO (0,1-50 µg/ml) 48 h uygulamasının insan hepatosit Hep3B ve fare adipositleri 3T3-L1 hücre dizileri üzerindeki etkileri değerlendirmişlerdir. Bu amaçla hücre toksitesi LDH (laktat dehidrogenaz) sekresyonu, hücre çoğalması ve hücre içine glukoz alımı/insulin bağlanmasını ölçmüşlerdir. Düşük dozlarda NO uygulamasının hücre sayısına etkisi görülmezken kullanılan üst dozlarda adipositlerde sitotoksik etki gözlemişlerdir. NO'nun adiposit ve hepatositlerde hücre içine glukoz alımını arttırdığını gözlemlemişlerdir. Çalışmalarının sonuçları NO ekstraktının tip 2 diabette özellikle insulin ve glukoz kullanımını düzenleyici etkisi nedeniyle önemli yeni bir tedavi alternatifi olabileceğini önermektedir.

Pathak ve ark. (2000) yapmış oldukları çalışmalarında, insan, fare ve köpek tümör hücrelerinde, farklı konsantrasyonlarda anvirzel (1 ng/ml-500 µg/ml) ve oleandrinin (0,01 ng/ml-50 µg/ml) tümör öldürücü etkisini araştırmışlardır. İnsan kanser hücrelerinde her iki ekstraktın da etkili olduğu, diğer yandan fare kanser hücrelerinde oleandrinin anvirzelden daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Wang ve ark. (2000) kanser tedavisinde zakkum ekstraktını araştırmışlardır. Aynı zamanda anvirzelin kas içi enjeksiyonunu takiben insan plazmasında oleandrigenin, neritalosid ve odorosid'in belirlenmesi için analitik bir metot uygulamışlardır (Wang ve ark., 2000). Fu ve ark. (2005), ursolik asit ve oleanoik asidin metal esterlerinin hücre içi adezyon molekülü–1'in (ICAM–1) indüksüyonuna karşı inhibitör aktivitelerini ve insan hücre serilerinde hücre gelişimi üzerindeki etkilerini ortaya koymuşlardır. Zhao ve ark. (2006) ise izole ettikleri yeni üç triterpenin benzer şekilde ICAM-1'e yönelik inhibitör etkilerini ve A-549 (akciğer karsinoma hücresi), WI-38 (embiryonik akciğer hücresi), VA-13(embiryonik akciğer hücresi) ve HepG2 (karaciğer karsinoma hücresi) hücrelerinde sitotoksik etkilerini değerlendirmişlerdir.

Oleandrin NO yapraklarında bulunan temel maddelerden biridir. *In vivo* koşullarda gerçekleştirilen bir araştırmada (Afaq ve ark., 2004), antienflamatuar ve tümör hücresi gelişimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, 2 mg oleandrinin proflaktik amaç ile lokal uygulamasının, deri tümörü oluşumunda yaygın olarak kullanılan bir madde olan TPA (l2-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)'nın etkisine karşı olumlu sonuçlar elde edildiğini rapor etmişlerdir. Pietsch ve ark. (2005), oleandrin zehirinin ölümcül olmayan dozunun belirlenmesi üzerine, 47 yaşındaki bir

bayan üzerinde klinik bir araştırma yapmışlardır. Serum örneklerindeki oleandrin konsantrasyonunu yaklaşık 1,6 ng/ml olarak bulmuşlar ve bulguları daha önceki çalışmalarla karşılaştırmışlardır. Afaq ve ark. (2004), *Nerium oleander* yapraklarından elde edilen oleandrinin anti-inflammatuar ve tümör hücrelerinin büyümesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre oleandrinin antitümör etkisini bulmuşlardır. Zia ve ark. (1995), NO'in taze ve kurutulmuş yapraklarının metanol ekstraksiyonu ile elde ettikleri fraksiyonlarının analjezik etkilerinin bulunduğunu belirtmişlerdir. Erdemoğlu ve ark., (2003), NO'nun su ve etanol ekstresinin farelerde p-benzokuinon ile oluşturulan abdominal kontraksiyonları önemli oranda azalttığı (antinosiseptiv etki) ve karrageenan ile arka ayakta oluşturulan ödem modelinde önemli düzeyde antienflamatuvar etkisinin olduğu belirtmişlerdir.

2.3. MİKROARRAY TEKNOLOJİSİ

2.3.1. Mikroarray Teknolojisi Nedir?

Mikroarray genellikle cam, naylon membran veya silikon yapıdaki katı yüzeyler üzerinde minyatürize alanlara yerleştirilmiş milyonlarca birbirine denk tek iplikli DNA (deoksiribo nükleik asit) parçacıkları (prob), antikor veya epitopik belirteçler aracılığıyla bir genomda depolanmış olan bilgilerin hibridizasyon gibi özgün kimyasal bağlanma temeline dayanan bir prensiple incelenmesi tekniğidir. Yüzeye tutturulan bu DNA segmentlerinin (20 ile 100 ya da daha fazla nükleotid uzunluğunda olabilir) binlercesi tek bir DNA mikroarray'inde birlikte kullanılabilmektedir (İpekdal, 2006). Bir array, nükleik asit örneklerinin düzgün bir şekilde sıralanması ile oluşmaktadır. Bilinen ve bilinmeyen DNA/RNA örneklerinin baz eşleşmesi özelliğine göre hibridizasyonu için uygun bir ortam sağlayarak bilinmeyen DNA/RNA'ların tanımlanabilmesi için kullanılır. Genel olarak mikroarray teknolojisinin en önemli özelliği, küçük bir alanda çok sayıda genomik incelemenin yapılmasına olanak sağlamasıdır. Bir mikroorganizmanın tüm genleri küçük bir alana yerleştirilebilir ve binlerce genin ekspresyon seviyeleri tek bir deneyde aynı anda çalışılabilir (Şekil 2.3.1.1). Bu tekniğin en heyecan verici yanı ise, yakın bir gelecekte küçük bir okuyucu cihaz aracılığı ile hasta başında çok sayıda hastalık/etken arasında ayırıcı tanı

yapılmasına veya tedavi sonucunun değerlendirilmesine olanak sağlayacak olmasıdır (Choi, 2004).



Şekil 2.3.1.1. Cam mikroarray örneği (Muratgül, 2010)

2.3.2. Mikroarray Teknolojisinin Gelişimi

1869'da Miescher'in DNA izolasyonunu gerçekleştirmesi, 1975'de Southern blotting ve hibridizasyon ve 1985'de polimeraz zincir tepkimesi (PCR) teknolojisinin keşfinden itibaren moleküler mikrobiyolojik çalışmalar dikkate değer bir değişim göstermektedi. Önceleri tüm yayınlar tek bir gen ya da bir operonun sekans analizi konusunda yoğunlaşmışken artık tek bir yayının tüm bir genomun sekans analizini yaptığı günlere gelinmiştir (Cucchini ve ark., 2001). Tekniğin başlangıç girişimleri Schena ve Shalon tarafından gerçekleştirilmiştir (Savlı, 2003). Çiplerin yer aldığı zeminleri hazırlamaya ait ilk ekip Brown ve arkadaşlarınca oluşturulmuş ve daha sonra başka ekipler de eklenmiştir.

Mikroarray'lerin gen ekspresyonu için kullanımı ile ilgili çalışmalar ilk kez 1995'de Science Dergisi'nde yayınlanmıştır (Schena ve ark., 1995).. Mikroarray ile tanımlanan ilk ökaryotik genom ise *Saccharomyces cerevisiae*'ninki olmuştur ve bununla ilgili çalışma da yine Science Dergisi'nde, 1997 yılında yayınlanmıştır (İpekdal, 2006). Genleri tanımlamak amacıyla GenBank, UniGene gibi birçok veri kaynağı kullanılmaktadır (Savlı, 2003).

2.3.3. Mikroarray Üretim Teknikleri

Mikroarray platformları temelde üç ana yöntemle üretilirler. Bu üç ana yöntem dışında farklı teknolojiler de geliştirilmektedir. Ancak, tüm yöntemler hibridizasyon esasına göre çalışmaktadır (Saraçlı, 2007). Bu yöntemler aşağıda detaylı olarak incelenmiştir.

2.3.3.1. Fotolitografik maskeleme yöntemi

Bu yöntemde oligonükleotid sentezi insitu olarak cam yüzey üzerinde gerçekleştirilmektedir. Önce mikroarray hazırlanacak olan ve genellikle camdan üretilmiş malzemenin ters yüzü poliamid ile kaplanır. Daha sonra, ilk nükleotidin bağlanması ile başlayacak ve diğer nükleotidlerin eklenmesi ile sürecek sürecin gerçekleşeceği yüzey silan ile kaplanır. Yüzeydeki tüm hidroksil uçlar ışıktan korunmuş ve nükleotid bağlanmasına izin vermeyen bir molekül (linker) ile kapatılır. Bu molekül, özgün noktalarda açıklıkları olan bir maske üzerinde ultra viyole (UV) ışığına maruz bırakılarak sadece bu açıklık bölgelerindeki ışığa hassas engel ortadan kaldırılır ve eklenen nükleotidin bağlanması gerçekleştirilir. İkinci kez maskeleme işlemine geçildiğinde ise platform bu sefer farklı bölgelerde açıklıkları olan maske üzerinden UV ışığına maruz bırakılır. Böylece korunması kaldırılan bölgelere farklı bir nükleotid eklenerek zincir uzaması sürdürülür (Muratgül, 2010).

2.3.3.2. Yüzey temaslı spotlama yöntemi

Önceden hazırlanmış oligonükleotid problar, kimyasal olarak değiştirilmiş cam yüzeyler üzerinde tasarlanmış noktalara kusursuz bir şekilde kontrol edilen robotik kolların ucundaki mikro kanallar aracılığıyla veya daha küçük kapasiteli platformlarda manuel olarak temas ettirilir. Cam yüzeyler poly (L-lisin) ve benzeri kimyasallarla değişikliğe uğratılır ve DNA molekülünün kovalent veya kovalent olmayan bir şekilde yüzeye tutturulması sağlanmış olur (Muratgül, 2010).

2.3.3.3. Püskürtme yöntemi

Bu yöntemde de önceden hazırlanmış oligonükleotid problar, kimyasal olarak değiştirilmiş cam yüzeyler üzerinde tasarlanmış noktalara robotik kollar aracılığı ile yerleştirilirler. Ancak, yüzey temaslı spotlama yönteminden tek farkı problar tutturulacağı cam yüzeye "inkjet (püskürtme)" adı verilen bir teknikle temas etmeksizin ince bir uçtan püskürtülür (Muratgül, 2010). Böylece üretim serileri arasında farklılıklar göstermeyen ve tek tip noktalama sağlayan yüksek kaliteli mikroarray üretilmesi sağlanmış olur.

2.3.4. Mikroarray Teknolojisinin Kullanım Alanları

2.3.4.1. SNP analizinde kullanımı

Tek nükleotid polimorfizimleri (Single Nucleotide Polymorphism (SNP)) yaygın olarak bireyler arasında DNA daki tek nükleotit değişiklikleri olarak adlandırılır. Bu nokta değişikliklerini tespit eden yöntemler, bir veya birkaç nükleotid küçük insersiyon ya da delesyonları da bulabilir. Polimorfizmler populasyonda en az % 1 sıklıktan daha az yaygın bir varyantın olduğu bölge olarak da tanımlanırlar.

SNP'ler hastalıklara yatkınlık, ilaç cevabında değişimler gibi etkilere sahiptirler. Bireyler arasında ilaçlara karşı gelişen yanıtta gözlenen farklılıklar yıllardır araştırma konusu olmaktadır. SNP, ilaç metabolizmasında rol alan enzimlerin fonksiyonlarını değiştirir. İnsan popülasyonları arasındaki genetik farklılıklar nedeniyle bazı popülasyonlar, bazı hastalıklara daha duyarlıdır. Kanser, Alzheimer, bazı kardiyovasküler hastalıklar, migren gibi hastalıklar SNP ile yakın ilişki içerisindedir. Çeşitli hastalıklara özgü SNP profilleri belirlenmiştir. DNA örneklerindeki özgün SNP'ler incelenerek, bireylerin hastalıklara olan yatkınlıkları belirlenebilmektedir.

SNP belirlenmesinde sık kullanılan yöntemlerden biri, PCR'dır. Günümüzde en sık kullanılan yöntemlerden biri de, mikroarray teknolojisidir. SNP mikroarraylarında kısa nükleotid dizileri kullanılmaktadır. Kısa nükleotid dizilerine hibridizasyon tekniğiyle DNA dizileri bağlanır ve SNP'ler tayin edilir. Teknolojide kullanılan çipler, otomatize, hızlı ve verimli oldukları için tercih edilmektedir.

2.3.4.2. Array – karşılaştırmalı genomik hibridizasyon

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH) yöntemi, temeli floresan insitu hibridizasyona, FISH (Fluoresan in situ hibridizasyon)'a, dayanan, farklı floresan boya ile boyanmış test (hasta) ve referans DNA örneklerinin normal kromozomlara bağlanması ile elde edilen floresan renk farklılıklarını gösteren bir sitogenetik yöntemdir. Yöntem ile hasta DNA'sında kromozomal kayıp veya belli bir bölgenin amplifikasyonu gösterilir. Bu teknik ile tüm genomda kromozom veya kromozom bölgelerindeki artma veya azalmalar saptanabilir ve hücrenin tüm kromozomları izlenebilir.

Tekniğin temel avantajı, iki renkli görüntüleme sistemi kullanılması sonucunda metafaz plağı üzerinde kromozom anomalilerinin normal karyotip analizine göre daha güvenilir saptanabilmesi ve en az iki genomun bir birleri ile karşılaştırılmasına olanak sağlamasıdır.

Array karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (Array - CGH) temeli, ilk kez 1997'de Solinas-Toldo ve ark. tarafından hedef (target) diziyi cam matriks üzerine

immobilize etmesiyle atıldı (Solinas-Toldo ve ark., 1997). Daha sonra 1999 yılında Pollack ve ark. array platformu üzerine cDNA dizisini immobilize ederek genom düzeyinde DNA'daki kopya sayısındaki değişmeler incelendi (Pollack ve ark., 1999).

Teknikte, DNA izolasyonu yapılarak, çiplerde kullanılan PCR ürünleri veya cDNA probları ile izole edilen DNA hibridizasyonu sağlanır. Test ve referans DNA'lar karşılaştırılır ve kromozom anomalileri karşılaştırmalı olarak saptanabilmektedir. Teknik, kanser araştırmalarında, haritalamada, diyagnostikte, epigenetik modifikasyonlara yönelik çalışmalarda kullanılmaktadır.

2.3.4.3. DNA metilasyonu tespitinde kullanımı

DNA metilasyonu DNA'nın metillenmesidir. Bu özelliği ile en iyi karakterize edilmiş epigenetik mekanizmadır (Jaenisch ve Bird, 2003). Epigenetik, genotipte herhangi bir değişiklik olmaksızın fenotipi etkileyen faktörlerin ve bunların fenotipte meydana getirdikleri değişiklerin tümüdür. Genellikle guanin nükleotidi tarafından takip edilen sitozin bazını etkiler. Sitozin 5' ucuna metil grubu eklenmesidir.

DNA metilasyonu, metilasyon spesifik PCR, HELP (HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR) testi gibi yöntemlerle saptanabilmektedir. Metilasyonun belirlenmesindeki bir diğer yaklaşım ise kromatin immunopresipitasyonu (ChIP) yönteminden yola çıkılarak geliştirilmiştir. Bu yöntemde DNA çift sarmalı ayrılır, metil sitozin antikorları eklenir. DNA işaretlendikten sonra mikroarray platformu ile hibridize edilir. Bu yöntem 'ChIP on chip' olarak adlandırılır. ChIP on chip yöntemi ile, DNA'nın metilasyonu saptanırken, metillenme derecesi de belirlenebilmektedir.

2.3.4.4. Organizmaların identifikasyonunda kullanımı

Mikroorganizmaların tüm genetik materyalleri mikrodizilimler ile incelenebilmektedir. Wilson ve ark. prokaryot, ökaryot ve virüslerden 18 patojen mikroorganizmayı aynı anda tespit eden "Multi-Pathogen Identification (MPID)" mikrodizilim geliştirmişlerdir (Wolfgang ve ark., 2003). Bu çalışmada araştırıcılar her bir organizmanın özgül DNA bölgelerini çoğaltmışlar ve mikrodizilimleri kullanarak patojene özgü DNA sekanslarının varlığını araştırmışlardır. Bazı durumlarda patojen DNA saptama sınırı 10 femptogram kadar az bir miktar olarak tespit edilmiştir. Mikrodizilimler, *Pseudomonas aeruginosa*'nın 11 ve *Mycobacterium tuberculosis*'in 12 farklı suşunun genom hibridizasyon yöntemleri ile karşılaştırılmasında da kullanılmıştır. Örneğin; *Mycobacterium tuberculosis*'de 16S ribozomal DNA sekansları patojenin tür düzeyinde identifikasyonu için kullanılmış ve *rpoB* (RNA polimeraz kodlayan gen) genindeki rifampin direnci karakterize edilebilmiştir (Mostowy ve ark, 2003; Sauhakoff ve ark., 2004).

2.3.4.5. Protein mikroarray

Gen ekspresyon array'leri, mRNA seviyelerindeki değişiklikleri, kodlanan protein seviyelerindeki değişiklikler ile ilişkilendirmek için kullanılırlar. Ancak bazen bu doğru sonuç vermez. Gen ekspresyon array'leri, hücre fonksiyonunu etkileyen proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları (fosforilasyon, glikolizasyon v.b) hakkında bilgi sağlamaz. Protein ekspresyonunu değerlendirmek, ilgilenilen proteinlerle ilgili kalitatif ve kantitatif bilgileri gerektirmektedir. Bu nedenle proteomik kapsamındaki araştırmalarda kullanılmak üzere protein mikroarray/chip geliştirilmiştir.

Çeşitli protein mikroarray platformları geliştirilmiştir. Analitik-antikor mikroarray, çevresel strese karşı oluşan cevapların profillendirilmesi ve hastalık durumuyla sağlıklı organizmalar arasında kıyaslama, söz konusu sistemler ile gerçekleştirilebilmektedir.

Bu teknik, zayıf karakterli hücre sinyal proteinleri gibi protein hedeflerin değerlendirilmesinde kullanılan bir tekniktir. Fonksiyonel mikroarray, fonksiyonel proteinlerin ya da bağlanma bölgelerinin mikroarray platform yüzeyinde yapılandırılmasıyla hazırlanan sistemler olup, protein ya da peptit mikroarray olarak da isimlendirilir. Ters faz mikroarray, hücresel proteinlerin mikroarray, kompleks protein karışımları veya saflaştırılmış yada fazla miktarda eksprese olmuş proteinlerin kullanımıyla hazırlanır. Saflaştırılmış veya fazla miktarda eksprese olmuş proteinlerin kütüphanelerinden oluşan mikroarray'in oluşturulması, protein-protein etkileşimlerinin ve kinaz aktivitelerinin görüntülenmesine olanak verir. Protein mikroarray'leri, proteinleri saptamada çok hızlı bir metot olmaları ve ekspresyon seviyelerini görüntülemede, etkileşimlerini ve fonksiyonlarını incelemede kullanılan önemli bir tekniktir.

Hızlı ve otomatik olmaları, yüksek hassasiyette olmaları, çözeltilerin ekonomik olması ve tek denemeyle çok veri elde edilebilmesi bu yöntemin avantajlarıdır. Elde edilen verilerin değerlendirilmesi biyoinformatik sayesinde yapılabilmektedir.

2.3.4.6. Ekspresyon analizi ve mikroarray teknolojisi

Mikroarray teknolojisi farklı düzeylerde 20 yıldan beri kullanılan bir teknik olmasına rağmen son zamanlarda kullanılan cDNA mikroarray teknolojisiyle bilim dünyasına birçok yenilikler kazandırmıştır (Kafatos ve ark., 1979). Bu teknolojinin farklı kullanım alanları olmasına rağmen son yıllarda daha çok değişik organizmalarda genomiks çalışmalarında genlerin ekspresyon analizlerinde kullanılmaktadır (Danson ve ark., 2001).

Son yıllarda birçok organizmanın DNA baz dizileri belirlenmiş olmasına rağmen bu DNA baz dizileri kendi başlarına bir şey ifade etmezler. Mikroarray tekniği sayesinde DNA baz dizileri belli olan genlerin hücredeki fonksiyonları araştırılmaktadır. Bu nedenle mikroarray analizinin sonucunda elde edilen ve farklı gelişme evresinde, farklı koşullarda ve farklı genotiplerde bulunan birçok bitki geni fonksiyonlarına göre gruplandırılmaktadır (Schaffer ve ark., 2000; Kuhn, 2001).

Örneğin ışıkta ve karanlıkta yetiştirilen *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde mikroarray çalışması yapıldığında ışıkla regülasyonu yapılan birçok geni belirlemek mümkün olmaktadır (Despres ve ark., 1998; Kehoe ve ark., 1999). Bu genlerin birçoğu yeni bulunan genler olacağı için daha önce veri tabanında bulunan hiçbir genle benzerlik göstermeyebilir, ancak en azından bu genlerin ışıkla yönetilen genler olduğu ve hücrede ışıkla birlikte aktivitelerinin artıp veya azaldığı hakkında da bilgi sahibi olunur (Kuhn, 2001).

2.3.4.6.1. Ekspresyon analizinin basamakları

2.3.4.6.1.1. Mikroarray platformunun temini

Cam bazlı arraylerde kalıcı biçimde çoğaltılabilir mikroarray ekspresyon verisinin elde edilmesinde, cam substratın hazırlanışı ve kalitesi çok büyük önem taşımaktadır. Her ne kadar standart mikroskop lamları DNA arraylerinde kullanılabilse de, DNA hedeflerinin bağlanmasını kolaylaştırmak için spotlama öncesi bir hazırlığa tabi tutulmaları gerekmektedir. Çeşitli aşamalardan geçirildikten sonra, çipler kullanıma hazırlanır. Ayrıca, firmalardan doğrudan çip temin edilebilir.

Önemli ticari mikroarray sistemlerinden biri Affymetrixtir. Bu teknolojinin uygulama alanına girdiği 1994 yılında her bir hibridizasyon noktası 100 x 100 mikron boyutlarında iken, 2005 yılında 5 x 5 mikron boyuta inilmiştir. Böylece yaklaşık olarak 1,28 cm x 1,28 cm boyutlarındaki bir yüzey alanı içerisinde yaklaşık 400 kat daha fazla sayıda deney (yaklaşık 6,5 milyon farklı noktada hibridizasyon aracılığıyla 500 bine ulaşan deney) gerçekleştirilebilmiştir (Şekil 2.3.4.6.1.1.1).



Şekil 2.3.4.6.1.1.1. Affymetrix GeneChip® firmasına ait insan ve fare genomu çipleri (Muratgül, 2010).

Önemli ticari firmalardan birisi de Agilent'tir (Şekil 2.3.4.6.1.1.2). Yöntemde cam mikroarray platformu üretiminde püskürtme teknolojisi ile üretilmiş mikroarray formatı kullanılmaktadır.



Şekil 2.3.4.6.1.1.2. Agilent Technologies® firmasına ait bir çip örneği (Muratgül, 2010)

2.3.4.6.1.2. RNA ekstraksiyonu

Gen ekspresyon analizi için yapılan mikroarray deneyinde, araştırılan doku veya hücreden RNA izolasyonu yapılır. RNA örnekleri seyreltilerek her bir örneğin eşit yoğunlukta olması sağlanır (İpekdal, 2006). Kural olarak, asıl RNA popülasyonundaki her mRNA molekülü için bu moleküle komplementer olan tek iplikli işaretlenmiş bir cDNA üretilir. Belli bir mRNA'nın yoğunluğu arttıkça cDNA miktarı da artar (İpekdal, 2002). RNA ekstraksiyonu için kitler kullanılmaktadır.

2.3.4.6.1.3. İşaretli cDNA hazırlanması

Tek iplikli bir prob oluşturmak için RNA, mRNA'daki polyA ucu ile baz çifti kurabilen oligo dT (deoksitimin) primerleri, reverse transkriptaz (RNA'ya bağımlı DNA polimeraz) ve işaretlenmiş nükleotidler içeren bir reaksiyon karışımına konur ve radyoaktif ya da floresan markörler ile işaretlenir (İpekdal, 2002). En sık kullanılan floresan markörler aleksaflor, ficoeritrin ve siyanin boyalarıdır. Siyanin boyalarından olan cy3 (siyanin 3) ve cy5 (siyanin 5) eksitasyon ve emisyon spektrumlarındaki geniş ayırım ile yüksek fotostabiliteye sahiptirler ve bu nedenle en çok kullanılan floresan işaretçilerdir (Saraçlı, 2007; Seidel ve ark., 2008). Bu fluoroforlar farklı dalga boylarında ışık yayarlar ve uygun lazerle eksitasyon sonrası kırmızı (cy5) ve yeşil (cy3) olarak görünürler (Yoltaş ve Karaboz, 2010).

2.3.4.6.1.4. cDNA ile mikroarray platformunun hibridizasyonu ve yıkama

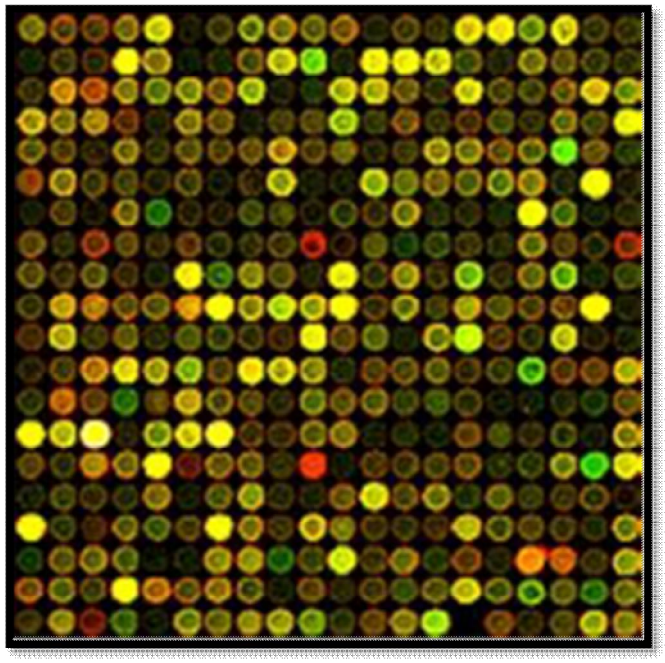
Problar iki boyutlu bir arrayde spotlanmış cDNA'ları içeren filtrelerle hibridize edilir (İpekdal, 2002). Eğer hedefte prob ile komplementer diziler bulunuyorsa hedef array ile hibridize olur (Yoltaş ve Karaboz, 2010). Hibridizasyonun sağlanması için hedef konsantrasyonu, sıcaklık, tampon ve tuz konsantrasyonu optimize edilmelidir (Muratgül, 2010). Gen array hibridizasyonunda cDNA'lar bir filtre ya da lam üzerine spotlanır ve bir mRNA popülasyonundan elde edilen bir prob yardımıyla hibridize edilir (İpekdal, 2002).

Hibridizasyon yapıldıktan sonra, yıkama işlemi gerçekleştirilir. Yıkama solüsyonu kullanılarak yapılan yıkama işlemi sonrasında, hibridize olmayan prob dizileri mikroarray platformundan uzaklaştırılır.

2.3.4.6.1.5. Cihazda tarama ve hibridizasyon varlığının gösterilmesi

Çipler, işaretlenmiş hedef DNA ve probların hibridizasyonu sonucu oluşan floresan sinyalleri toplayan kimyasal işlemcilerle bağlantılı olan komponentler, diyotlar ve transistörlerden oluşan bir tarama (scanning) cihazı ile okunur. Mikroarray tarayıcılar örneğin floresans yoğunluğunu gösteren bir piksel matriksinden oluşan görüntüler oluştururlar. Tarayıcılar ile birleşik olan yazılım programı bireysel spotların ve ölçülen spotun yoğunluğunun belirlenmesini sağlar (Yoltaş ve Karaboz, 2010).

Farklı hücre popülasyonlarından gelen mRNA ya da farklı şekilde işlem görmüş örnekler array iki farklı dalga boyunda tarandığından farklı renkler veren cy3 ve cy5 boyalarının kullanımıyla saptanabilirler. Bu da array üzerinde sunulmuş olan her genin transkript seviyelerinin oranının ölçülmesini sağlar (Yoltaş ve Karaboz, 2010). Tarama sonrası, hibridizasyon varlığı, mikroarray'den alınan sinyallerle görüntülenir (Şekil 2.3.4.6.1.5.1).



Şekil 2.3.4.6.1.5.1. Hibridizasyon sonrası mikroarray'den alınan sinyallerin görünümü (Muratgül, 2010)

2.3.4.6.1.6. Verilerin yazılım aracılığıyla analizi

Mikroarray çalışmaları genom üzerinde geniş veriler elde edilmesini sağlar. Her ne kadar bu teknik pek çok biyolojik bağlamda potansiyel olarak kullanılabilse de verilerin bu kadar geniş olması veri analizinde bazı problemler yaratmaktadır (Muratgül, 2010). Verilerin miktarı ve kompleksliği biyoinformatik ve biyoistatistiksel analizlerin de dahil olduğu bir çok hesaba dayalı genomik yaklaşıma ihtiyaç duymakta ve bu yaklaşımlar sonuçların yorumlanmasında büyük öneme sahiptir (Şekil 2.3.4.6.1.6.1).



Şekil 2.3.4.6.1.6.1. Afyymetrix firmasına ait bir mikroarray tarayıcı ve yıkama sistemi (www.affymetrix.com)

2.3.5. Toksikogenomik

Toksikogenomik bir organizmanın hücre veya dokusu içerisinde toksik maddelere yanıt veren protein ve gen aktivitesi hakkındaki bilgilerin toplanması, yorumlanması ve depolanması ile ilgili, genomik ve toksikoloji kombine bir bilim dalıdır. Toksikogenomik, toksisite belirlenmesi ve uygulamanın genetik etkilerinin karakterizasyonuna olanak sağlar. Toksikogenomik çalışmalarının toksikoloji alanı, histoloji, üreme fizyolojisi ve biyokimya gibi çalışmaları kapsar. Toksik maddelerin genlerin ve gen ekspresyonunun üzerine olan etkisini inceleyen toksikogenomik, toksik maddelerin genom düzeyinde ekspresyon miktarını da inceleyerek, organizma açısından önemini ortaya koyar.

2.3.5.1. Toksikogenomik araştırmalarda mikroarray teknolojisinin kullanımı

Genomun büyük bölümünün eş zamanlı ölçülmesi, hastalıklarla ilgili genlerin keşfedilmesine olanak sağlar (Vrana ve ark., 2002). Son zamanlarda araştırmacılar, toksikogenomik araştırmalar için, genomik çalışmalara erişim sağlayan, mikroarray teknolojisini kullanmaktadır (Ju ve ark., 2007). Mikroarray teknolojisinin uygulandığı toksikogenomik çalışmalarla, toksik maddelere karşı gen ekspresyon yapılarının vermiş olduğu bireysel yanıtlar açıklanır (Vrana ve ark., 2002).

Toksikogenomik araştırmalarda, gen ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için uygun mikroarray çipi seçimi yapılır. Çip, sıralı şekilde oluşturulmuş mikroskobik DNA spotlarıdır. Gen çipleri canlıya, o canlıda çalışılacak olan dokuya ve metabolik yola bağlı olarak farklı şekillerde geliştirilerek hazırlanır. Bu teknoloji geliştiğinden bu yana çok çeşitli ve canlıya özgü olarak çipler geliştirilmiştir. Toksikoloji çalışmalarında da kullanılmak amacıyla, çeşitli canlılara ve gen bölgelerine özgü çipler geliştirilmiştir ve araştırmaya uygun olarak çip seçimi yapılmaktadır.

Mikroarray teknolojisi, toksikoloji çalışmalarında, hem kimyasallarla etkilenen gen ve gen bölgelerinin tespitinde, buna bağlı olarak etkilenen toksikolojik metabolik yolların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda, özellikle, ilaç geliştirilmesinin erken aşamalarında, yeni kimyasalların toksik etkilerinin belirlenmesi için toksikoloji veri tabanları kurulmuştur (Hirode ve ark., 2008). Affymetrix gen çipleri kullanılarak, yaklaşık 150 kimyasal ve ilaç bileşenlerinin karaciğerdeki gen ekspresyonları analiz edilmiştir (Hirode ve ark., 2008). 2007 yılında, ratların tüm genom dizisi bir çip içerisinde toplanmıştır.

Araştırmacılar, toksikogenomik araştırmalar için, genomik çalışmalara erişim sağlayan mikroarray teknolojisini tercih etmektedir. Mikroarray teknolojisi ile, toksik maddelerin organizmaların gen ve genomuna vermiş olduğu etki, bu etkilerin miktarı, organizmadan organizmaya gösterdiği değişiklik, eş zamanlı ve karşılaştırmalı olarak analiz edilebilmektedir. Toksikogenomik araştırmalarda çipler kullanılarak, örneğin, bitki büyümesini engelleyen toksik bir maddenin hangi bitkinin büyümesini engellediği, bitkinin hangi hücresinde, hangi gen üzerinde, hangi dozlarda, hangi metabolik yolu etkilediğini çalışmak mümkündür.

Yapılan bir çalışmada, rat testiküler toksikant olduğu bilinen 1,3-dinitrobenzen (DNB) kimyasalının rat spermatositlerinin gen ekspresyon profilleri çalışılmıştır (Matsuyama ve ark., 2011). Uygulanan DNB miktarına ve süreye bağlı olarak gen regülasyonları gösterilmiş ve bu regülasyona bağlı olarak değişen metabolik yollar da araştırılmıştır. Mikroarray teknolojisi kullanılarak, DNB uygulamasının rat spermatosit hücrelerindeki gen ekspresyonları ve metabolik yolları belirlenmiş, DNB toksisitesi için genomik biyomarker aday genleri araştırılmıştır.

2.3.6. Farmakogenomik

İlaçların genler ve/veya genom üzerine olan etkilerini araştıran bir farmakoloji dalıdır. İlaçların alınımından sonra, ilaca verilen yanıtın genetik bağlamda moleküler temelinin aydınlatılması ve genler üzerinde yeni ilaçlar için hedef noktalar bulunmasıyla uğraşan bir bilim dalıdır. Ayrıca bu alan, her bireyin ayrı bir genetik yapısının olması nedeniyle kişiye özel ilaç tedavisini ön gören bir alandır. Farmakogenomiğin amacı, kısaca, ilaca verilen yanıtı genetik düzeyde incelemektir.

İnsan genom projesinin tamamlanması ile yaklaşık 30.000 genin varlığı ortaya konmuştur. Her 2000-2500 nükleotidde bir, bireyler arasında değişikliğe yol açabilen SNP'lerin varlığı öngörülmektedir. SNP'lerin ve diğer genetik varyasyonların hangilerinin fonksiyonel açıdan önemli olduğunun belirlenmesi ve bunların farklı toplumlardaki haplotip haritalarının çıkarılması farmakogenomik dalının ilgilendiği ana konular arasındadır.

2.3.6.1. Farmakogenomik araştırmalarda mikroarray teknolojisinin kullanımı

Kişiler veya toplumlar arasında ilaçlara farklı tip ve derecelerde yanıt verirliğin altında yatan olası genetik mekanizmalarla ilgili araştırmalar farmakogenetik disiplinini doğurmuştur (İngelman-Sundberg, 2001). Farmakogenomik araştırmalar kişiye özel ilaç tedavisinin geliştirilmesinin yanı sıra, ilaçların etkilediği metabolik yollara, ilaç direncinin tespitine, yeni ilaçların bulunmasına yönelik de yapılmaktadır.

Bireylerin ilaçlara duyarlılığı ve yan etkiler gibi konularda SNP'ler önem taşır. SNP mikroarray platformları kullanılarak, SNP'ler belirlenir ve böylece ilaçlara duyarlılık ya da yan etkiler saptanabilmektedir. Ayrıca kişiye özel ilaç üretimi araştırmalarında da SNP'ler önemlidir.

Mikroarray teknolojisi kullanılarak, bir ilacın bireye özgü etkisi eş zamanlı ve karşılaştırmalı olarak araştırılabilmektedir. Araştırmaya özgü gen bölgeleri veya genom

içeren mikroarray platformu, canlıya ve dokuya özgü temin edilebilmekte ve böylelikle ilaçların gen ekspresyonu üzerine etkisi de araştırılabilmektedir.

Mikroarray teknolojisi kullanılarak bir gen ekspresyon çalışmasında, izoniazid (INH) ilacının *Mycobacterium tuberculosis*'in gen ekspresyonu üzerine olan etkisi araştırılmıştır (Wilson ve ark., 1999). INH indüklü mRNA ekspresyonu mikroarray platformu üzerinde gösterilmiş, dirençli ve dirençsiz olan *Mycobacterium tuberculosis* türleri aynı platformda belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Ve Doku Materyali

Bu araştırmada kullanılan hayvan materyali Prof. Dr. Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deney Hayvanları biriminden (Konya) temin edilen 30 adet Sprague-Dawley erkek ratlardan (6-8 hafta) elde edilmiştir. Ratlar araştırmaya dahil edilmeden önce sağlık kontrolleri yapılarak iki hafta boyunca ortama intibak etmeleri için herhangi bir uygulama yapılmadan barındırılmıştır. Hayvanlar üç eşit gruba ayrılarak farklı uygulamalara tabi tutulmuştur. Bu çalışmalar ve ratların biyokimyasal testleri Veteriner Fakültesi Prof. Dr. Ahmet Levent Baş'ın yürütücülüğünde tamamlanan 11401041 Numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bahsi geçen projenin etik kurul onayı 24.03.2010 tarihinde 2010/028 nolu belgeyle Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi tarafından verilmiştir. Bu tez çalışmasında ise, aynı hayvanlardan elde edilen doku materyali ile araştırmanın moleküler yönde aydınlatılmasını sağlayacak olan mikroarray analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan dokuların elde edildiği ratlara uygulanan diyetler ve ratların biyokimyasal analizleri yukarıda bahsedilen 11401041 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiş ve bu çalışmaya ışık tutması açısından aşağıda kısaca verilmiştir.

1. Sağlıklı Kontrol (ND): İki haftalık normal diyet uygulamasını takiben 90 gün boyunca günlük gavaj yolu ile 0,5 ml distile su uygulaması yapıldı ve normal diyet ile beslendi. Çalışma süresince yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak giderildi. Normal dietin bileşimi; kuru madde: % 89, ham protein: % 21, selüloz: en çok % 5, kül: en çok % 10, Ca: % 1–2, P: % 0,5–1, NaCl: % 0.5, metabolik enerji: 2850 kcal/kg şeklinde oluşturuldu.

2. Kolesterollü diyet uygulanan grup (KD): İki haftalık yüksek kolesterollü diyet uygulamasını takiben 90 gün boyunca günlük gavaj yolu ile 0,5 ml distile su uygulaması yapıldı ve yüksek kolesterollü diyet ile beslendi. Çalışma süresince yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak giderildi. Yüksek kolesterollü diyet ise % 1 kolesterol, % 5 sığır iç yağı, % 5 soya yağı, % 20 kazein, % 35.1 mısır nişastası, % 20 sukroz, % 3.5 mineral, % 1 vitamin, % 0.4 kolin ve % 9 metil α-selüloz olacak şekilde kombine edildi (Chia-Feng, K. ve ark., 2008).

3. *Nerium oleander* (NO) distilatı ve kolesterollü diyet uygulanan grup (ZKD): İki haftalık yüksek kolesterollü diyet uygulamasını takiben 90 gün boyunca günlük gavaj yolu ile çözdürülmüş liyofilize NO distilatının 0,5 ml'si uygulandı ve yüksek kolesterollü diyet ile beslendi. Çalışma süresince yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak giderildi. *Nerium oleander* (NO), Mersin bölgesinden Nisan-Mayıs döneminde toplandı. Taze toplanmış NO yaprakları yıkandıktan sonra parçalandı ve suda (100 gr/1000 ml) kaynatılarak distilasyonu yapıldı. Elde edilen distilat liyofilize (FDT-8618 Freeze Dreyer, Operon, Korea) edildi. Liyofilize NO distilatı distile su ile 750 µg/ml olacak şekilde çözdürüldü.

Çalışmanın sonunda hayvanların tamamı sodyum pentobarbital (50 mg/kg, periton içi) ile genel anesteziye alınarak intrakardiyak yol ile kanları jelli tüplere alınmak sureti ile öldürüldü. Öldürülmesini takiben karaciğer, dokuları mikroarray analizi için sıvı azot içerisine alındı. Kan örnekleri 4000 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Serum ve doku örnekleri -80 °C'de muhafaza edildi.

3.1.1 Serum lipid düzeylerinin belirlenmesi

Serum kolesterol, düzeyleri Ilab kolorimetrik test kitleri (IL Test™, Instrumentation Laboratory, Milano, Italy) kullanılarak otoanalizör cihazında (IL Test™, Instrumentation Laboratory, Milano, Italy) ölçüldü. Çizelge 3.1.1'de ratların uygulanan diyet sonrası kolesterol miktarları gösterilmektedir.

Çizelge 3.1.1.1. Seçilen ratlar, ratlara uygulanmış olan diyet tipi ve ratların diyet sonrası kolesterol miktarları

Grup	Rat No	Kolesterol (mg/ dl)
ND	4	133.00
	10	112.00
KD	1	1664.00
	2	1172.00
ZKD	5	530.00
	10	275.00

ND: Normal diyet KD: Kolesterol diyet ZKD: Zakkum uygulanmış kolesterol diyet

3.2. RNA İzolasyonunda Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması

RNA izolasyonu işlemi sırasında kullanılacak olan tüm malzemeler (tüpler, pipet uçları gibi) suda % 0,1 (ml/ml) DEPC (Dietilpirokarbonat) çözeltisi ile 1 gece bekletildi. Dietilpirokarbonat (DEPC) pek çok enzimin inaktivasyonunu sağlar ve proteinlerdeki histidil kalıntılarını modifiye eder. Bu çalışmada RNase aktivitesinin inhibitörü olarak kullanıldı. DEPC 20 psi'de 20 dk. otoklavlanarak inaktive edildi. Tüm malzemeler kullanılıncaya kadar (70-80 °C'de) fırında bekletildi.

3.3. Dokulardan RNA İzolasyonu

1. Mikroarray için seçilen ratların karaciğer dokularından bistürü yardımı ile 50-100 mg örnek alındı.

2. Alınan doku örnekleri ayrı ayrı homojenizatör tüplerine konuldu. Tüp içerisine her 50-100 mg doku örneği için 1 ml TRI Reagent (Sigma) eklendi. TRI Reagent DNA, RNA ve proteinin eş zamanlı izolasyonunda kullanıma elverişli bir reaktiftir. İnsandan, hayvandan, bitkiden, mayadan, bakteriden ve virüs örneklerinden izolasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirebilir. RNA, DNA ve proteinin eş zamanlı izolasyonunda ilk adım su fazının ayrılması ile sonuçlanır (Chomczynski, 1993). TRI

Reagent doku örneklerinin homojenizasyonu veya lizisindeki protein, DNA ve RNA'yı dağıtır. Kloroform ya da 1-bromo- 3- kloropropan eklenip, santrifüj edilmesinden sonra, karışımı 3 faza ayırır: RNA içeren su fazı, DNA içeren ara faz ve protein içeren organik faz. Her bileşen fazlara ayrıldıktan sonra izole edilebilir. TRI Reagent'ın 1 ml'si ile 50-100 mg dokudan DNA, RNA ve protein başarılı ve kaliteli bir şekilde elde edilir.

3. Homojenizatör tüpleri (Şekil 3.3.1) homojenizasyon işlemi için homojenizatöre yerleştirildi. Düşük hızdan yüksek hıza doğru homojenize edildi (yaklaşık 30 sn).

4. Homojenize edilen her örnekten sonra, homojenizatör ucu distile su ile temizlendi ve ardından tüplere eklenen DEPC'li su ile yıkanıp kurulandı. Bu işlem her örnekten önce ve sonra tekrar edildi. Böylece, gelen doku örneğindeki RNA parçaları ile bir önceki RNA parçalarının karışması önlenmiş oldu.

5. Homojenizasyon işlemi sonrası, her örnek 1,5 mL'lik tüplere aktarıldı. Aktarım sonrasında 12.000 g'de 4 °C'de'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası parçalanmış doku pellette bulunmaktadır. Süpernatan kısmı tüpten uzaklaştırıldı.

6. Her tüpe 1 ml TRI Reagent için, 0.2 ml kloroform eklendi. 15 sn vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 2-15 dk beklenildi. 12.000 g'de 15 dk, 2-8°C'de santrifüj edildi.

7. Santrifüj sonrası 3 faz oluştu. Kırmızı organik faz (protein) ; arafaz (DNA) ; üst faz (su fazı, RNA).

8. Su fazı dikkatli bir şekilde, mikropipet yardımı ile temiz bir tüpe aktarıldı. Üzerlerine 0,5 ml 2-propanol eklendi. El ile hafifçe karıştırılarak oda sıcaklığında 5-10 dk bekletildi.

9. 12.000 g'de 10 dk, 2-8 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet kısmında RNA elde edildi. RNA'yı almak için, süpernatan kısmı uzaklaştırıldı.

10. RNA bulunan ependorfalara 1 ml %75'lik etanol eklendi. 7.500 g'de, 5 dk, 2-8 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatan uzaklaştırıldı ve pellet kısmı 60 °C'de, kapakları açık olacak şekilde 15 dk kurutuldu.

11. Alkol uçtuktan sonra her bir ependorfa 40 µL enjeksiyonluk su eklendi, çözdürüldü. 60 °C'de 10 dk RNA'nın çözünmesi sağlandı.

12. Hazırlanan RNA'lar kullanılıncaya kadar, yapısının bozulmaması için -80 °C'de saklandı.

3.4. RNA Kalitesinin Ve Miktarının Belirlenmesi

3.4.1. Spektrofotometrik Ölçümler

Her bir RNA örneğinden, spektrofotometre küvetine 2 µL alındı. Üzeri 2ml'ye dH_2O ile tamamlandı. Dilüsyon faktörü belirlendi.

Dilüsyon faktörü = Alınan örnek miktarı (ml) / Toplam miktar (ml)

Dilüsyon faktörü = 0.002 ml / 2000 ml = 1000

Her bir RNA örneği için, OD_{260} (nükleik asit optik dansite) ve OD_{280} (protein optik dansite) değerleri UV-VIS spektrofotometrede (Biochrom) belirlendi. Çizelge 3.4.1.1'deki değerler spektrofotometre programıyla hesaplandı.

Çizelge 3.4.1.1. Alınan RNA örneklerinde belirlenen değerler

OD_{260}	OD_{280}	OD_{260} / OD_{280}	Konsantrasyon(mg/ml)
Nükleik asit	Protein	Nükleik asit kalitesi	RNA mg / dH2O

Mikroarray için örneklerdeki RNA, belirli bir konsantrasyonda olmalıdır. Mikroarray aşamasındaki cDNA eldesi için 260 / 280 oranının 1,7 ile 2 değerleri arasında olması gerekmektedir.

3.4.2. Elektroforez

3.4.2.1. Jel hazırlanması

1. 100 mg Etidyum Bromür tartılarak, 10 ml'lik enjeksiyonluk suda çözüldü (10 mg/ml EtBr).

2. 0,5 M 100 ml EDTA için 18,61 gr $Na_2EDTA.2H_2O$ (MW: 372,24 gr/mol) 50 ml dH_2O da çözüldü. Bu aşamada çözeltinin pH'ı NaOH ilavesi ile 8'e ayarlandı. Çözelti 100 ml'ye tamamlandı. 242 gr Tris (MW: 121,14) 750 ml dH_2O da çözdürüldü ve 57.1 ml Glacial asetik asit eklendi. Ardından önceden hazırlanmış pH:8 0,5 M 100 ml'lik EDTA eklendi (100 ml). Çözelti dH_2O ile 1 L'ye tamamlandı. Son pH 8.5 olarak ayarlanarak 25X TAE (Tris Asetat EDTA) tamponu hazırlandı.

3. Hazırlanmış 25X TAE'den 40 ml alındı. 960 ml dH_2O eklendi. 1X TAE hazırlanmış oldu.

4. 1X'lik TAE'den 100 ml alındı. Üzerinde 1 gr agaroz eklenip karıştırıldı (% 1 (v/w)). Mikrodalga fırında homojen bir halde kaynayana kadar beklenildi. Kaynadıktan sonra soğuması için beklenildi. Daha sonra 5 µL EtBr eklendi, karıştırıldı.

5. Tarak takılıp jel tepsisine döküldü. Donması beklenildi, donduktan sonra tarak jel içerisinden alındı.

3.4.2.2. RNA Örneklerinin Agaroz Jele Yüklenmesi

5 µL RNA örneği ve 2 µL 6X yükleme boyası (Fermentas) karıştırılıp jele yüklendi. 1X TAE tampon çözeltisinden agaroz jel yüzeyini kaplayacak şekilde tanka eklendi. Tampona 5 µL EtBr eklendi. Agaroz jel elektroforez sistemi (Thermo) güç kaynağına bağlanıp, 100 volt, 110 mAmper, 80 dakikada örnekler yürütüldü. Bu süre sonunda agaroz jel görüntüleme cihazına yerleştirilip UV ışığında görüntüler alındı.

3.5. Gen Ekspresyon Analizleri İçin Mikroarray Çiplerinin Seçilmesi

Mikroarray analizleri için GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) çipleri seçildi (Şekil 3.5.1). *Rattus norvegicus* türüne özel, gen ifade analizleri için dizayn edilmiş olan Affymetrix GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array çipi, dokuya özgü ayırt edici özellikleri ve toksikolojik metabolik yolları gösteren prob setlerini içermektedir.



Şekil 3.5.1. Affymetrix GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array

Seçilen çip 31.042 probe seti içeriği ile yaklaşık 30.000 transcript için ekspresyon analizi imkanı sağlamaktadır. Array dizaynı için seçilen diziler (yaklaşık 28.000 rat geni) GenBank, dbEST, RefSeq ve UniGene gibi veri bankalarından alınmıştır. Bu diziler "probe" da denilen 25 oligomerlik diziler halinde array içine

fotolitografi yöntemiyle sentezlenmiştir. Her bir dizilerin komplementer oligonükleotid probları arraylar üzerinde sentez edilmiştir. Oligonükleotid problarının 11 çifti çip üzerinde gösterilen her bir dizinin transkripsiyon düzeyinde ölçümü için kullanılır. Çip için tasarlanan yazılım ile 55 ayırt edici özellik ve dokuya özgü 22 toksikolojik metabolik yolun da analizine olanak sağlamaktadır. Rat Genomu 230 2.0 Array özellikleri Çizelge 3.5.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5.1. Affymetrix Rat Genome 230 2.0 Array özellikleri (Affymetrix, 2011)

	Rat Genome 230 2.0 Array
Number of arrays in set	1
Number of probe sets	31,042
Feature size	11 µm
Oligonucleotide probe length	25-mer
Probe pairs/sequence	11
Control sequences included: Hybridization controls: Poly-A controls: Normalization control set: Housekeeping/Control genes:	 *bioB, bioC, bioD,* and *cre* *dap, lys, phe,* and *thr* 100 probe sets represented GAPDH, beta-Actin, hexokinase 1
Detection sensitivity	1:100,000*

Rat Genome 230 2.0 Array ile yapılan çalışmalarda, aşırı ifade edilen ve ifadesi azalmış genlerin belirlenmesinin yanı sıra, etkilenen metabolik yollar da bulunabilmektedir. Kolesterol biyosentez inhibitörü, DNA hasarı, kardiyak selüler infiltrasyon, ağır metal toksikantları, hepatik nekrozis gibi toksikolojik metabolik yolların tespiti yine bu çip ile yapılabilmektedir.

GeneChip® Mikroarray Sistemi; tarayıcı 3000 7G, yıkama istasyonu 450, hibridizasyon fırını 645, Affymetrix® GeneChip® Command Console® (AGCC) yazılımını içeren güçlü bir bilgisayar sisteminden oluşur.

3.6. RNA Amplifikasyon Aşamaları

RNA örneklerinin kalitesi ve miktarı belirlendikten sonra 6 örnek için 6 ayrı çip ile çalışıldı. RNA amplifikasyonu gerçekleştirildi. RNA örnekleri, amplifikasyon ve daha sonrasında analiz için bir dizi aşamadan geçmektedir. GeneChip® 3' IVT Express Kit kullanırken analiz için RNA'nın miktarının uygun olması gereklidir. mRNA içeriği dokuya göre değişkenlik gösterdiği için her deney sistemi için uygun RNA başlangıç miktarı ve IVT inkübasyon süresi deneysel olarak karar verilmelidir. Önerilen başlangıç RNA miktarı 50 – 100 ng'dır. Mikroarray deneyi için yapılmış olan amplifikasyon aşamaları Çizelge 3.6.1'de gösterilmektedir (Anonymous, 2005).

RNA'nın işaretlenmesi için Affymetrix GeneChip 3'IVT Assay Kit, Affymetrix Hybridization Wash and Stain Kit kullanılmış olup Affymetrix GeneChip Mikroarray Sistemi cihazları kullanılarak ham veriye ulaşılmıştır (Çizelge 3.6.1). Mikroarray sonrası yapılan bilgisayar programı bazlı analiz çalışmalarında kolesterolün ve zakkum diyetinin genlerde ekspresyon düzeyindeki etkileri belirlenmiş oldu. Analiz sonrası tüm genomun ekspresyon düzeyinde artış ve azalış bilgileri elde edildi. Bu araştırmada kolesterol metabolizması ile ilişkili olan genlerdeki artış ve azalışlara odaklanıp, lipid-kolesterol metabolizması ile ilgili genlerdeki değişimler tespit edildi.

Çizelge 3.6.1. Mikroarray için kullanılan solüsyonlar ve amplifikasyon aşamaları

Çözelti	**Miktar (µL)**	**Toplam (µL)**	**T (ºC)**	**Zaman**
Tek iplik cDNA Sentezi				
Total RNA (100 ng)	Değişken			
Dilut□d Poly-A Control (1: 3.33)	2	11	70 □	10 dk
T7-Oligo(dT), 50 □M	2			
RNase-free Water	Değişken			
4ºC, 2 dk				
5X 1st strand Reaction Mix	4			
DTT, 0.1 M	2	18	42	2 dk
dNTP, 10 mM	2			
Superscript II	2	20	42	60 dk
4ºC, 2 dk				
İki iplik cDNA Sentezi				
RNase-free Water	91			
5X 2nd strand Reaction Mix	30	150	16	□ 2 saat
dNTP, 10 mM	3			
E.coli DNA ligase	1			
E,coli DNA polymerase	4			
RNase H	1			
1st strand cDNA	20			
4ºC, 2 dk				
T4 DNA polymerase	2	152	16	5 dk
EDTA,□0.5 M	10	162	4	2 dk
In vitro işaretleme yaparak cRNA sentezi (IVT Labeling, synthesis of Biotin Labelled cRNA)				
Double strand cDNA	6			
RNase-free water	14	40	37	17saat
10X IVT Labelling Buffer	4			
IVT Labeling NTP mix	12			
IVT Labe□ling Enzyme mix	4			
Biotin ile işaretlenmiş cRNA'nın spektrofotometre ile miktar tayini				
cRNA fragmantasyonu				
cRNA (20µg)	1-21			
5X Fragmentation Buffer	8	40	94	35 min
RNase free water	Variable			
-20ºC saklanır				

Çizelge 3.6.1. devamı Mikroarray için kullanılan solüsyonlar ve amplifikasyon aşamaları

Çözelti	Miktar (µL)	Toplam (µL)	T (ºC)	Zaman
Hibridizasyon (Çipe yükleme)				
Fragmented cRNA (100 ng)	30	300	45	60 rpm,17saat
Control oligonucleotide B2 (3 nM)	5			
2X Euk Hybridization Control	15			
Herring Sperm DNA (10 mg/mL)	3			
BSA (50mg/mL)	2			
2X Hybridizaiton Buffer	150			
DMSO	30			
RNase-free Water	64			
Yıkama				
Wash A Buffer	200			
Boyama (SAPE soln)				
2X Stain Buffer	600	1200	25	
50 mg/mL BSA	48			
Streptavidin	12			
DI Water	540			
Boyama 2 (Antibody soln)				
2X Stain Buffer	300	600	25	
50 mg/mL BSA	24			
10 mg/mL Goat IgG	6			
0.5 mg/mL Biotinylated antibody	3.6			
DI Water	266.4			
Yıkama- boyama 2 saat , Array tarayıcıya yüklenir (15 dk)				

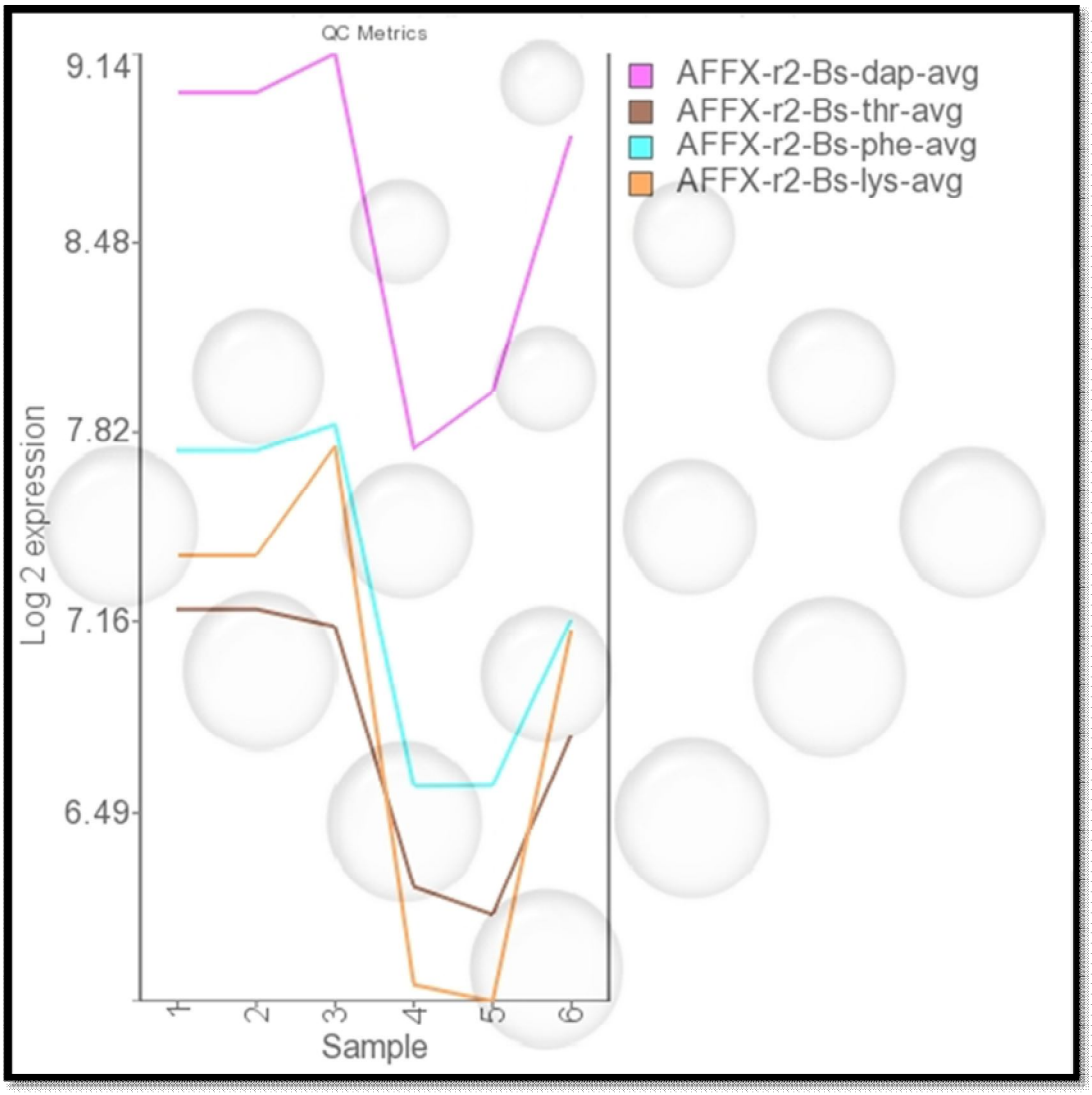
3.7. Mikroarray Analiz Çalışması

Çipler tarandıktan sonra, ham datanın analizi işlemine geçildi. Gen ekspresyon analizi için, Affymetrix® Arrays ve Partek® Genomics Suite™ 6.6 kullanıldı. Yapılan işlemler sırasıyla:

1. Affymetrix® CEL dosyası seçildi ve kalite kontrol yapıldı.
2. Belirleyici örnek gruplarının özellikleri eklendi.
3. Principal Component Analysis (PCA) kullanılarak grupların verdiği sinyallerin birbirine uzaklık-yakınlık ilişkileri belirlendi.
4. ND grubu KD ile, ZKD grubu da ZKD grubu ile karşılaştırıldı.
5. ANOVA kullanılarak anlamlı gen ekspresyon düzeyi değişimleri belirlendi.
6. İki kat ve üzeri artış gösteren ve iki kat ve üzeri azalış gösteren genlerin bir listesi oluşturuldu.
7. Gen listelerine genlerin ilişkili olabilecekleri yolaklar eklendi (Gene ontology).

3.7.1. Array Verilerinin Programa Aktarılması Ve Kalite Kontrol

Dosya için, Affymetrix® CEL dosyası seçildi ve bilgisayar programından indirildi. Gen ekspresyon çalışması yapılacağından, iş akış panelinden gen ekspresyon paneli seçildi. Ardından, ekspresyon paneliyle ilgili olan tüm CEL dosyaları indirildi. İndirilen bu dosyalardan, kullanılan çip ile ilgili olan dosya seçildi ve programdan uygun adımlar izlenilerek eklendi. Uygun dosya seçiminden sonra seçilen dosyaya uygun olarak, ratın tüm genomunu içeren mikroarray kütüphanesi indirildi. Bu işlemler gerçekleştirildikten sonra Affymetrix prob setlerinin kontrolü için, kullanılan örneklerin yoğunluğu belirlenmektedir. Şekil 3.7.1.1'de 6 örneğin logaritma değerinde yoğunlukları gösterilmektedir.



Şekil 3.7.1.1. Çipin kalite kontrol eğrisi

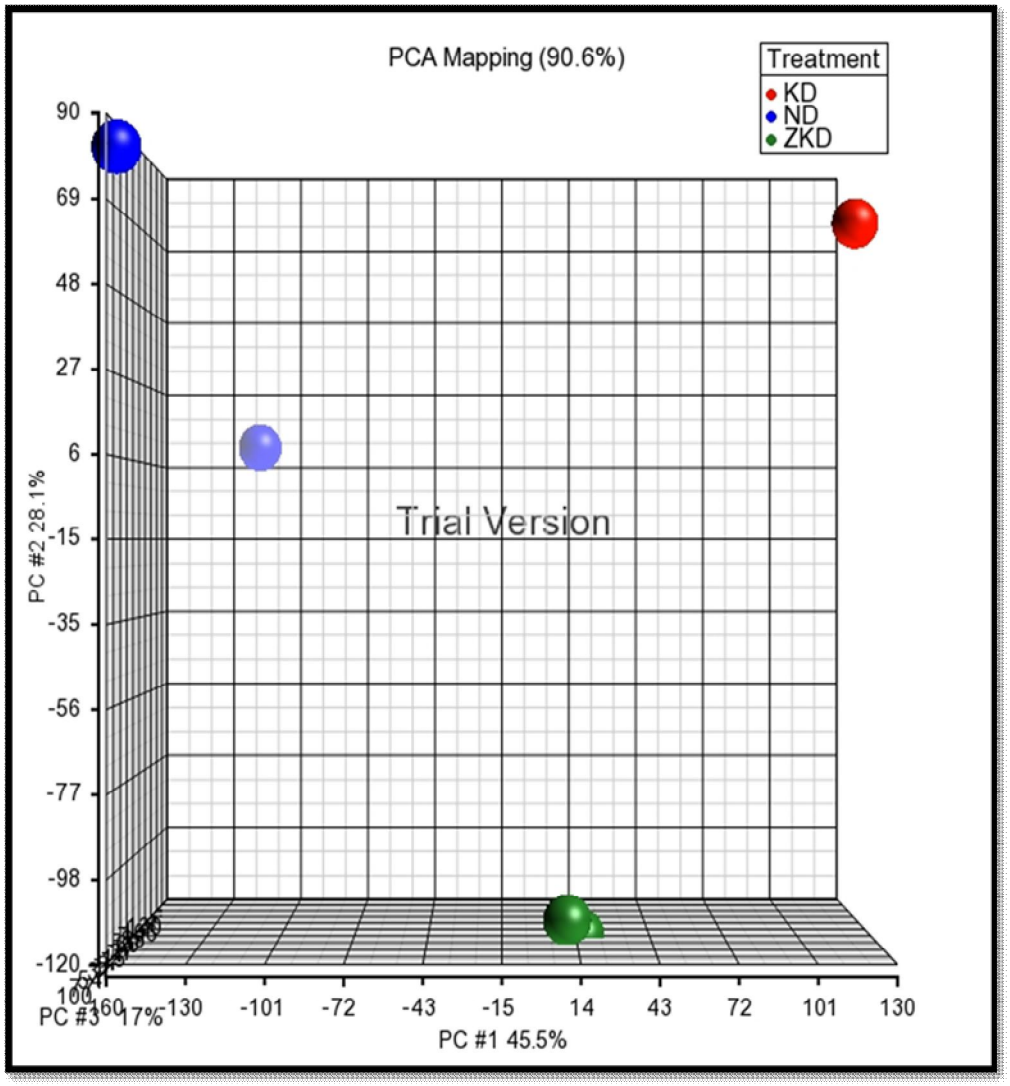
QC metrics, mikroarray verilerinin kalite güvencesini sağlamak için, Affymetrix çipleri üzerindeki deneysel ve kontrol problardan kalite kontrol bilgisini temin etmektedir. Şekil 3.7.1.1'e göre, kontrol genleri için QC metrics eğrisinin aynı çizgide devam etmesi hibridizasyon ve taramada bir problem olmadığını göstermektedir. Tüm veriler buradaki log2 değerleri kullanılarak % 75 dilim (percentile) normalizasyonuna tabi tutulmuştur.

3.7.2. Örnek Gruplarının Belirlenmesi

Deneyde kullanılan 6 adet örneğin 2'si ND grubuna, 2'si KD grubuna ve diğer 2'si de ZKD grubuna aittir. Her bir uygulama için 2 farklı rat ile çalışılmıştır. Analiz işlemi için yapılacak olan karşılaştırmalarda (KD / ND ve ZKD / KD), belirleyici rakamsal değerler ve renk verilmektedir. Örnek gruplarını belirlemek için, şekil üzerinde uygulamalar için ayrı renk belirlenmesi yapılmış ve KD uygulaması için, kırmızı; ND uygulaması için, mavi ve ZKD uygulaması için, yeşil renk seçilmiştir.

3.7.3. Veri Analizinin Uygulaması

Uygulamalara verilen belirleyici renklerle, gruplardan ortaya çıkan verilerin yakınlığı belirlenmektedir. Principal Component Analysis (PCA) denilen bu analizle farklı gruplardan gelen farklı sinyallerin uzaklıkları sınıflandırılmaktadır. Şekil 3.7.3.1'de ayrı ayrı, aynı diyet uygulaması yapılan her iki ratın ve tüm 6 ratın birbirleriyle olan genetik yakınlığı gösterilmektedir.



Şekil 3.7.3.1. Diyet uygulaması sonrasında elde edilen gen ifade değişim sinyallerinin birbirlerine olan yakınlığını gösteren kalite raporu

Şekil 3.7.3.1'e göre ND – 4 ve ND – 10 bireylerinin (mavi renkli noktalar) birbirlerine olan genetik yakınlığı %28.1; KD – 1 ve KD – 2 bireylerinin (kırmızı renkli noktalar) birbirlerine olan genetik yakınlığı %90.6; ZKD – 1 ve ZKD – 10 bireylerinin (yeşil renkli noktalar) birbirlerine olan genetik yakınlığı %45.5 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, diyetlere bağlı olarak bireysel farklılıklar saptanmıştır.

3.7.4. ANOVA (Analysis Of Variance) Kullanılarak Gen Ekspresyon Değişimlerindeki Anlamlı Farklılıklarının Belirlenmesi

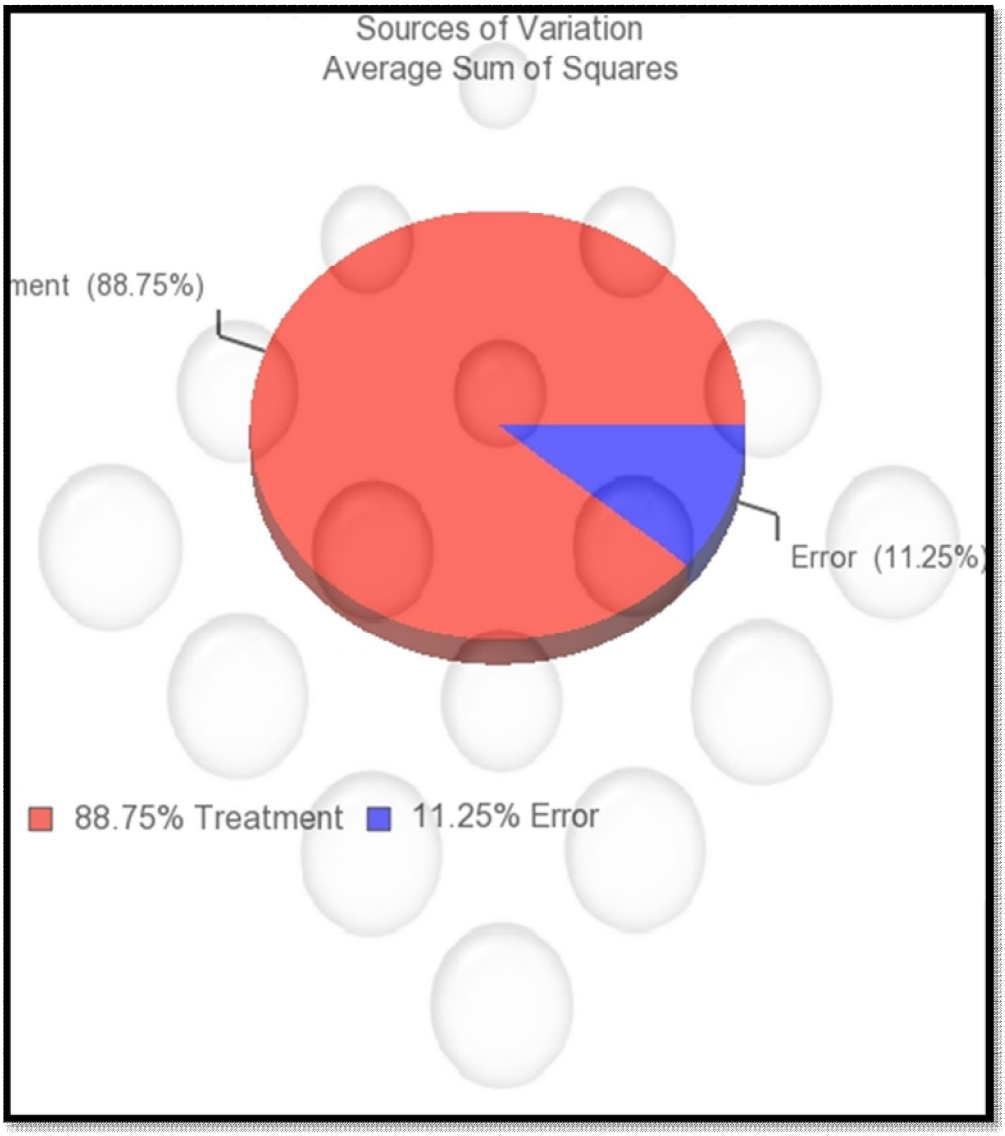
Bu aşamada, diyet uygulamalarına göre değişen gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için her bir diyet uygulamasına rakamsal değerler verilmektedir. Böylece KD/ND ve ZKD/KD oranları ileriki aşamalarda belirlendi. 3 uygulama için, 2 ayrı bireyler seçildiğinden 3 grup oluşturuldu ve bunlara rakamsal değerler verildi. Çizelge 3.7.4.1 bireylerin gruplanmasını ve rakamsal değerlerini göstermektedir.

Çizelge 3.7.4.1. Diyet uygulamalarına göre ratların sınıflandırılması ve verilen rakamsal değerler

Verilen rakamsal değer	**Diyet tipi (Treatment)**	**Birey numaraları**
1	KD	1
	KD	2
2	ND	4
	ND	10
3	ZKD	5
	ZKD	10

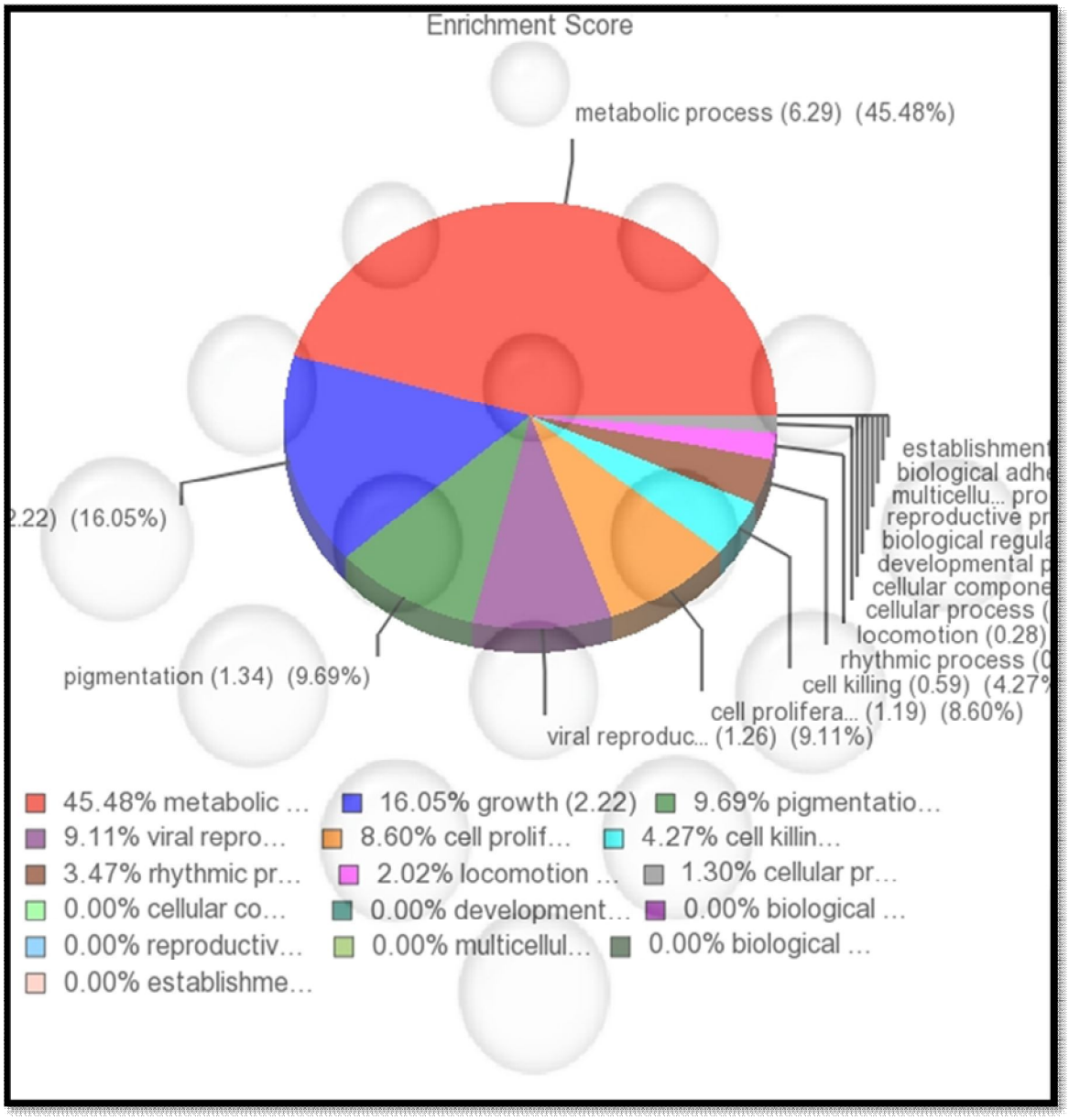
Rakamsal değerlerle 3 grup oluşturuldu ve her gruba iki farklı birey dahil edildi. Gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin belirlenmesi için (KD ve ND; ZKD ve KD ekspresyon düzeyi değişimi) bu üç gruptan elde edilen veriler karşılaştırıldı.

Grup 1 (KD), Grup 2 (ND) ve Grup 3 (ZKD) arasındaki farklılığın nedeni diyet uygulamasından kaynaklanmaktadır. Gruplandırma ile ANOVA kullanılarak ($p<0,05$) , diyete bağlı farklılık olup olmadığı da test edildi. Bu işlem için, programdan uygun olan basamaklar izlendi, uygulama (treatment) sekmesi seçildi. Program, Şekil 3.7.4.1'i oluşturdu ve böylece yapılan çalışmada kullanılan gruplar arasındaki farklılığın diyet uygulamasından kaynaklandığı (%88,75) belirlendi.



Şekil 3.7.4.1. Gen ekspresyon değişiminin diyet uygulamasından kaynaklandığını gösteren analiz

Yüksek yağlı diyet ve yağlı diyet ile birlikte zakkum distilatı uygulamasından sonra ekspresyon katsayısı değişen genlerin listesi oluşturuldu. Programda uygun adımlar izlenerek oluşturulan bu liste ile yaklaşık 3000'e yakın gende ekspresyon katsayısı değişikliği tespit edildi. Genlerin adı, genlerin katsayı değişikliği ve bu genlerin ekspresyonu ile ilgili bilgiler elde edildi. Bu bilgilere göre diyet uygulamasının hangi hücresel yolağa etki ettiği de belirlendi (Şekil 3.7.4.2)

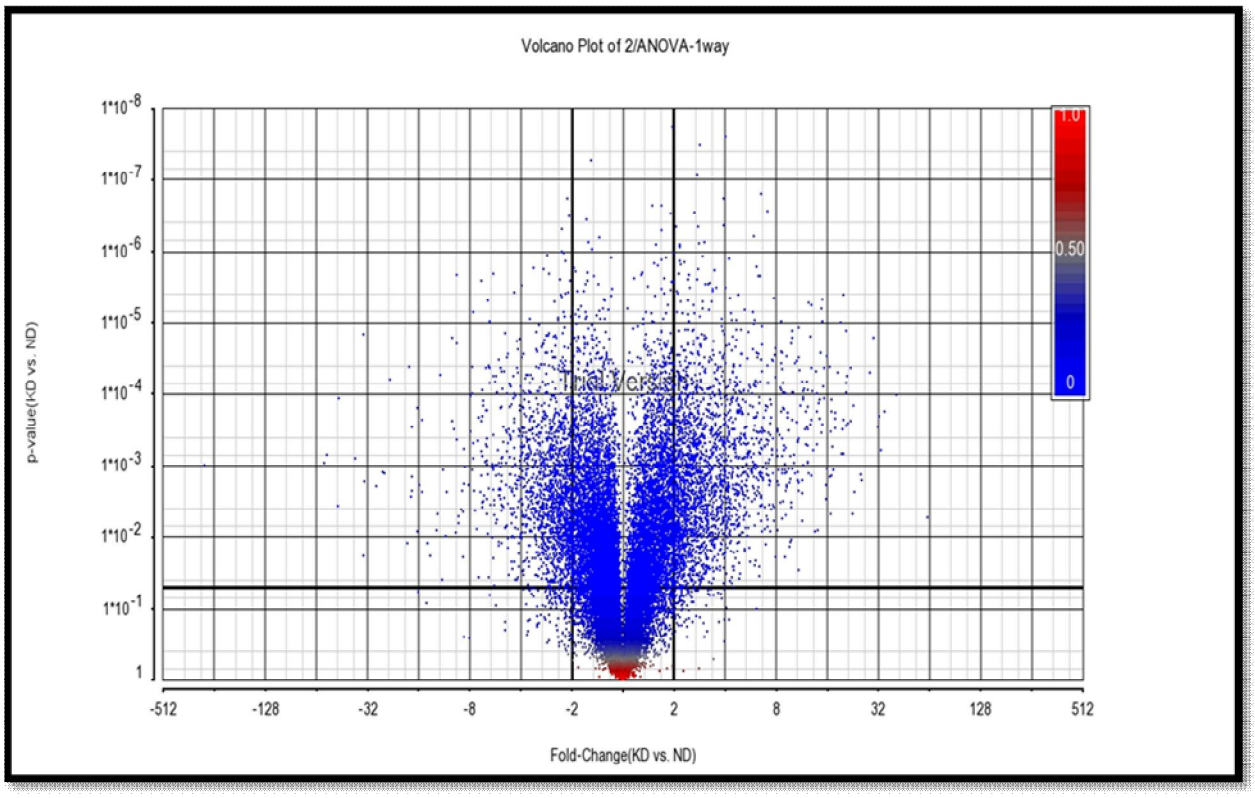


Şekil 3.7.4.2. Ekspresyon değişikliği gösteren genlerin biyolojik süreçteki ifadesini gösteren grafik

Şekil 3.7.4.2'ye göre, diyet uygulaması en çok metabolik yolakla ilgili genlerin ekspresyonunda etkili olmuştur (%45.48). Bu yüzdelik dilim içerisinde, kolesterol metabolizmasıyla direk ilişkili olan genler de yer almaktadır.

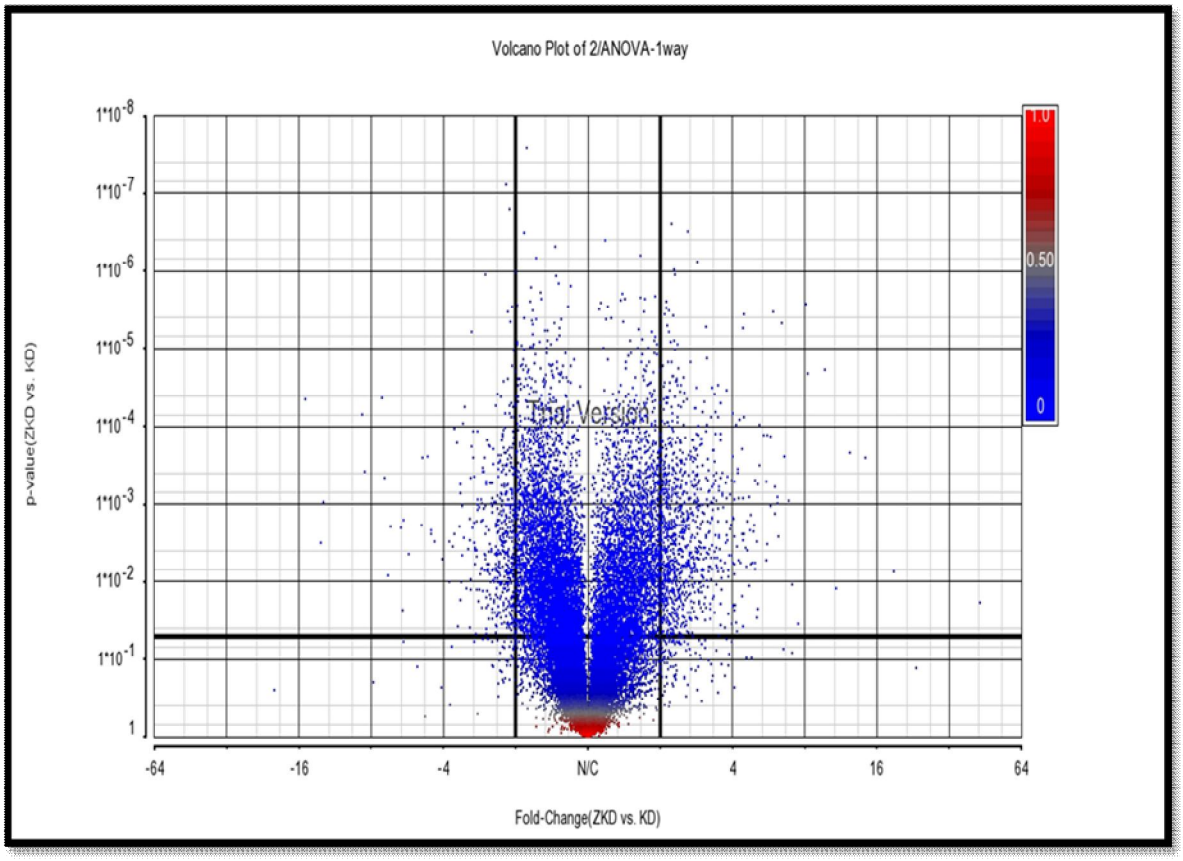
3.7.5. Gen listelerinin oluşturulması

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz çip ratlara ait tüm genomu içerdiğinden, genomdaki tüm ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler liste şeklinde oluşturuldu. Gen listesi oluşturulduktan sonra, listede yer alması istenilen değer aralıkları belirlendi. Bu belirlemeye göre, ekspresyon katsayısındaki azalışlar için '-2 – 0' değer aralığı; artışlar için ise, '0 – 2' değer aralığı yok sayıldı (Şekil 3.7.5.1 ve Şekil 3.7.5.2). Artış değerleri için +2 ve yukarı değerler; azalış değerleri için ise, -2 ve aşağı değerler baz alınarak gen listesi oluşturuldu.



Şekil 3.7.5.1. KD / ND ekspresyon değişikliğinin değer aralığı

Şekil 3.7.5.1 ve Şekil 3.7.5.2'de, ekspresyon katsayı değişimleri gösterilmektedir. Gen ekspresyon değişimlerinde -2 ve aşağı; +2 ve yukarı değişen değerler alınarak liste oluşturulmuştur. Mavi noktalardan her biri bir geni temsil etmekte ve grafikte her genin değişen ekspresyon katsayıları görülmektedir.



Şekil 3.7.5.2. ZKD / KD ekspresyon değişikliğinin değer aralığı

KD / ND ve ZKD / KD ekspresyon değişimleri ayrı ayrı dosyalanmıştır. Listede bulunan genler, genlere ait özellikler, genlerin kromozomdaki yerleri ve katsayı değişimleri bu listede otomatik olarak sunulmaktadır.

Gen listeleri de oluşturulduktan sonra, yaklaşık 3.000 adet genin ekspresyon katsayısında önemli değişiklik belirlendi. Çok çeşitli metabolik yollara ve biyolojik proseslere ait olan genler içerisinden lipid-kolesterol metabolizmasıyla ilgili genler belirlendi ve NO'nun bu genlerin ekspresyonu üzerindeki değişim katsayıları incelenerek bir tablo oluşturuldu (Çizelge 4.3.1).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları

TRI Reagent kullanılarak karaciğer dokularından izole edilen RNA'nın kalite ve miktarları Çizelge 4.1.1'de verilmektedir. Mikroarray basamaklarındaki cDNA eldesi için, RNA/protein (OD_{260} / OD_{280})oranının 1.7 ile 2 değerleri arasında olması gerekmektedir. Sonuçlara göre RNA örnekleri mikroarray analizinde kullanılabilecek kalitede ve yeterli miktardadır.

Çizelge 4.1.1. Karaciğer dokusundan izole edilen RNA'ların miktarları

Rat No	***OD_{260}***	***OD_{280}***	***OD_{260} / OD_{280}***	***Konsantrasyon (µg / ml)***
ND – 4	0,098	0,056	1,75	3911
ND – 10	0,063	0,037	1,72	2520
KD – 1	0,113	0,064	1,77	4523
KD – 2	0,107	0,061	1,76	4277
ZKD – 5	0,106	0,059	1,8	4254
ZKD – 10	0,151	0,085	1,78	6059

ND – 4: Normal diyet – 4 numaralı rat

ND – 10: Normal diyet – 10 numaralı rat

KD – 1: Kolesterol diyet – 1 numaralı rat

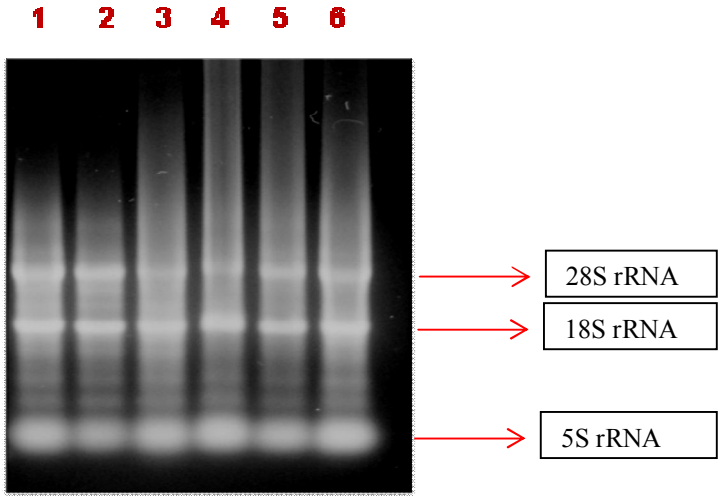
KD – 2: Kolesterol diyet – 2 numaralı rat

ZKD – 5: Kolesterol diyet + Zakkum – 5 numaralı rat

ZKD – 10: Kolesterol diyet + Zakkum – 10 numaralı rat

4.2. Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü

Karaciğer dokusundan izolasyonu yapılan toplam RNA'nın miktarı spektrofotometre ile belirlendikten sonra, varlığını ispatlamak için jel elektroforezi yapıldı. Elektroforez için gerekli aşamalar uygulandıktan sonra elde edilen agaroz jel, jel görüntüleme sisteminde görüntülenip fotoğrafı çekildi. Şekil 4.2.1 agaroz jeldeki RNA'nın varlığını göstermektedir.



Şekil 4.2.1. Toplam RNA'nın alt ünitelerinin agaroz jeldeki görünümü

1 nolu RNA: KD – 1

2 nolu RNA: KD – 2

3 nolu RNA: ND – 4

4 nolu RNA: ZKD – 5

5 nolu RNA: ND – 10

6 nolu RNA: ZKD - 1

Toplam RNA'nın agaroz jeldeki görünümünde, mRNA (mesajcı RNA) görülememektedir. Jeldeki görüntüde ribozomal RNA (rRNA)'nın alt üniteleri 5S, 18S ve 28S şeklinde gösterilmiştir.

4.3. Mikroarray Sonuçları

Mikroarray analizi sonuçlarına göre, yaklaşık 3000'e yakın gen ekspresyon düzeyinde artış ve azalış (up / down regulation) gözlemlendi. Genlerdeki ekspresyon katsayıları (fold change) 1,2'den 250 kata kadar değişiklik göstermektedir.

Kolesterol ve/ veya lipid metabolizması ile ilgili genler belirlendi ve bu genlerin ekspresyon katsayıları incelendi. Çizelge 4.3.1'de ekspresyon düzeyi değişen genler ve bu genlerin ekspresyon seviyelerine kolesterolün ve zakkumun etkileri listelenmiştir. Ayrıca genlerin kromozomlardaki yerleri de belirtilmiştir.

Çizelge 4.3.1'de KD / ND oranı, kolesterol diyeti uygulanan rattaki gen ekspresyonunun, normal diyet uygulanan rattaki gen ekspresyonuna göre artış ya da azalış katsayısını; ZKD / KD ifade oranı ise, kolesterol diyeti uygulamasından sonra zakkum ekstresi verilmiş olan rattaki gen ekspresyonunun, sadece kolesterol diyeti uygulanan rattaki gen ekspresyonuna göre artış ya da azalış katsayısını göstermektedir. İfade oranlarındaki ' - ' değerler ekspresyon düzeyindeki azalışı; ' + ' değerler ise artışı ifade etmektedir.

Çizelge 4.3.1. Ekspresyon düzeyi değişen genler ve eksresyon katsayıları

Gen kodu	Gen sembol	Gen adlandırması	Kromozomdaki yeri	KD/ND oranı	ZKD/KD oranı
1368878_at	IDI1	İzopentenil-difosfat delta izomeraz 1	Chr17 q12.1	-47,9795	2,13765
1387017_at	SQLE	Skualen epoksidaz	Chr7 q33	-18,6796	1,23256
1369072_at	ADH7	Alkol dehidrogenaz 7	Chr2 q44	-18,3132	3,29024
1387020_at	CYP51	Sitokrom P450, familya 51	Chr4 q13	-15,9456	1,14688
1367932_at	HMGCS1	3-hidroksi-3-metilglutaril-Koenzim A sentaz 1	Chr2 q16	-15,2888	2,11132
1368275_at	SC4MOL (MSMO1)	Sterol-C4-metil oksidaz-benzeri	Chr16 p13	-14,1279	1,31237
1370024_at	FABP7	Yağ asidi bağlanma proteini 7	Chr20 q11	-13,7695	1,64505
1372462_at	ACAT2	Asetil-Koenzim A asetil transferaz 2	Chr1	-12,4534	1,4839
1385165_at	CYP39A1	Sitokrom P450, familya 39, alt familya A, polipeptid 1	Chr9 q12	-11,5175	4,25383
1370420_at	SRD5A1	Siteroid-5-alfa-redüktaz	Chr17 p14	-8,95573	1,4994
1387926_at	SC5DL	Sterol-C5-desaturaz	Chr8	-8,7382	1,55655
1375944_at	ACSS2	Asil-CoA sentetaz kısa-zincir familya numarası 2	Chr3 q42	-8,69376	-1,04376
1377758_at	HSD17B7	Hidroksi steroid (17-beta) dehidrogenaz 13	Chr13 q24	-7,20858	1,32569
1368924_at	GHR	Büyüme hormon reseptörü	Chr2 q16	-6,34492	3,04821
1367857_at	FADS1	Yağ asidi desaturaz 1	Chr1 q43	-5,82904	1,45405
1385640_at	PCSK9	Proprotein konvertaz subtilisin / keksin tip 9	Chr5 q34	-5,81218	1,00
1372973_at	LSS	Lanosterol sentaz	Chr20 p12	-5,7176	1,02793

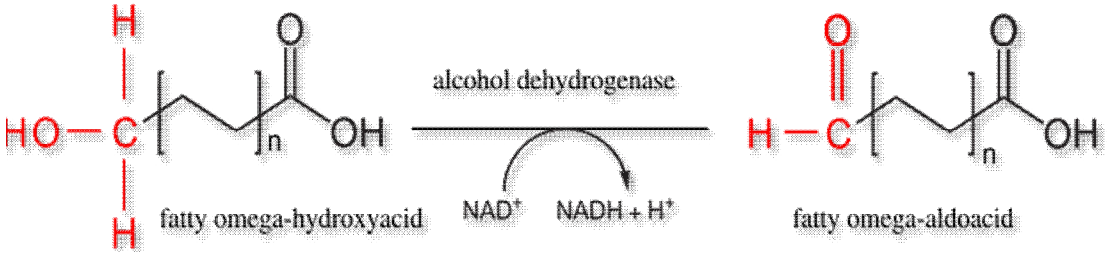
1369111_at	FABP1	Yağ asidi bağlanma proteini 1	Chr4 q32	-5,2207	2,92218
1371137_at	ACOX2	Asil- CoA oksidaz 2	Chr15 p14	-5,17646	2,86426
1389906_at	FDFT1	Farnesil difosfat farnesil transferaz 1	Chr15 p12	-4,31868	1,27985
1375852_at	HMGCR	3-hidroksi-3-metilglutaril-Koenzim A redüktaz	Chr2 q12	-4,22593	1,13159
1372156_at	TMEM97	Transmembran protein 97	Chr10 q25	-2,51418	-1,11774
1389611_at	VLDLR	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü	Chr1 q51	2,27702	-1,13428
1388253_at	SCD	Stearoil-CoA desaturaz	Chr1 q54	2,31226	-1,55733
1390850_at	ADFP (PLIN2)	Adipoz diferansiyasyon,ilişkili protein	Chr9 p22.1	2,62028	-1,65654
1398250_at	ACOT1	Asil-Coa tiyoesteraz 1	Chr6 q31	3,22276	-2,20009
1374976_a_at	SOAT1	Sterol O-asiltransferaz 1	Chr13 q21	5,05448	-1,13984
1368669_at	UCP2	Ayırıcı protein 2	Chr1 q32	5,40454	-2,57496
1377163_at	INHBB	İnhibin beta-B	Chr13 q11	5,32007	-1,51845
1372476_at	FADS3	Yağ asidi desaturaz 3	Chr1 q43	5,35974	-1,90917
1374770_at	ASAH1	N-asilsfingosin amidohdrolaze (asit seramidaz) 1	Chr16 q12.1	5,75322	-1,4258
1368027_at	TBXAS1	Tromboksin A sentaz 1	Chr4 q21-q22	6,33285	-2,45866
1368103_at	ABCG1	ATP-bağlayan protein, alt familya G, numara 1	Chr20 p12	6,53982	-1,16111
1384381_at	ABCA1	ATP-bağlayan protein, alt familya A (ABC1), numara 1	Chr5 q24	6,91361	-2,16995
1369953_a_at	CD24	CD24 molekül	Chr20 q13	7,21271	-1,34267
1370695_s_at	TRIB3	tribbles homolog 3 (Drosophila)	Chr3 q41	7,91079	-2,21907
1392308_at	PLA2G2D	Fosfolipaz A2, grup IID	Chr5 q36	9,21499	-3,19585
1370355_at	SCD1	Steroil-CoA desaturaz 1	Chr1 q54	10,1676	-1,37048

1367631_at	CTGF	Bağ doku büyüme hormonu	Chr1 p12	10,2558	-1,1138
1370281_at	FABP5	Yağ asidi bağlanma proteini 5	Chr2	10,7275	-1,26544
1391435_at	PLTP	Fosfolipid transfer protein	Chr3 q42	13,8361	-1,87382
1367942_at	ACP5	Asit fosfataz 5	Chr8	14,3874	-2,22882
1371961_at	PLD3	Fosfolipaz D ailesi, numara 3	Chr1 q21	19,563	-2,96287
1386965_at	LPL	Lipoprotein lipaz	Chr16 p14	19,7514	-1,06221
1368271_a_at	FABP4	Yağ asidi bağlanma proteini 4, adiposit	Chr2 q23	40,7531	-1,42334

IDI1 geni: Mikroarray analiz sonuçlarına göre yüksek yağlı diyet uygulanmış ratlardaki izopentenil-difosfat delta izomeraz 1'i kodlayan IDI1 geninin ekspresyonu 48 kat azalmıştır. IDI1 geni, IPP1 (İnorganik pirofosfataz 1) olarak bilinen, 227 amino asitlik parçadan oluşmakta ve kolesterol biyosentezinde rol oynamaktadır. IDI1, farnesil difosfat ve sonunda kolesterol sentezindeki art arda reaksiyonlar için substrat olan dimetilalil difosfat (DMAPP) ve izomeri olan izopentil difosfatı (IPP) birbirine dönüştürebilen, peroksizomda lokalize olmuş geni kodlar. IPP'nin DMAPP'ye izomerizasyonu, tüm yaşayan organizmalardaki biyosentetik yollarda hayati rol oynayan izoprenoid ve izoprenid sentezinde çok kritiktir (Bach, 1995). Bu durum izoprenoid biyosentezindeki mevalonatın öneminden kaynaklanmaktadır (Ramos-Valdivia ve ark., 1997). Yüksek yağlı diyet uygulaması sonucu oluşan IDI1 gen ekspresyonundaki 48 kat azalışa karşılık, yağlı diyet ile verilen NO diyeti, IDI1 gen ekspresyonunu yaklaşık 2 kat ND grubuna yaklaştırmıştır. Zakkum diyeti bu anormal azalışı normale dönüştürmek üzere gen ekspresyon düzeyinde artışa neden olmuştur.

SQLE geni: Skualen epoksidaz enzimi (SQLE) kolesterol biyosentezinde rol oynayan, NADPH ve moleküler oksijeni kullanıp, skualeni 2,3-oksidoskualene çeviren bir enzimdir. Bu enzim, sterol biyosentezinde hız sınırlayıcı etkiye sahip bir enzimdir. Gen ekspresyonu, yüksek yağlı diyetle yaklaşık 18 kat azalmıştır. Yani karaciğerde metabolik olarak kolesterolün sentezine ihtiyaç duyulmamasıyla gen ifadesi azalmıştır. NO distilatı katkısının ekspresyon düzeyine anlamlı bir etkisi olmamıştır.

ADH7 geni: Alkol dehidrogenaz 7, ADH7 geni tarafından sentezlenen bir enzimdir (Satre ve ark., 1994). Alkol dehidrogenaz enzimleri etanol, retinol, diğer alifatik alkoller, hidroksistreoidler ve lipit peroksidasyon üyelerini içeren çeşitli substratları metabolize eder. Alkol dehidrogenaz enzimleri aşağıdaki reaksiyonu katalizler.



Mikroarray sonuçlarına göre ADH7 enzimini kodlayan gen yüksek yağlı diyet ile yaklaşık 18 kat azalmıştır. Bu azalışın yağ asit metabolizmasında azalışa neden olduğu söylenebilir. Zakkum distilatı katkılı diyet ise bu azalışın yaklaşık 3 kat normal düzeye çıkarmıştır.

CYP51 geni: Sterol 14 alfa dematilaz (sitokrom P450 ailesi proteini, CYP51) kolesterol sentezinin metabolik yolunda görev yapan lanosterol ya da 24,25-dihidrolanosterolün demetilasyonunu katalizler (Strömstedt ve ark., 1996) ve lanosterolü kolesterole çevirir. CYP51, evrimsel korunmuş, hayvanlarda kolesterol biyosentezinde görev alan sitokrom P450 gen ailesinde sürekli eksprese edilen bir gendir (Rozman, 2000).

CYP51'i kodlayan gen ekspresyonu yüksek yağlı diyetle yaklaşık 16 kat azalış göstermiş fakat NO uygulamasının bu ifade düzeyine önemli bir etkisi olmamıştır. Ratlara yüksek yağlı bir diyet uygulandığı için kolesterolün metabolik olarak ayrıca sentezlenmesine bir gereksinimi kalmaması, bu genin ekspresyonunun düşmesine neden olmuş olabilir.

HMGCS1geni: 3-hidroksi-3-metilglutaril-Koenzim A sentaz 1 enzimini kodlamakta olup, kolesterolün sentezinde önemli bir gendir. Kolesterolün asetil-CoA'dan oluşumu dört basamakta gerçekleşir. İlk basamakta asetattan mevalonat sentezlenir; daha sonra asetil-KoA kondanslenerek asetoasetil-KoA'yı oluşturur, bu da üçüncü bir asetil-KoA molekülüyle birleşerek altı karbonlu bir bileşik olan 3-hidroksi-3-metilglutaril-KoA (HMG-KoA)'yı oluşturur. Sırasıyla tiyolaz ve HMG-KoA sentaz tarafından katalizlenen bu tepkime tersinirdir ve hücrede kolesterol ve diğer izoprenoit bileşiklerin sentezini gerçekleştirir. Üçüncü tepkime kontrol altında tutulan basamaktır: iki molekül NADPH'ın her birinin iki elektron vermesiyle HMG-KoA'nın mevalonata indirgenmesi. Düz ER integral bir zar proteini olan HMG-KoA redüktaz, kolesterol biyosentezi yolunda önemli bir düzenleme noktasıdır.

HMGCS1 enzimi keton bileşiklerinin üretimi için mitokondriyal matrikste lokalize olmuştur. Sitosterolemia hastalığı, doku ve plazmada anormal sterol konsantrasyonu artışıdır. Hastalar bastırılmış hepatik aktivite ile ilişkili vücut kolesterol biyosentezi azalmasına sahiptir. Yüksek yağlı diyet uygulanan ratlarda 15 kat azalmıştır, bu azalışın sebebi yüksek yağlı diyetin kolesterol biyosentezinin aşağı regülasyonuna sebep olmasından kaynaklanabilir. NO içerikli yağlı diyet bu azalışı 2 kat normal düzeye yaklaştırmıştır.

SC4MOL geni (Msmo1 (methylsterol monooxygenase 1)): Bu gen, kolesterol sentez yolunda C4-metilsterollerin demetilasyonunu katalizleyen SMO (sterol-C4-metil oksidaz) kodlar (He ve ark., 2011). SMO eksikliği, kolesterol sentez yolunda klinik olarak belirlenmiş biyokimyasal bozukluk gösterir (He ve ark., 2011).

Son zamanlardaki çalışmalar, pro-kolesterol sterollerini ve hücre zarındaki kolesterolce zengin kısımlardaki sterollerin bazıları ile kolesterolün yer değiştirmesinde anahtar rol oynadığını göstermektedir (Rakheja ve Boriack, 2008). Yapılan çalışmalarda proteinin endoplazmik retikulum membranında lokalize olduğu ve kolesterol biyosentezinde fonksiyonu olduğu gösterilmiştir (He ve ark., 2011).

Mikroarray sonuçlarına göre genin anlatımı 14 kat azalmıştır. Yüksek yağlı diyet, kolesterol fazlası nedeniyle kolesterol sentez yolunda kolesterol üretiminin azalmasına ya da herhangi bir bozukluğa neden olmuş olabilir. NO uygulaması ise genin ekspresyonunu yaklaşık 1,5 kat normal seviyeye yaklaştırmıştır.

FABP7 geni: Genin kodladığı yağ asidi bağlanma proteini 7 (FABP7), ayrıca beyin yağ bağlama proteini (BLBP), bir beyin yağ asidi bağlanma proteinidir. FABP ailesi, uzun yağ zincirlerini ve hidrofobik ligandları bağlayan, küçük, yüksek korunmuş sitoplazmik proteinden oluşmaktadır. FABP'ler yağ asidinin içeri alımında, taşınmasında ve metabolizmasında önemli rol oynar. FABP7 üzerinden yürütülen iki çalışmada, FABP7'nin şizofreni için bir risk olabileceği gösterilmiştir.

Mikroarray sonuçlarına göre genin ekspresyonunda yaklaşık 14 kat bir azalış gözlenmiştir. Bu da yağ asiti birikmesine neden olmuş olabilir. Buna karşılık yüksek yağlı diyet ile uygulanan zakkum ekstresi genin ekspresyonunu yaklaşık 1,5 kat normalleştirmiştir.

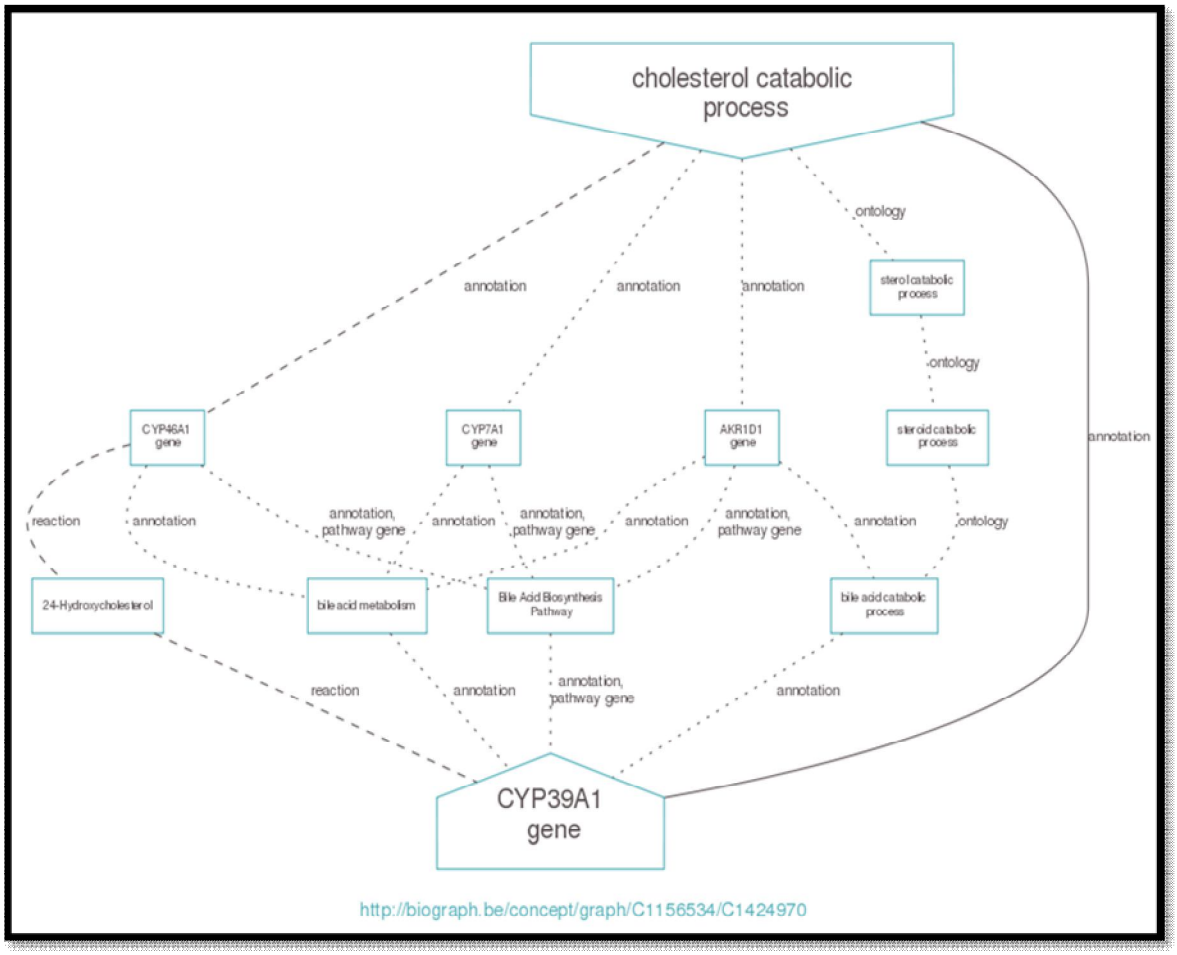
ACAT2 geni: SOAT enziminin hayvanda iki izoformu bulunmaktadır: ACAT1 ve ACAT2. Asetil-CoA asetiltransferaz 2, ayrıca sitozolik asetoasetil-CoA tiyolaz olarak da bilinen ve ACAT2 geni tarafından kodlanan bir enzimdir (Morel ve ark., 1989). ACAT2, lipoproteinlerin bir kısmını içeren kolesterol esterlerinin sentezinden sorumludur. Bu genin ürünü olan enzim, lipit metabolizmasını ve kodladığı sitozolik asetoasetil-CoA tiyolazı içerir.

Enzim, propiyonil-CoA ve asetil CoA'yı 2-metil-asetoasetil-CoA'ya dönüştürerek izolösin kırmada son basamağı katalizler. Ketolizis boyunca, bir asetoasetil-CoA'yı iki molekül asetil CoA'ya dönüştürür.

Enzimin aktivitesi kolesterol metabolizmasının regülasyonunda rol oynamaktadır. Yüksek kolesterol enzimin aktivitesinin baskılanmasına; düşük

kolesterol ise aktivite artışına sebep olmaktadır. Yapmış olduğumuz mikroarray sonuçlarına göre yüksek yağlı diyet sonrasında artan kolesterol, ACAT2 geninin ekspresyonunu 12 kat azaltmıştır. Bu durumda, diyetle alınan kolesterol sonucunda hücre içi kolesterol üretiminin regülasyonu için ACAT2 geninin ekspresyonu azalmış olabilir. Uygulanan NO katkılı diyet ise genin ekspresyonunu normale döndürme etkisi göstererek, yaklaşık 1,5 kat normal düzeye çekmiştir.

CYP39A1 geni: CYP39A1 (sitokrom P450, familya 39, alt familya A, polipeptid 1), enzimlerin sitokrom P450 ailesinin bir üyesini kodlar (Anonymous, 2012). Sitokrom P450 proteinleri, kolesterol, steroidler ve diğer lipitlerin sentezini ve ilaç metabolizmasını içeren pek çok reaksiyonu katalizleyen monooksigenaz proteinleridir (Anonymous, 2012). Genin kolesterol katabolizması 4.3.1'de gösterilmektedir. Bu ER proteinleri, kolesterolün safra asitine dönüşümünde görev alır (Anonymous, 2012). CYP39A1 enzimi, fare ve insanda eksprese edilen, 24-hidroksikolesterol sentezi için tercih edilen bir enzimdir (Henegouwen ve ark., 2001). Bu çalışmada yağlı diyet sonrası, CYP39A1 geninin ekspresyonunda yaklaşık 11,5 kat bir azalış saptanırken, yüksek yağlı diyet ile uygulanan zakkum ekstresinin genin ekspresyonunu 4 kat arttırdığı gözlenmiştir. Gen ifadesindeki azalış yüksek yağlı diyet sırasında kanda bulunan yağ ve yağın metabolize edilmesi sonucu oluşan safra asitleri seviyesinin yüksek olmasından dolayı, kolesterolü safra asidine dönüştüren enzimin aktivitesine metabolik olarak fazla gerek duyulmamasından kaynaklı olabilir. NO distilatının gen ifadesini yaklaşık 4 kat normal seviyeye çıkarması ise dikkate değerdir.



Şekil 4.3.1. CYP39A1 geni ve kolesterol katabolizması (Anonymous, 2010)

SRD5A1 geni: 3-okso-5-alfa-steroit 4-dehidrogenaz 1 (SRD5A1), steroid-5-alfa-redüktaz enzimini kodlar. SRD, testesteronu daha güçlü bir androjen olan, dihidrotestesterone dönüşümünü katalizler. Yüksek yağlı diyet bu genin ekspresyonunu 9 kat azaltmıştır. NO ise genin ekspresyonunu 1,5 kat normale döndürmüştür. Sonuç olarak yüksek yağlı diyet, testesteron dönüşümünü etkileyerek, dihidrotestesteron miktarını azaltmış olabilir.

SC5DL geni: Latosterol oksidaz, insanda ve farede SC5DL (sterol-C5-desaturaz) geni tarafından kodlanan bir enzimdir (Matsushima ve ark., 1997). Bu enzim kolesterol biyosentezinde rol oynar. Kodlanan protein, latosterolün 7-dehidrokolesterole dönüşümünü katalizler.

Latosterol, plazma ya da serumda ölçülebilen bir kolesterol habercisi olup, kolesterol üretiminin geçerli tek belirtecidir. Kolesterol seviyesi yüksek olan insanlarda, latosterol miktarı da yüksektir. Yağlı diyet sonrası SC5DL geninin ekspresyonunda azalış gözlenmiştir. Diyet sonrasında gen ekspresyonu yaklaşık 9 kat azalmış, yüksek yağlı diyetle birlikte uygulanan zakkum ekstresi ise genin ekspresyonunu 1,5 kat normale yaklaştırmıştır. Genin kodladığı enzimin ekspresyonundaki azalış, vücutta kolesterol üretiminin azalmasının habercisidir. Bu azalma, yüksek yağlı diyetten dolayı alınan kolesterole karşılık, vücutta üretimini azaltarak kolesterol sentezinin regülasyonu için olabilir.

ACSS2 geni: ACSS2 (asil-CoA sentetaz kısa-zincir familya 2) geni, lipit sentezinde ve enerji üretiminde kullanılan asetatın aktivasyonunu katalizleyen sitozolik bir enzim olan asetil-CoA sentetaz enzimini kodlar. Bu enzim bir monomer gibi rol oynar ve yağ asit sentezi yolunda, asetattan asetil-CoA üretir. Reaksiyon ATP gerektiren bir reaksiyondur. Asetil-CoA sentetaz, endoplazmik retikulum membranları ve mitokondriyal membranlar ile ilişkilidir, uzun yağ asitlerinin aktivasyonunu katalizler.

Genin ekspresyonu kolesterol ve doymamış yağ asitlerinin sentezi için gereken sterol düzenleyici element-bağlı proteinler aracılığıyla regüle edilir (Luong, 2000). Yağ asit sentezi bu genin regülasyonunda rol oynamaktadır ve yağlı diyet sonrası genin ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Diyetle alınan yüksek yağ uygulamasıyla genin ekspresyonu 8,5 kat azalmıştır. Yağlı diyet uygulaması genin aktivitesini etkileyerek, yağ asit aktivasyonunu azaltmış olabilir. NO uygulaması ise, azalan gen ekspresyonuna anlamlı bir etkide bulunmamıştır.

HSD17B7 geni: Hidroksi streoid (17-beta) dehidrogenaz 13, memelilerde östrojen ve androjenleri yükseltgeyen veya indirgeyen ve steroidlerin biyolojik potansiyelini düzenleyen enzimi kodlar. *In vitro* şartlarda bu enzimin estrondan estradiol (17- ketosteroid redüktaz aktivitesi) ve zimosterondan zimosterole dönüşümünü katalizlediği gösterilmiştir (Henegouwen ve ark., 2001). Veriler HSD17B7 eksikliğinin, *in vivo* şartlarda, fare embriyosundaki kolesterol biyosentezinde bir azalmaya yol açtığını göstermektedir (Henegouwen ve ark., 2001). *In vivo* ve *in vitro* olarak yapılan çalışmalarda, zimosterolün hayvan dokularındaki kolesterolün etkili bir öncü maddesi olarak hizmet ettiği gösterilmiştir (Ulrike ve ark., 1981). Yapılan çalışmalarda kolesterol biyosentezi için, zimosterolün önemli ölçüde gerekli olduğu ispatlanmıştır (Ulrike ve ark., 1981).

Mikroarray sonuçlarına göre genin ifadesinde 7 kat azalma gözlenmiştir. Diyetle alınan yüksek yağ miktarı kolesterol düzeyini artırarak, enzimin aktivitesini azaltmış ve bu durum kolesterol biyosentezinde bir azalmaya neden olmuş olabilir.

GHR geni: Büyüme hormon reseptör (GHR) geni, büyüme hormonu için transmembran proteini kodlar. Büyüme hormonunun reseptöre bağlanması, reseptörün dimerizasyonuna ve büyümedeki hücre içi ve dışı sinyal transdüksüyon yolunun aktivasyonuna yol açar.

Yapılan bir çalışmada, insan büyüme hormonu salgısındaki plazma serbest yağ asidi konsantrasyonunun salgısı araştırılmıştır (Hans-Jürgen ve ark., 1972). Çalışma ayrıca FFA eksikliğinin, FFA azalması ve HGH (insan büyüme hormonu) artması arasındaki gecikme periyoduna rağmen, FFA'nın, HGH salınımı için bir sinyal olabileceği önerisini sunmaktadır (Hans-Jürgen ve ark., 1972). Bu verilere göre, mikroarray sonuçlarında gözlemlenen GHR genindeki azalış olasıdır. Yağ asitlerinin varlığının, GHR geninin ekspresyonunda bir azalışa neden olması beklenmektedir ve çalışma sonucunda da yaklaşık 6 kat azalma saptanmıştır. Diyete eklenen zakkum ekstresi ise genin ekspresyonunu 3 kat normale döndürmüştür, bu da NO'nun yağlı diyetin etkisini azaltıcı bir rolü olduğunu göstermektedir.

FADS1 geni: Yağ asidi desaturaz enzimleri yağ asit zincirinin belirli karbonları arasındaki çift bağları tanır ve bu yağ asitlerinin satürasyonunu regüle ederler. FADS1 (yağ asidi desaturaz 1) ve FADS2 (yağ asidi desaturaz 2) deki SNP'ler uzun zincirli poliunsature yağ asit metabolizmasına etki ederler ve atopik hastalıkların gelişiminde potansiyel bir rol oynarlar (Lattka ve ark., 2009). İnsan vücudunda bulunan desaturaz ve elongaz enzimleri ile alfa-linolenik asit, ekosapenaoik asit ve dokosaheksaenoik asit gibi aktif metabolitlere dönüştürülür. Bu uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri, özellikle görme fonksiyonu ve sinir sistemi gelişiminde çok önemlidir (Lattka ve ark., 2009).

Mikrorray sonuçlarında, yüksek yağlı diyet uygulamasının ardından FADS1 geninin ekspresyonunda yaklaşık 6 kat azalış görülmektedir. Yüksek yağlı diyet ile birlikte uygulanan zakkum ekstresi ise azalan ekspresyonu yaklaşık 1,5 kat artırmıştır. Bu durum ratlarda görme ve sinir fonksiyonlarında bir değişim gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir.

PCSK9 geni: Proprotein konvertaz subtilisin/keksin tip 9 (PCSK9) ile kodlanan protein, ER'de otokatalitik intra moleküler proseslere uğrayan çözünmüş zimojen sentezinde rol alır (Seidah ve ark., 2003). Bu protein kolesterol metabolizmasında rol

oynayan, önemli bir regülatördür (Seidah ve ark., 2003). PCSK9'un keşfi, LDL metabolizmasında ve plazma LDL-K miktarının belirlenmesinde yeni anlayışlar sağlamıştır (Jay ve ark., 2007). LDL-K plazma miktarları, insanda kolesterol taşıyan lipoproteinler ve LDL üretim miktarları ile belirlenmektedir (Jay ve ark., 2007).

PCSK9, epidermal LDLR (low-density lipoprotein reseptör) büyüme faktörünü bağlar. Azalan LDLR miktarı hiperkolesterolemiye sebep olur (Seidah ve ark., 2003). PCSK9 karaciğerde LDL reseptörlerini parçaladığı bilinen bir serin proteazdır (Jay ve ark., 2007). Dolayısıyla plazmadaki LDL miktarını kontrol eder (Jay ve ark., 2007). PCSK9 fonksiyonunun inhibisyonu, kolesterol miktarının azalmasına yol açtığı bildirilmiştir (Abifadel ve ark., 2003). Gendeki mutasyonların, proteaz aktivitesinin artması, LDL reseptörü miktarının azalması ile hastalıklara yol açtığı görülmekte, böylece hücrelerdeki kolesterolün alınımı önlenmektedir (Steinberg ve Witztum, 2009). Yaptığımız çalışmada yağlı diyet ile PCSK9 geninin ekspresyonunda 5 kat azalış saptanmıştır. Bu azalış, yağlı diyet sonrası artan kolesterolün, PCSK9 geninin görevi gereği, hücrelere alınımı engellemek için olabilir. NO uygulaması ise, genin ekspresyonunu etkilememiştir.

LSS geni: LSS geninin kodladığı lanosterol sentaz enzimi, (S)-2,3-oksidoskualeni protosterol katyonuna ve sonunda da lanosterole dönüştüren bir oksidoskualen sikloz enzimidir (Dean ve ark., 1967). Böylece glukokortikoidler, progestonlar, androjenler ve östrojenleri öncü maddelerine dönüştürmüş olur. Enzim ökaryotlarda ER membranının sitozolik alanlarına bağlıdır (Ruf ve ark., 2004). Lanosterol, kolesterol biyosentezinde bir kilit steroldür (Huff ve Telford, 2005; Yamamoto ve ark., 1969). Kolesterol biyosentezindeki bu rolü nedeniyle kolesterol sentez inhibitörleri ile ilişkilidir (Thoma ve ark., 2004).

Mikroarray sonuçlarına genin ekspresyonu yaklaşık 5,5 kat azalmıştır. Lanosterol, kolesterol sentez basamağında oluşmaktadır ve yağlı diyet sonrasında vücutta kolesterol sentezinin azaltılması için genin ekspresyonu azalmış olabilir. Ayrıca, bu azalış, lanosterolün glukokortikoidler, progesteronlar gibi maddelerin öncü maddesi olduğundan, bu maddelerin üretimlerinin de azalması olasıdır. Yağlı diyet ile birlikte uygulanan NO distilatı katkısı ise genin ekspresyonunu etkilememiştir.

FABP1 geni: Yağ asidi bağlanma proteini 1, ayrıca karaciğer-tip yağ asit bağlanma proteini (L-FABP) olarak da bilinen, FABP1 geni tarafından kodlanan bir proteindir (Weickert ve ark., 2007; Chen ve ark., 1986). FABP'ler yağ asidi alımında, taşınmasında ve metabolizmasında önemli rol oynar. FABP1 ve FABP6 (bağırsakta

bulunan yağ asit bağlanma proteini) ayrıca safra asitlerini bağlar. L-FABP insanda proksimal tübüllerde eksprese olur ve andojen antioksidatif fonksiyona sahiptir (Matsui ve ark., 2011).

Mikroarray sonuçlarına göre, yağlı diyet sonrasında genin ekspresyonu 5 kat azalmıştır. Yüksek yağlı diyetten kaynaklanan ve biriken yağ asidi metabolizması veya taşınması bu nedenle azalmış olabilir. Ratlara yüksek yağlı diyetle birlikte verilen zakkum ekstresi ise genin ekspresyonu 3 kat normale dönüştürerek yağlı diyetin etkisini ciddi ölçüde azaltmıştır.

ACOX2 geni: Asil-CoA oksidaz 2 (ACOX2) geni peroksizomlarda safra asit ara ürünlerini ve uzun zincirli yağ asitlerinin degredasyonu ile ilgili uzun zincirli asil-CoA oksidazı kodlar. Bu enzimin eksikliği yağ ara ürünleri ve dallanmış yağ asitleri birikimi ile sonuçlanır ve bu durum Zellweger sendromuna yol açar. Yüksek yağlı diyet uygulamasından sonra yapılan mikroarray çalışmasına göre, genin ekspresynunda 5 katlık bir azalış saptanmıştır. Yağlı diyetle birlikte verilen zakkum ekstresi ise genin anlatımını yaklaşık 3 kat arttırmıştır. Yüksek yağlı diyet uygulaması ile ratlarda ACOX2 geninin azalması sonunda yağ asitleri birikimi oluşmuş olabilir. Zakkum distilatınun bu gen düzeyini normale yaklaştırmış olması önemli bir bulgudur. Böylece kanda yağ asiti birikimi azalacaktır.

FDFT1 geni: Farnesil difosfat farnesil transferaz 1 (FDFT1), iki farnesil pirofosfatı skualene dönüştürür. Bu sentez işlemi kolesterol yapısının ilk belirdiği aşamadır. Enzimin inhibisyonu, kolesterol miktarını düşürmesi sonucu kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi için bir metod olabilir (Davidson, 2007).

Mikroarray sonuçlarına göre, yağlı diyet sonrası genin ekspresyonunda yaklaşık 4 katlık bir azalma gözlenmiştir. Bu durum vücuda alınan yüksek yağlı diyet sonrasında kolesterol miktarının artışına karşılık, kolesterol miktarını düşürmeye yönelik ekspresyon azalışı ile açıklanabilir. Uygulanan zakkum ekstresi ise genin ekspresyonuna anlamlı bir etki etmemiştir.

HMGCR geni: Memelilerde kolesterol üretimi ve hücre içi kolesterol derişimi, glukagon ve insülin hormonları tarafından düzenlenir. Kolesterol sentezi yolundaki sınırlayıcı basamak HMG-KoA'nın mevalonata çevrilmesidir. Bu tepkimeyi katalizleyen enzim, HMGCR geninin (3-hidroksi-3-metilglutaril-Koenzim A redüktaz) ürünü olan HMG-KoA redüktaz, aktivitesi regüle edilebilen karmaşık bir düzenleyici enzimdir. Tanımlanmamış bir sterolün yüksek düzeyleri enzimin hızlı yıkımını uyarır ve bunun geninin transkripsiyonunu inhibe eder. HMG-KoA redüktaz ekspresyonu

hormonlarla da düzenlenir. Enzim fosfatlanmış (inaktif) ve fosfatlanmamış (aktif) şekillerde de bulunur. Glukagon fosforillenmeyi uyarırken, insülin defosforillenmeyi uyararak enzimi aktifleştirir ve kolesterol sentezini olası kılar.

Genetik bozukluğu olan bir insanda ailesel hiperkolesterolemide (FHA) kolesterolün kan düzeyi oldukça yüksektir ve hasta bireylerde çocuklukta şiddetli aterosikleroz gelişir. Bu bireylerde LDL reseptörü hatalıdır ve LDL tarafından taşınan kolesterolün reseptör-aracılı alınması mümkün değildir. Sonuç olarak kolesterol kandan temizlenemez ve aterosiklerotik plakların oluşumuna katılır. Hücre dışı kolesterol hücre içi kolesterol sentezini düzenlemek amacıyla hücreye giremediği için, kandaki aşırı kolesterole karşın endojen kolesterol sentezi devam eder.

Mantarlardan elde edilen iki ürün olan lovastatin ve kompaktin ailesel hiperkolesterolemili hastaları tedavi etmek için kullanılır. Her iki bileşik ve çok sayıdaki sentetik analogları mevalonata benzer. Her ikisi de HMG-KoA redüktazın yarışmalı (kompetetif) inhibitörüdür ve kolesterol sentezini inhibe eder.

Yüksek yağlı diyet, enzimin aktivitesinde 4 kat azalışa sebep olmuştur. Yağlı diyet ve yüksek kolesterol, kolesterol sentezinin bir düzenleyici enzimini kodlayan HMGCR geninin ekspresyonunu azaltmıştır. Bunun sebebi, dışarıdan alınan yüksek yağlı diyete karşı hücrelerdeki kolesterol düzeyini ayarlamak için olabilir. Böylece fazla kolesterol üretimi engellenmiş olacaktır. NO uygulaması ise gen üzerinde herhangi bir etki yaratmamıştır.

TMEM97 geni: Transmemran protein 97, nukleus membran, endoplazmik retikulum, hücre zarı, lizozom içerisindeki sterol tükenmiş hücrelerde lokalize olur. Progesteron ile yumurtalık içinde aşağı regüle olur. Hücresel kolesterol homeostasisinde regülatör olarak rol oynar. Yapılan bir çalışmada yumurtalık kanserinde kolesterol/lipit homeostasisindeki gen ekspresyon değişiklikleri belirlenmiş, en çok aşağı regüle olan gen olarak, fonksiyonu tam olarak bilinmeyen bir transmembran proteinini kodlayan TMEM97 bulunmuştur (Wilcox ve ark., 2007). TMEM97'nin doku spesifik ekspresyon modelleri ve kolesterol biyosentez genlerinin yüksek korelasyonu gen eskpresyon verileri ile onaylanmıştır (Wilcox ve ark., 2007).

Çalışmamızda, genin ekspresyonunda yüksek yağlı diyet sonrası 2,5 kat bir azalış gözlenmiştir. Kolesterol ve lipit sentez regülatörü olarak rol almasından dolayı, dışarıdan alınan yağlı diyet, hücrelerdeki kolesterol ve lipit miktarlarını belirli bir düzeyde tutmak için genin ekspresyonunda bir azalışa sebep olmuş olabilir. NO ise, gen ekspresyonunu etkilememiştir.

VLDLR geni: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (VLDLR), apoprotein-E (apo-E) içeren triasilgliserol-zengini lipoproteinlerin metabolizması için çok önemli olduğu öne sürülen bir reseptördür. Kolesteril ester (KE), kolesterolün bir asit ile tepkiyerek oluşturduğu bir esterdir. Aterotik plakaların oluşumu sonrasında, içlerinde kolesteril esterler birikmesi aterosikleronun ilk aşamalarındandır (Vessby ve ark., 1994; Lewis-Barned ve ark., 2000). Karaciğerde trigliserid ve kolesteril ester, VLDL adlı lipoproteinler içine yerleştirilip kana salgılanır. Kandaki VLDL, hepatik lipaz ve LPL enzimlerinin etkisiyle önce IDL (Intermediate-density lipoprotein), sonra da LDL adlı lipoproteinlere dönüşür. LDL'nin bir kısmı modifiye olup makrofajların içine alınabilinir. Bu, aterosikleroz sürecinin başlangıcıdır. Karaciğerde serbest kolesterol ve kolesterol esterleri arasındaki döngünün bir benzeri makrofajlarda meydana gelir. Kolesterol esterlerinin hücre içinde birikimi makrofajın 'köpük hücre'ye dönüşümüne yol açar. Aşırı serbest kolesterolün bir kısmı hücre dışına taşınır ve orada HDL lipoprotein taneciklerini oluşturur. HDL'de bulunan serbest kolesterol, LCAT (lesitin kolesterol asiltransferaz) enzimi ile kolesteril ester'e (KE) dönüşür. HDL'deki kolesterol esteri, karaciğere taşınabilir. HDL'deki kolesterol esteri ayrıca, LDL ve VLDL'ye aktarılabilir. VLDL'deki kolesterol esterlerinin bir kısmı VLDL reseptörü aracılığıyla karaciğere geri dönebilir.

Sonuçlara göre, VLDLR geninin ekspresyonu yüksek yağlı diyet sonrasında 2 kat artmıştır. VLDL reseptör genindeki bu artış, yüksek yağlı diyetten kaynaklanan kanda kolesterol artışı sebebiyle fazla kolesterolü karaciğere göndermesinden kaynaklanıyor olabilir. NO ise genin ekspresyonunu etkilememiştir.

SCD geni: SCD (stearoil-CoA desaturaz) geviş getiren hayvanlarda konjuge linoleik asitin (CLA) endojen olarak sentezini içerir (Milanesi ve ark., 2008). Yağ asidi metabolizmasında anahtar bir enzimdir. Stearoil-CoA'daki bir çift zinciri şekillendirmede sorumludur. Bu durum, doymuş yağ asidinden doymamış yağ asidinin nasıl sentezlendiğini gösterir. SCD, doymamış yağ asidinin sentezindeki bir hız sınırlayıcı basamağı katalizleyen, demir bağlı bir enzimdir. SCD'nin ana ürünü, stearic asidin desaturasyonu aracılığıyla oluşturulan oleik asittir. Sterarik asitin, oleik asite oranı, sinyal transdüksiyon ve hücrelerdeki membran akışkanlığındaki farklılaşmada ve hücre büyümesinde regülatör bir role sahiptir.

Mikroarray sonuçlarına göre genin ekspresyonu 2 kat artış göstermiştir. Yağlı diyet ile birlikte uygulanan NO diyeti ise bu durumu 1,5 kat normale döndürmüştür.

Buradaki değişim önemlidir. Halen yağlı diyet alan ratlarda gen ifadesi NO ile normal düzeye çok yaklaşmıştır.

ADFP (PLIN2 (Perilipin2)) geni: Adipoz diferansiyasyon ilişkili protein, yağ kürelerini kaplayan membran ile ilişkilidir. Bu protein globül yüzeyinin önemli bir bileşenidir. Genin mRNA seviyesindeki artışı, adiposit farklılaşmasının erken endikasyonlarını sağlar. ADFP, hücrelerdeki yağ damlacıklarının yüzeyinde lokalize olmuştur ve intraselüler lipit metabolizmasında önemli rol oynar (Faleck ve ark., 2012).

Yapılan bir çalışmada farelerin beta hücrelerinde ADFP'nin yüksek ekspresyonu belirlenmiş ve ADFP miktarının, yüksek yağ diyeti uygulanmış farelerde arttığı bulunmuştur (Faleck ve ark., 2012). Yapmış olduğumuz mikroarray sonuçları bu veriyi doğrulamaktadır. Ratlara verilen yüksek yağlı diyet sonrasında ADFP gen ekspresyonunda 2,5 kat artış gözlenmiştir. Zakkum ekstresi ise gen ekspresyonunu 1,5 kat azaltarak normal düzeyine oldukça yaklaştırmıştır.

ACOT1 geni: Asil-CoA tiyoesteraz 1 (ACOT1), C_{12}-C_{20}-CoA'nın uzun zincirli asil-CoA'ları yağ asitlerine ve CoA'ya hidroliz eder. ACOT1 cDNA, ilk olarak ratlardan klonlanmıştır (Yamada ve ark., 1998) ve peroksizom proliferatörü olan DEHP (di-2-etilheksil-ftalat) aracılığıyla karaciğerde indüklenir (Svensson ve ark., 1998).

ACOT1 karaciğerde, böbrekte ve kalpte eksprese edilirken, böbrekte ve kalpte perhizle upregüle edilir (Hunt ve ark., 2000). ACOT1 kalpte ve karaciğerde perhizle güçlü olarak upregüle olur ve diyabetik şartların karaciğerinde de upregüle olur (Hunt ve ark., 2000). Bu çalışmada yağlı diyete bağlı olarak ACOT genin ekspresyonunu 3 kat artırmıştır, NO ekstresi ise bu ifadeyi 1,5 kat azaltarak normale yaklaştırmıştır.

SOAT1 geni: Sterol O-asiltransferaz 1, kolesterolden kolesterol esterlerini oluşturan ER içerisinde lokalize olmuş bir intraselular proteindir. Bu enzim kolesterol metabolizmasında ve safra tuzu biyosentezinde önemli rol oynar. Hemen her memeli hücresinde ACAT hücre içinde kolesterolden, kolesterol ester oluşumunu katalizler. Kolesterolün ACAT tarafından esterleşmesi birkaç nedenden dolayı önemlidir. Birincisi kolesterolün bu yolla esterleşmesi onun hücre zarlarındaki miktarının toksik düzeylere ulaşmasını engeller, bunun yerine kolesterol esterlerinin sitoplazmadaki yağ damlacıklarına birikimini sağlar. İkincisi, karaciğerde sentezlenen kolesterol ACAT1 aracılığıyla esterleştikten sonra VLDL taneciklerine yüklenip kana salgılanır (Temel ve ark., 2007).

Soat enziminin hayvanlarda iki izoformu bulunmaktadır. ACAT1 ve ACAT2. ACAT1 ince bağırsak haricindeki tüm dokularda bulunur, en yüksek üretildiği dokular,

steroit üreten dokular (böbrek üstü kabuğu, adrenal korteks), yağ bezleri ve makrofajlardır (Chang ve ark., 1993; Uelmen ve ark., 1995; Meiner ve ark., 1997). SOAT1 geni yok edilmiş farelerde karaciğer ve ince bağırsak dışındaki dokularda SOAT aktivitesi görülmez. Aşırı kolesterolü olan bu farelerde deride kolesterol birikimi (ksantomalar) görülmüştür. Ayrıca gözlerdeki yağ bezlerinin atrofi olması nedeniyle gözleri tam açılamaz (Accad ve ark., 2000). Diyetle alınan trigliseritlerin hemen hemen tamamı absorbe edilirken, kolesterolün %25-75'i absorbe edilir. Kolesterolün absorbsiyonundaki bu değişkenliğin kişinin apo-E genotipinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Enterositlerde trigliseritler, yağ asitleri ve gliserolden tekrar rejenere edilir; kolesterolün çoğu membrana bağlı asil CoA, kolesterol asil transferaz enzimiyle esterifiye edilir.

Bu bilgiler ışığında, yüksek yağlı diyet sonrasında ratların SOAT gen aktivitesinde bir artış beklenmektedir. SOAT1 kolesterolden kolesterol esterlerini oluşturmakta ve SOAT1 genin inhibisyonu kolesterol birikimine yol açmaktadır. Mikroarray sonuçları bunu doğrulamaktadır. Yağlı diyet sonrası genin ekspresyon düzeyinde 5 kat artış gözlenmiştir. Bu durum fazla kolesterolü kolesterol esterlerine dönüştürmek ve kolesterol birikimini önlemek için gerçekleşmiş olabilir. Zakkum ekstresi ise genin anlatımında değişikliği neden olmamıştır.

UCP2 geni: UCP'ler (ayırıcı proteinler) mitokondriyal anyon taşıyan protein ailesinin bir üyesidir. Bu gen pek çok dokuda eksprese olur. Ayrıca bu gen diyete bağlı ısı üretiminde, obezitede, diyabette ve aterosiklerozisde rol oynar.

Yapılan çalışmalarda adipoz dokularda artan yağ asitlerinin , UCP2 mRNA artmasıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (Thompson ve Kim, 2004). Kültür hücrelerinde, tüm sınıfların doymamış yağ asitleri üzerindeki direkt etkisi gösterilmiştir (Thompson ve Kim, 2004). Oleik asitin, UCP2 ve UCP3 genlerinin promotor bölgelerinin aktivitesini uyardığı gösterilmiş, yağ asit duyarlı bölgeleri karakterize edilmiştir (Thompson ve Kim, 2004). Mikroarray sonuçlarına göre genin ekspresyonu yüksek yağlı diyet sonrası 5 kat artmıştır. Bu durumda yüksek yağlı diyet bu gen ile ilişkilidir ve genin ekspresyonunda bir artışa neden olmuş olabilir. Zakkum ekstresi ise artan gen ekspresyonunu yaklaşık 2 kat normal düzeye çevirerek yağlı diyetin etkisi oldukça azaltmıştır.

INHBB geni: İnhibin, beta B, INHBB geni tarafından kodlanan bir proteindir (Burger ve Igarashi, 1998). İnhibin B, erkekte testisin sertoli hücrelerinden, kadınlarda ise overin granulose hücrelerinden salgılanır. Gametogenezisi düzenler. FSH (folikül

uyarıcı hormon) ile negatif bir feed-back ilişkisi vardır. Aktivin FSH salınımını artırıcı etkide bulunurken, inhibin FSH salınımını baskılar (Burger ve Igarashi, 1998). İnhibin ile yapısal bağı olmayan follistatin aktivine bağlanıp FSH salınımını inhibe eder. Mikroarray sonuçlarına göre genin ekspresyonu yağlı diyet sonrası 5 kat artmıştır. Bu gendeki artış gametogenezde bir negatif regülasyona neden olmuş olabilir. NO ekstresi ise ekspresyonu 1,5 kat azaltarak normale düzeye yaklaştırmıştır.

FADS3 geni: Yağ asidi desaturaz 3 (FADS3), FADS gen ailesinin bir üyesidir. Desaturaz enzimleri yağ asit zincirlerinin karbonları arasındaki çift bağların başlangıcındaki yağ asitlerinden hidrojen atomlarının ayrılmasıyla desatürasyonu regüle eder.

Yüksek yağlı diyet sonrası gen ekspresyonunda yaklaşık 5 katlık bir artış görülürken, bu durumda yüksek yağlı diyet doymamış yağ asitlerinin artışına deden olmuş olabilir, diyet ile birlikte uygulanan zakkum ekstresi bu genin ekspresyonunu yaklaşık 2 kat normalleştirmiştir.

ASAH1 geni: Asit seramidaz 1, seramidin yağ asitlerine degredasyonunu ve sentezini katalizler. Fabry hastalığı (X'e bağlı resesif kalıtılan lizozomal depo hastalığı) lizozomal asit seramidaz aktivitesi eksikliğinde ortaya çıkmaktadır (Dedebaş ve Öner, 2010). Kırmızı-mor deri döküntüleri, böbrek ve kalp yetmezliğine sebep olur (Dedebaş ve Öner, 2010). Seramid, waks (wax) lipid moleküllerinin bir ailesidir. Sfingosin ve bir yağ asidinden oluşur. Hücre membranlarında yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Apoptozis, hücre büyümesini engelleme, hücre farklılaşması, hücre yaşlanması, hücre adezyonu gibi pek çok hücre fonksiyonu ile ilişkilidir.

Mikroarray sonuçlarına göre, yüksek yağlı diyet genin ekspresyonunu yaklaşık 6 kat arttırmış, uygulanan zakkum ekstresi ise 1,5 kat normale döndürmüştür. Buna göre, yağlı diyet seramid miktarını azaltmış, yağ asit oranını arttırmıştır, NO distilatı ise yağ asiti oranını normal düzeye çıkarma etkisi yapmıştır.

TBXAS1 geni: Tromboksin A sentaz 1, sitokrom P450 üst familyanın bir üyesini kodlar. Sitokrom P450 proteinleri kolesterol, steroid ve diğer lipitlerin sentezinde ve ilaç metabolizmasındaki pek çok reaksiyonu katalizleyen monooksigenaz proteinleridir. Bu ER membran proteini prostoglandin H2'nin tromboksin A2'ye dönüşümünü katalizler. Enzim homeostasis, kardiyovasküler hastalıklar ve felç gibi pek çok patofizyolojik proseste rol oynar.

Mikroarray deneyi sonucunda genin ekspresyonunda 6 kat bir artış belirlenmiştir. Yağlı diyet TBXAS1 geninin ekspresyonunda bir artışa sebep olurken,

yüksek yağlı diyet ile uygulanan zakkum distilatı genin ekspresyonunu yaklaşık 2,5 kat normal seviyeye dönüştürmüştür. Ekspresyondaki artış kardiyovasküler rahatsızlıklara neden olabileceği için diyetteki NO distilatı katkısı ile ekspresyonda 2,5 kat azalış önemlidir.

ABCG1 geni: ATP bağlayan protein, alt familya G, numara 1 (ABCG1), kolesterol ve fosfolipit taşınmasıyla ilgilidir ve hücresel lipit homeostasisini regüle edebilir. ABCG1, hücrelerdeki kolesterolün HDL'e transportuna aracılık eder (Vaughan ve Oram, 2006). ABCG1'in makrofajlarda yüksek derecede eksprese edildiği (Klucken ve ark., 2000) ve hücrelerdeki kolesterolün HDL'e akışını kolaylaştırdığı görülmektedir (Nakamura ve ark., 2004; Wang ve ark., 2004).

Çalışmamızda genin ekspresyonu yüksek yağlı diyet sonrası 6 kat artmıştır. HDL'nin, iyi kolesterol olduğu, aşırı kolesterolü atherosklerotik plaklardan uzaklaştırdığı ve böylece plak oluşumunu engellediği ileri sürülmektedir. Yağlı diyet sonrası artan kolesterol miktarından dolayı, fazla kolesterolü karaciğere taşımaya yönelik genin ekspresyonunda bir artış olması muhtemeldir. Yağlı diyet ile uygulanan zakkum distilatı ise, genin ekspresyonuna etki etmemiştir.

ABCA1 geni: ATP-bağlayan protein, alt familya A, numara 1 (ABCA1), kolesterol akış düzenleme proteini (cholesterol efflux regulatory protein (CERP)) olarak da adlandırılan bir proteindir (Luciani ve ark., 1994). ABCA1, HDL-K oluşumunun ilk basamağında ve ters yönde kolesterol taşınmasında etkili olup aterosikleroz gelişiminde çok önemli olan bir gendir (Oram ve Yokoyama, 1996).

Bu protein periferal dokulardaki fazla kolesterolün HDL partiküllerine dönüştürülerek uzaklaştırılması ve daha sonra karaciğerde eliminasyonun gerçekleştirildiği ters kolesterol taşımasının ilk basamağında rol almaktadır (Oram ve Yokoyama, 1996). Mikroarray sonuçlarına göre genin ekspresyonu KD ratlarda 6 kat artmıştır. Yağlı diyet sonrası dokularda oluşan kolesterolü HDL partiküllerine dönüştürerek, eliminasyonunu gerçekleştirmek amacıyla genin ekspresyonunda artış gerçekleşmiş olabilir. ZKD grubunda ise bu ekspresyonu 2 kat ND düzeyine azalmıştır.

ABCA1 genindeki mutasyonlar düşük plazma HDL düzeyine neden olmaktadır (Bodzioch ve ark., 1999; Mott ve ark., 2000; Alenezi ve ark., 2004). HDL eksikliği sendromu ile karakterize edilen Tangier Sendromlu ve Ailesel HDL eksikliği 2 sendromu olan hastalarda oldukça fazla sayıda saptanmıştır (Mott ve ark., 2000; Bodzioch ve ark., 1999).

Hücre membranının bir yanından diğer yanına uzanan bir protein olan ABCA1, etkin kolesterol aktarımı için esastır. Kolesterol ester depolarından salgılanan kolesterol, plazma membranında birikmektedir. Kolesterol düzeyleri yükseldikçe, ABCA1'e bağlanan ATP'nin fazla kolesterolü membranın dışına atmak üzere hidrolize olduğu öne sürülmektedir (Oram ve Lawn, 2001). Mikroarray sonuçları, genin ekspresyonundaki artış neticesinde fazla kolesterolün membran dışına atıldığını göstermektedir.

CD24 geni: CD24 (cluster of differentiation 24), B lenfositlerin ve farklılaşmış neoblastların yüzeyinde eksprese olan bir glikoproteindir. Bu gen, pek çok B hücrelerinde ve olgun granuloesitlerde eksprese olan bir siyaloglikoprotein kodlar. CD24, glikozil-fosfatidilinositol (GP1-) üzerinden zara bağımlı ve bundan dolayı yağ adacıklarıda lokalize olmuş küçük, glikozillenmiş hücre zarı proteinidir (Schabath ve ark., 2006). Yapılan bir çalışmada CD24 azalmasının hücresel kolesterol miktarını artırdığı belirtilmektedir (Schabath ve ark., 2006).

Mikroarray sonuçlarına göre, yüksek yağlı diyet genin ekspresyonunu 7 kat arttırmış, zakkum ekstresi ise yaklaşık 1,5 kat azaltmıştır. Bu bulguya göre yağlı diyetle birlikte artan kolesterol NO ile azalmıştır.

TRIB3 geni: TRIB3 geni ile kodlanan tribbles homolog 3, NF-kappaB transkripsiyon faktörü ile indüklenen bir protein kinazdır. Kodlanan bu protein NF-kappaB'nin negatif regülatörüdür ve ayrıca hücreleri TNF (tümör nekroz faktörü) ve TRAIL (tümör nekroz faktör ilişkili apoptozis indükleyici ligand) indüklü apoptozise götürebilir. Buna ek olarak, serine-threonine kinaz (AKT1) hücrelerde viabiliteyi negatif regüle edebilir.

TRIB3, adipozis yetersizliğinde asetil- CoA karboksilaz (ACC) proteinini yüksek miktarda biriktirir (Qi ve ark., 2006). Yapılan çalışmada adipoz dokularda TRIB3 eksprese eden transgenik fareler yağ asit oksidasyonundan dolayı, diyet indüklü obeziteden korunur. Bu bilgiler, enerji metabolizmasını korumak için lipit metabolizmasının anahtar regülatöründe bilinen yollarda ubikuitinleşme ve fosforilasyon olduğunu bilgisini doğrulamaktadır (Qi ve ark., 2006). Adipoz dokudaki ACC'nin indirgenmesini tetikleyerek lipolizin uyarılması boyunca miktarının arttırılmasıyla TRIB3'ün bir paralellik gösterdiği belirlenmiştir (Qi ve ark., 2006).

Yüksek yağlı diyet TRIB3 geninin ekspresyonunu 8 kat artırmıştır. Vücutta biriken fazla yağın lipolizise uğratılması için gen indüklenmiş olabilir. Bu sebeple artan genin ekspresyonunu NO diyeti 2 kat normal seviyeye yaklaştırmıştır.

PLA2G2D geni: Fosfolipaz A2, grup IID (PLA2G2D), 3-fosfogliseritin 2-asil gruplarının kalsiyum bağımlı hidrolizini katalizler. PLA2 alt gruplarının in-vivo fonksiyonları hakkında çok fazla bilgi bulunmamakla birlikte, LDL ve HDL'deki fosfolipitleri hidroliz ettiği rapor edilmiştir (Sato ve ark., 2008). PLA2 alt tiplerinin insan ve farelerde ateroskleroz lezyonlarında artış gösterdiği bilinmektedir.

Mikroarray sonuçlarına yüksek yağlı diyet genin ekspresyonunu 9 kat arttırmıştır. Bu da yağlı diyrtin ratları ateroskleroza götürmekte olduğunun bir göstergesidir. NO distilatı katkısı ise ekspresyonu 3 kat normale dönüştürerek bu etkiyi bir miktar azaltmıştır.

SCD1 geni: Stearoil CoA desaturaz 1, membran fosfolipitleri, kolesterol esterleri, mumsu yağ esterleri ve trigliseritlerin bileşenleri olan doymamış yağ asitlerinin sentezini katalizleyen bir hız kısıtlayıcı enzimdir (Miyazaki ve Ntambi, 2003). Enzimi kodlayan gen, adipoz dokuda, kahverengi yağ dokularında, göz kapağı altındaki yağ bezleri, normal diyet şartlar altında yüksek derecede eksprese olur (Dobrzyń ve Dobrzyń, 2006).

İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan gen ekspresyon çalışmaları, yüksek Stearoil CoA desaturaz 1 (SCD1) aktivitesinin çizgili kaslarda doymuş yağ asitlerinin ve yağ birikimi artmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Zhihua ve ark., 2008). İnsanlarda yapılan bir diğer çalışmada, kaslardaki artan doymuş yağ asitleri ile artan triasil-1-gliserol sentezi ve azalan yağ asit oksidasyonu ile yüksek SCD1 ekspresyonunun ilişkili olduğu bulunmuştur (Zhihua ve ark., 2008).

Mikroarray sonuçlarına göre, yüksek yağlı diyet gen ekspresyonunu 10 kat artırmıştır. Bu durum, obez insanlarda yapılmış olan çalışmalarda genin yüksek derecede eksprese olmasını (Voss ve ark. 2005) doğrulamaktadır. Uygulanan zakkum ekstresi ise genin ekspresyonunu 1,5 azaltarak normal düzeye yaklaştırmıştır.

CTGF geni: CTGF (bağ doku büyüme hormonu), ekstraselular matriks ilişkili heparin bağlayan bir matriks selular proteinidir (Chen ve Lau, 2009). CTGF, hücre adezyonu, migrasyon, proliferasyon, skelatal gelişim ve dokuda yara iyileşmesi gibi pek çok biyolojik proseste önemli bir role sahiptir ve fibrotik hastalıklar ve kanserin pek çok modeliyle ilişkilidir (Kubota ve Takigawa, 2011).

Yüksek yağlı diyet genin ekspresyonunu 10 kat artırmış, NO distilatı ise genin ekspresyonunu etkilememiştir. Bu durumda yağ bakımından zengin bir diyetle aynı zamanda proliferatif etki de oluşmuştur.

FABP5 geni: Yağ asidi bağlanma proteini 5 (FABP5, E-FABP) geni, epidermal, hücrelerde bulunan yağ asidi bağlanma proteinini kodlar ve sedef hastası dokularda aşağı regüle olan ilk belirleyicidir. FABP'ler uzun zincirli yağ asitleri ve diğer hidrofobik ligandları bağlayan sitoplazmik proteinlerdir. FABP'ler yağ asit taşınma ve metabolizmasında rol alırlar. FABP5, deri epidermal hücrelerinde en çok miktarda eksprese olan FABP'dir. E-FABP (epidermal yağ asidi bağlanma proteini), total proteinin % 0,065'ini oluşturur (Veerkamp ve ark., 1991). İnsan cildinde az miktarda bulunur, keratinosit farklılaşmasının non malignant etkisinde miktarının arttığı bulunmuştur (Siegenthaler ve ark., 1994). Ayrıca, psoriatik ciltlerde yüksek miktarda bulunmuştur (Siegenthaler ve ark., 1994). E-FABP ekspresyonunu, keratinosit farklılaşması önemli ölçüde etkilemektedir (Siegenthaler ve ark., 1994).

Yüksek yağlı diyet sonrası çalışmamızda, gen ekspresyon düzeyinde 10 katlık bir artış gözlemlenmiştir. Yağlı diyet keratinosit farklılaşmasına neden olmuş ve dolayısıyla genin ekspresyonunda bir artış gözlenmiş olabilir.

PLTP geni: PLTP (fosfolipit transfer protein) geni insan plazmasında lipit transfer proteinini kodlar. Kodlanan protein trigliserid-zengini lipoproteinlerden, HDL'ye fosfolipitleri transfer eder. Buna ek olarak, HDL partiküllerinin boyutunu düzenler ve bu protein kolesterol metabolizması ile de ilgilidir.

PLTP'nin HDL kolesterol miktarı ve HDL molekülünün biyolojik niteliği üzerinde etkisi bilinmektedir (Yazdanyar ve ark., 2011). Son zamanlardaki veriler PLTP'nin fonksiyonundaki dokuya özel değişimlerine sahip olduğunu önermektedir (Yazdanyar ve ark., 2011). Üstelik RCT (reverse cholesterol transport) yolu da periferal dokularda ve dolaşımda çoklu basamaklara sahiptir (Yazdanyar ve ark., 2011). PLTP, bir çok seviyede RCT yolunu etkileyebilir (Yazdanyar ve ark., 2011). Ateroskleroz için yeni tedavilerin bulunmasında, RCT ve PLTP'nin arasındaki ilişkinin önemli bir alan olabileceği beklenmektedir (Yazdanyar ve ark., 2011).

PLTP, küçük pre (beta)-HDL üretimi ile HDL partiküllerini birleştirerek, daha büyük HDL partikülleri oluşturur (Albers ve Cheung, 2004). PLTP'nin HDL metabolizmasındaki bu rolü, RCL'den kaynaklanmaktadır (Yazdanyar ve ark., 2011).

PLTP ekspresyonu, obezite, insülin direnci ve Tip-1 ve Tip-2 diyabetleri ve kalp hastalıkları gibi patolojilerde artar (Tol, 2002). Bir klinik çalışmada, kalp hastalarında serum PLTP aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir (Schlitt ve ark., 2003). Çalışmamızda da yağlı diyet sonrasında PLTP ekspresyonu artmıştır. Yaklaşık 13 kat artmış olan ekspresyon düzeyinin nedeni, fazla yağın HDL'ye çevrilmesi ile bir regülasyon

mekanizması olabilir. NO ekstresi ise genin ekspresyonunu yaklaşık 2 kat daha normal düzeye indirmiştir.

ACP5 geni: Tartarat-dirençli asit fosfataz (TRAP) ya da asit fosfataz 5 (ACP5), memelilerde glukozlanmış monomerik metalloenzim eksprese eder (Baumbach ve ark., 1991). Proteolitik ayrılma aracılığıyla aktive olur ve bir proenzim gibi sentezlenir ve indirgenir (Ljusberg veark., 1999). Yapılan bir çalışmada serum asit fosfataz aktivitesinin, üriner total kolestrol ve androjenleri eş zamanlı tespitlerinin, prostat hastaların tanısında önemli olduğu sonucuna varılmıştır; prostat hastalarının kanında, belirli oranda yükselmektedir (Chu ve ark., 1975). Ayrıca osteoporoz ile ilgili yapılan bir çalışmada, kemik yıkım göstergesi olarak TRAP serum seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Gürer ve ark., 2005). TRAP'ın yeni yağ hücrelerinin oluşumunu tetiklediği ve obeziteye neden olduğu pek çok çalışmada ispatlanmıştır (Lang ve ark., 2008). Yaklaşık 4 yıl boyunca aşırı kilolu kadınlar incelenmiş ve bu kişilerde proteinin yüksek oranda eksprese edildiği belirlenmiştir (Lang ve ark., 2008). Mikroarray sonucuna göre, yüksek yağlı diyet genin ekspresyonunu 14 kat arttırmıştır. Buna karşılık NO distilatı ise ekspresyonu 2 kat azaltmıştır. Yağlı diyet ratlarda yüksek kilo alımına sebep olmuştur. Sonuç olarak, TRAP seviyesi kilo alımına bağlı olarak artmış olabilir.

PLD3 geni: Fosfolipaz D ailesi, numara 3 (PLD3) geni, fosfokolini kolin ve fosfatid aside hidroliz eder ve bu metabolitler fizyolojik ve biyokimyasal hücre regülasyonunda önemli rol oynar (Zhang ve ark., 2009). PLD, plazma membranında lokalize olmuştur.

Yüksek yağlı diyet genin ekspresyonunu 20 kat arttırmıştır. Bu artış ratlarda pek çok fizyolojik ve biyokimyasal değişimlere neden olmuş olabilir. Çalışmada kullanılan NO katkılı diyet ise 3 katlık bir azalışla ifade düzeyini normale yaklaştırmıştır.

LPL geni: Lipoprotein lipaz (LPL), hepatik lipaz ve endotel lipazları içeren lipaz gen ailesinin bir üyesidir. Şilomikron kalıntılarının, kolesterol-yoğunluklu lipoproteinlerin ve serbest yağ asitlerinin hücresel içeri alımıyla ilişkilidir (Mead ve ark., 2002). Apo-CII, LPL kofaktörüdür (Kim ve ark., 2006). LPL, kalpte endotel hücrelerde, kas ve adipoz dokularında eksprese edilen lipoprotein lipazı kodlar. LPL mutasyonu Tip-1 hiperlipoproteinemiye ve lipoprotein metabolizmasında pek çok bozukluklara yol açar.

Şilomikronlar dolaşımda, damar endotelinde bulunan lipoprotein lipaz enzimi etkisiyle yapılarında bulunan trigliseritlerin büyük bir kısmını kaybederler ve şilomikron kalıntılarını oluştururlar. LDL çeşitli dokularda sentezlenir ve buralardan vasküler yataktaki endotel hücrelerin luminal yüzeyine transfer edilir. LPL ve VLDL'lerdeki fosfolipitleri parçalar ve oluşan FFA'ların okside edilmesini veya depolanmasını sağlar. Apo-CII (Apolipoprotein-CII)'ler LPL'nin aktivasyonu için gereklidir. Apo-CIII (apolipoprotein-CIII)'lerin de LPL'yi inhibe ettikleri düşünülmektedir. Hemen hemen her dokuda bulunan LPL, yağ dokusundaki insülini aktive eder. VLDL, LPL enziminin etkisiyle tirigliseritlerini kaybederek kolesterol içeriğini arttırır ve LDL'ye dönüşür. LPL bir homodimer olarak çalışır ve iki işlevi vardır; hem trigliserit hidrolaz, hem de reseptör aracılıklı lipoprotein alımında ligand ve köprüleme faktörüdür.

Yüksek yağlı diyet genin ekspresyonunu 20 kat arttırmıştır. LPL, yağ depolanmasını sağlar. Yüksek yağlı diyet, LPL aktivitesini arttırarak vücudun yağ depolamasını sağlayabilir. Yüksek yağlı diyet ayrıca VLDL'nin kolesterol içeriğini artırarak LDL'ye dönüşümünü de sağlamış olabilir. NO katkısı ise ifade düzeyine etki etmemiştir.

FABP4 geni: Yağ asidi bağlanma proteini 4, öncelikle adipositlerde ve makrofajlarda ifade edilen yağ asitleri için taşıyıcı bir proteindir. Bu proteinin genetik mühendisliği veya ilaçlarla bloke edilmesi, kalp hastalıkları, diyabet, astım, obezite ve karaciğer hastalığını tedavi edebilir. FABP4 inbisyonunun diyabet ve aterosikleroz hastalıklarda potansiyel bir ilaç yöntemi olabileceği önerilmektedir (Furuhashi ve Hotamisligil, 2008). FABP4'ün makrofajlarda, kolesterol alışverişinde ve ilgili inflamatuarda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Holm ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda damar sertliği olan hastalarda FABP4 artışı belirlenmiş, aterosiklerotik lezyonlarda yüksek mRNA miktarları gözlemlenmiştir (Holm ve ark., 2011). Yapılan bazı analizler, FABP4'ün lipit birikiminde ve lezyon içerisindeki makrofaj infiltrasyonunda da bir marker olabileceğini gösterir (Holm ve ark., 2011).

Çalışmamız sonucunda FABP4'ün ekspresyonunda 40 kat artış gözlemlenmiştir. Yağlı diyet sonrası FABP4 geninin ekspresyonundaki artış, artan yağ asitlerini taşımak için olabilir. Bunun sonucunda ise, damar sertliği ya da kalp krizi riski artması olasıdır. Ayrıca FABP4'ün ekspresyonundaki bu artış yağlı diyetin bir göstergesidir. NO katkısı ise ekspresyonu 1,5 kat azaltarak az da olsa bir inhibitör etkisi yapmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışma ratlarda yüksek yağlı diyetin etkilediği metabolik genleri bir bütün halinde göstermekte ve NO distilatının bu genlerin ifade düzeylerine etkisini ortaya koymaktadır. Yağ ve kolesterol metabolizması için önemli olan genlerden ADH7, HMGCS1, CYP39A1, FABP1, ACOX2, PLA2G2D'nin ifade düzeylerindeki değişimler ise ilgi çekicidir. Bu genlerin ekspresyon seviyelerin NO distilatının besin katkı maddesi olarak kullanılmasıyla, yüksek yağlı diyetin etkisini ND grubu seviyelerine anlamlı ölçüde dönüştürmüştür. NO distilatı bu etkileri yüksek yağlı diyet ile birlikte verildiği halde gösterebilmiştir. Yağlı diyeti kesen kolesterol seviyesi yüksek bireylerde kolesterolü düşürücü etkisinin daha güçlü olacağı beklenmektedir. Bu çalışma NO distilatının yağ/ kolesterol metabolizmasındaki farmakogenomik etkilerinin gösterildiği ilk çalışmadır. Yağ metabolizması gibi karmaşık ve pek çok yolak tarafından etkilenen bir metabolik ağ gen ekspresyon düzeyinde bir miktar aydınlatılmış, NO distilatının kolesterolün yüksek olduğu durumlarda doğal gıda katkı maddesi olarak kullanılabileceği model deney hayvanlarında gösterilmiştir.

NO distilatının gıda katkı maddesi olarak insanlarda kullanımının önerilmesi için yeterli güvenirlik çalışmaları model hayvanlarda (akut, subakut ve kronik toksisite çalışmaları, genel ve spesifik organlara olan etkileri, reprodüktif toksisite testleri, mutajenisite ve karsinojenisite araştırmaları) yapılmalı, maddenin farmakolojik özellikleri (farmakodinamik ve farmakokinetik) İyi Laboratuvar Uygulamaları (Good Laboratory Practice (GLP)) şartlarında araştırılmalıdır. İyi Üretim Uygulamaları (Good Manufacturing Practice (GMP)) şartlarında ise kimyasal, analitik (stabilite, kalite güvencesi), farmakolojik (formülasyon) ve ambalajlama ile ilgili çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derré, A., Villéger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J. M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N. G., Boileau, C., 2003, Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia, *Nat. Genet*., 34 (2), 154–6.

Accad, M., Smith, S. J., Newland, D. L., et al., 2000, Massive xanthomatosis and altered composition of atherosclerotic lesions in hyperlipidemic mice lacking acyl CoA:cholesterol acyltransferase 1, *J. Clin. Invest*., 105 (6), 711–9.

Afag, F., Saleem, M., Aziz, M.H., Mukhtar, H., 2004, Inhibition of 12-otetradecanoylphorbol- 13-acetate-induced tumor promotion markers in CD-1 mouse skin by olenadrin, *Toxicology and applied Pharmacology*, 195, 361-369.

Aktürk, O., 2006, Hiperkolesterolemi oluşturulan ratlarda hmgCoA redüktaz inhibitörü ilaçlarla (statinler) tedavinin hipokampalnmda reseptörü subunitlerine etkisi.

Albers, J. J., Cheung, M. C., 2004, Emerging roles for phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism, *Curr Opin Lipidol*., 15, 255–60.

Alenezi, M. Y., Marcil, M., Blank, D., Sherman, M., Genest, J., 2004, Is the decreased high-density lipoprotein cholesterol in the metabolic syndrome due to cellular lipid efflux defect, *J Clin Endocrinol Metab*., 89, 761-4.

Anar, Ş., 1998, Kolesterol Nedir?, *Dünya Gıda Dergisi*, Eylül.

Anonymous, 1993, Summary of the second report of the NCEP expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults, *JAMA*, 269,3015.

Anonymous, 2010, http://biograph.be/concept/graph/C1156534/C1424970 [Ziyaret tarihi: 14.11.2012].

Anonymous, 2011, Statin Pathway (Homo sapiens) [online], http://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP430 [Ziyaret Tarihi: 12.11.2012].

Anonymous, 2012, CYP39A1 cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1 [Homo sapiens], U.S. National Library of Medicine, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51302 [Ziyaret Tarihi: 12 Aralık 2012].

Anonymous,2012,http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression analysis_technical_manual.pdf [Ziyaret tarihi: 14.11.2012].

Bach, T. ,1995, Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants, *Lipids*, 30 (3), 191–202.

Barbosa, R.R., Fontenele-Neto, J.D., Soto-Blanco, B., 2007, Toxicity in goats caused, *Research in Veterinary Science*.

Baumbach, G. A., Saunders, P. T., Ketcham, C. M., Bazer, F. W., Roberts, R. M., 1991, Uteroferrin contains complex and high mannose-type oligosaccharides when synthesized in vitro, *Mol. Cell. Biochem*., 105 (2), 107–17.

Baytop, T., 1989, Türkiye'de zehirli bitkiler, bitki zehirlenmeleri ve tedavi yöntemleri, *İstanbul Üniv. Yay*., 3560, 22-271.

Baytop, T., Baytop, A., Mat, A., Sun, S., 1989, Türkiyede zehirli bitkiler, bitki zehirlenmeleri ve tedavi yöntemleri, *İstanbul Üniversitesi Yayınları*, 3560, 975-404-111-3.

Begum, S., Siddiqui, B. S., Sultana, R., Zia A., Suria A., 1999, Bio-active cardenolides from the leaves of Nerium oleander, *Phytochemistry*, 50, 435-8.

Bellakhdar, J., Claisse R., Fleurentin J., Younos C., 1991, Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *J Ethnopharmacol*, 35 (2), 123-43.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002, *Biochemistry*, New York, W. H. Freeman,145-150.

Berger, S. L., 1975, DEPC: An examination of its properties in buffered solutions with a new assay technique, *Biochim. Biophys. Acta*, 400, 428-450.

Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., 1999, The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease, *Nat Genet*., 22, 347-51.

Bottorff, M., Hansten, P., 2000, Long-term safety of hepatic hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitors: the role of metabolism – monograph for physicians, *Arch Intern Med*., 160, 2273–2280.

Brown, M. S., Goldstein, J. L., 1986, A receptor – mediated pathway for cholesterol homeostasis, *Science*, 232, 34-47.

Burger, H. G., Igarashi, M., 1988), Inhibin: definition and nomenclature, including related substances, *Endocrinology,* 122 (4), 1701–2.

Champe, P. C. and Harvey, R. A., 1997, Biyokimya, Tokullugil, A., Dirican, M. ve Ulukaya, E., *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul.

Chang, C. C., Huh, H. Y., Cadigan, K. M., Chang, T. Y., 1993, Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells, *J. Biol. Chem*., 268 (28), 20747–55.

Chen, C. C., Lau, L. F., 2009, Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins, *Int. J. Biochem. Cell Biol*., 41 (4), 771–83.

Chen, S. H., Van Tuinen, P., Ledbetter, D. H., Smith, L. C., Chan, L., 1986, Human liver fatty acid binding protein gene is located on chromosome 2, *Somat Cell Mol Genet.*, 12 (3), 303–6.

Choi,S., 2004, DNA Chips and Microarray Analysis, Handbook of fungal biotechnology, *Marcel Dekker*, Inc.

Chomczynski, P., 1993, A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples, *BioTechniques*, 15, 532-537.

Chu, T.M., Shukla, S.K., Mittelman, A., Murphy, G. P., 1975, Comparative evaluation of serum acid phosphatase, urinary cholesterol, and androgens in diagnosis of prostatic cancer, *Urology*, 6 (3), 291-294.

Cucchini, S., Thompson, A., Hinton, J. C. D., 2001, Microarrays for microbiologists, *Microbiology*, 147, 1403-1414

Danson, J., Fangv, Espiritu – Santo, G., Xing, W., Salazas, A., Miyamoto, S., Armendarez, V., Volkmuth, W., 2001, Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling, *Plant Mol. Biol*., 48, 99-118.

Davidson, M. H., 2007, Squalene synthase inhibition: a novel target for the management of dyslipidemia, *Curr Atheroscler Rep.*, 9 (1), 78–80.

Dean, P. D., Ortiz de Montellano, P. R., Bloch, K., Corey, E. J., 1967, A soluble 2,3-oxidosqualene sterol cyclase, J. *Biol. Chem*., 242 (12), 3014–5.

Dedebaş, T. Ve Öner, Z., 2010, Süt sfingolipidlerinin sağlık üzerine etkisi, *Akademik Gıda*, 8 (1), 39-43.

Despres, T. S., Amselem, Caboche, M., Hofte, H., 1998, Differentiol gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays, *Plant J*., 14, 643-652

Dobrzyń, A., Dobrzyń, P., Stearoyl-CoA desaturase--a new player in skeletal muscle metabolism regulation. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57(Suppl 10):31-42

Ehrenberg, L. et al., 1976, Diethyl pyrocarbonate in nucleic acid research, *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol*., 16, 189-262.

Erdemoğlu, N., Küpeli, E., Yeşilada, E., 2003, Antiimflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine, *Journal of Ethnopharmocology*, 89, 123-129.

Ergun, B., 1992, Nerium oleander'in bazı suda çözünen bileşiklerinin in vitro biyolojik etkileri, *Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir, 3-4.

Faleck, D. M., Ali, K., Roat, R., Graham, M. J., Crooke, R. M., Battisti, R., Garcia, E., Ahima, R. S., and Imai1, Y., 2012, Adipose differentiation-related protein regulates lipids and insulin in pancreatic islets, *Am. J. Physiol. Cell Physiol*., 303(7), C713-C714.

Fu, L., Zhang, S., Li, N., Wang, J., Zhao, M., Sakai, J., Hasegawa, T., Mitsui, T., Kataoka, T., Oka, S., Kiuchi, M., Hirose, K., Ando, M., 2005, Three new triterpenes from *Nerium oleander* and biological activity of the isolated compounds, *J Nat Prod*, 68, 198-206.

Furuhashi, M., Hotamisligil, G. S., 2008, Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets, *Nat Rev Drug Discov*., 7, 489–503.

Gilliland, S. E., 1985, Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2), 377-381.

Gotto, A. M., 1995, Lipid risk factors and regresion of atherosclerosis, *Am J Cardiol*, 76, 3A-7A.

Gürer, N., Bahadır, C., Koç, H., Nur, H., Polat, Y., Atalay, S., Önder, C. B., 2005, Kemik mineral yoğunluğu ile kemik döngüsünün biyokimyasal göstergelerinin ilişkisi, *Turk J Phys Med Rehab*., 51(2), 54-57.

Hall-Glenn, F., Lyons, K. M., 2011, Roles for CCN2 in normal physiological processes, *Cell. Mol. Life Sci.,* 68 (19), 3209–17.

Hans-Jürgen, Q., Hans-Jürgen, B., Ulrike, S., and Kadip, E., 1972, Studies on the relationship between plasma free fatty acids and growth hormone secretion in man, *J Clin Invest*., 51(9), 2388–2398.

He, M., Kratz, L. E., Michel, J. J., Vallejo, A. N., Ferris, L., Kelley, R. I., Hoover, J. J., Jukic, D., Gibson, K. M., Wolfe, L. A., Ramachandran, D., Zwick, M. E., Vockley, J., 2011, Mutations in the human SC4MOL gene encoding a methyl sterol oxidase cause psoriasiform dermatitis, microcephaly, and developmental delay, *The Journal of Clinical Investigation*, 121 (3), 976-84.

Henegouwen, G.P., Keppler, D., Leuschner, U., Paumgartner, G., Stiehl, A., 2001, Biology of Bile Acids in Health and Disease, *XVI International Bile Acid Meeting*, Germany, 7-8.

Henegouwen, G.P., Keppler, D., Leuschner, U., Paumgartner, G., Stiehl, A., 2001, Biology of Bile Acids in Health and Disease, *XVI International Bile Acid Meeting*, Germany, 278-284.

Herr, W., 1985, DEPC: A chemical probe for secondary structure in negatively supercoiled DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, 82, 8009-8013.

Hirode, M., Ono, A., Miyagishima, T., Nagao, T., Olmo, Y., Urushidani, T., 2008, Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing phospholipidosis, *Toxicol Appl. Pharmacol*., 15, 229 (3), 290-299.

Hişmioğulları, A. A., 2006, Sıçanlarda safra kolesterol sekresyonunu kontrol eden ABCG5 ve ABCG8 genlerinin diosgenin ve taurodehidrokolik asit ile uyarılması, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 17-20.

Holm, S., Ueland, T., Dahl, T. B., Michelsen, A. E., Skjelland, M., et al., 2011, Fatty acid binding protein 4 ıs associated with carotid atherosclerosis and outcome in patients with acute ıschemic stroke, *PLOS ONE,*6(12), e28785.

Huff, M. W., Telford, D. E., 2005, Lord of the rings—the mechanism for oxidosqualene: lanosterol cyclase becomes crystal clear, *Trends Pharmacol. Sci*., 24 (6), 335–40.

Hunt, M. C., Lindquist, P. J. G., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Diczfalusy, U. and Alexson S. E. H., 2000, Involvement of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARa) in regulation of long chain acyl-CoA thioesterases, *J. Lipid Res*., 41, 814-823.

Ingelman-Sundberg, M. J. 2001, Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy*, Intern Med*., 250, 186-200.

Ipekdal, K., 2006, Mikroarray Teknolojisi Evrimsel Ve Ekolojik Çalışmalarda Kullanımı,http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_mikroarrayandecology.pdf [Ziyaret tarihi: 01.11.2012].

Isomaa, B., Almgren, P., Tuomi, T., ve ark., 2001, Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome, *Diabetes Care*, 24, 683-689.

Jaenisch, R., Bird, A., 2003, Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nature Genetics*, 32, 245.

Jay, D., H., Jonathan, C., C., and Helen, H. H., 2007, Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism, *Trends Biochem Sci*., 32(2), 71–77.

Jiang, Z., Michal, J. J., Tobey, D. J., Daniels, T. F., Rule, D. C., MacNeil, M. N., 2008, Significant associations of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) gene with fat deposition and composition in skeletal muscle, *Int J Biol Sci*., 4 (6), 345-351.

Jouad, H., Haloui M., Rhiouani H., El Hilaly J., Eddouks M., 2001, Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane), *J Ethnopharmacol*, 77, 175-82.

Ju, Z., Wells, M. C., Walter, R. B., 2007, DNA microarray technology in toxicogenomics of aquatic models: Methods and applications, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: *Toxicology and Pharmacology*, 145, 5-14.

Kafatos, F. C., Jones, C. W., Efstratiadis, A., 1979, Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure, *Nucl. Acids Res., 6*, 1541-1552.

Kaplan H., M., 2007, Statin uygulanan farelerin aorta ve korpus kavernozum dokularında rho-kinaz enziminin ekspresyonu ve aktivitesinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 3-6.

Karaca, T. D., 2008, İnsan meme kanseri hücre kültüründe nerium oleander bitkisinden elde edilen ekstraktların antikanserojen etkisinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Sakarya, 12-14.

Kavalalı, G., Tuncel, H., Göksel, S., Hatemi, H., 2003, Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats*, J. Ethnopharmacol*, 84 (2-3), 241-5.

Kehoe, D., Villand, P., Somerville, S. C., 1999, DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms, *Trends Plant Sci.*, 4, 38-44.

Kim, S. Y., Park, S. M., Lee, S. T., 2006, Apolipoprotein C-II is a novel substrate for matrix metalloproteinases, *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 339 (1), 47–54.

Klucken, J., Buchler, C., Orso, E., Kaminski, W. E., Porsch-Ozcurumez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., Allikmets, R., and Schmitz, G., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci.*,97, 817–822.

Knopp, R. H., 1999, Drug treatment of lipid disorders, *N Engl J Med*., 341, 498–511.

Kubota, S., Takigawa, M., 2011, The role of CCN2 in cartilage and bone development, *J Cell Commun Signal*, 5 (3), 209–17.

Kuhn, E., 2001, From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants, *Annals of Botany,* 87, 139-155.

Lattka, E., Illig, T., Heinrich, J., Koletzko, B., 2009, FADS Gene Cluster Polymorphisms: Important Modulators of Fatty Acid Levels and Their Impact on Atopic Diseases, *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 2 (3), 119–128.

Lewis-Barned, N. J., Sutherland, W. H. F., Walker, R. J., Jong, S. A., Walker, H. L., Edwards, E. A., Markham, V., Goulding, A., 2000, Plasma cholesteryl ester fatty acid composition, insulin sensitivity, the menopause and hormone replacement therapy, *Journal of Endocrinology*, 649–655.

Ljusberg, J., Ek-Rylander, B., Andersson, G., 1999, Tartrate-resistant purple acid phosphatase is synthesized as a latent proenzyme and activated by cysteine proteinases, *Biochem. J.,* 343(1), 63–9.

Luciani, M. F., Denizot, F., Savary, S., Mattei, M. G., Chimini, G., 1994, Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9, *Genomics*, 21 (1), 150–9.

Luong, A., Hannah, V. C., Brown, M. S., Goldstein, J. L., 2000, Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins, *J Biol Chem*, 275 (34), 26458–66.

Matsui, K., Kamijo-Ikemorif, A., Sugaya, T., Yasuda, T., Kimura, K., 2011, Renal liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) attenuates acute kidney injury in aristolochic acid nephrotoxicity, *Am J Pathol*., 178(3), 1021-32.

Matsushima, M., Inazawa, J., Takahashi, E., Suzumori, K., Nakamura, Y., 1997, Molecular cloning and mapping of a human cDNA (SC5DL) encoding a protein homologous to fungal sterol-C5-desaturase, *Cytogenet. Cell. Genet*., 74(4), 252-4.

Matsuyama, T., Nino, N., Kiyosawa, N., Kai, K., Teranishi, M., Sanbuissho, A., 2011, Toxicogenomic investigation on rat testicular toxicity elicited by 1,3-dinitrobenzene, *Toxicology*, 50843, 9.

Mc Conkey, DJ., Lin, Y., Nutt L. K., Ozel, H. Z., Newman, R. A., 2000, Cardiac glycosides stimulate Ca^{+2} increases and apoptosis in androgen independent, Metastatic human prostate adenocarcinoma cells, *Cancer Research*, 60 (14), 3807-3812.

McNamara, D. J., 1991. American Meat Science Association, 44^{th} Reciprocal Meat Conference proceedings, *Diet and Health Issues*, 44, 147-152.

Mead, J. R., Irvine, S. A., Ramji, D. P., 2002, Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease, *J Mol Med*.,80 (12), 753–69.

Meiner, V., Tam, C., Gunn, M. D., et al., 1997, Tissue expression studies on the mouse acyl-CoA: cholesterol acyltransferase gene (Acact): findings supporting the existence of multiple cholesterol esterification enzymes in mice, *J. Lipid Res*., 38(9), 1928–33.

Mekhail, T., Kellackey, C., Hutson, T., Olencki, T., Budd, T., Peereboom, D., Dreicer, R., Elson, P., Ganapathi, R., Bukowski, R., 2001, Phase 1 study of anvirzel in patients with advanced solid tumors, *American society of clinical oncology*.

Metin, M., 1998, Süt Teknolojisi Sütün Bileşimi ve İşlenmesi, *Eskişehir Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, Isparta, No:33, 793s.

Milanesi, E., Nicoloso, L., Crepaldi, P., 2008, Stearoyl CoA desaturase (SCD) gene polymorphisms in Italian cattle breeds, *J Anim Breed Genet*., 125(1), 63-7.

Miles, E. W., 1977, Modification of Histidyl residues in proteins by Diethyl pyrocarbonate, *Methods Enzymol*., 47, 431-442.

Miyazaki, M., Ntambi, J. M., 2003, Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 68, 113-121.

Morel, Y., Bristow, J., Gitelman, S. E., Miller, W. L., 1989, Transcript encoded on the opposite strand of the human steroid 21-hydroxylase/complement component C4 gene locus, *Proc. Natl. Acad. Sci*., 86 (17), 6582–6.

Mostowy, S., Tsolaki, A. G., Small, P. M., Behr, M. A., 2003, The in vitro evolution of BCG strains, *Vaccine*, 21, 4270-4274.

Mott, S., Yu, L., Marcil, M., Boucher, B., Rondeau, C., Genest, J., 2000, Decreased cellular cholesterol efflux is a common cause of familial hypoalphalipoproteinemia: role of the ABCA1 gene mutations, *Atherosclerosis*, 152, 457-68.

Muratgül, C., 2010, Mikroarray Yöntemi Ve Virolojideki Uygulama Alanları, Bitirme Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü*, Trabzon.

Nakamura, K., Kennedy, M. A., Baldan, A., Bojanic, D. D., Lyons, K., and Edwards, P. A. 2004, J. *Biol. Chem*. 279, 45980–45989 24.

Oram, J. F., Lawn, R. M., 2001, ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol*, J Lipid Res*., 42, 1173-9.

Oram, J. F., Yokoyama, S., 1996, Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids, *J. Lipid Res*., 37, 2473-91.

Ozbek, H., 2002, *Foeniculum vulgare miller* (rezene) meyvesi uçucu yağının lethal doz 50 (LD50) düzeyi ve sağlıklı ve diyabetli farelerde hipoglisemik etkisinin araştırılması, *Van Tıp Dergisi*, 9, 4.

Öner, Z., 2004, Süt ve Süt Ürünler ile Alınan Kolesterol ve Kolesterol Sentezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8 (1), 38-40.

Pathak, S., Multani, A. S., Narayan, S., Kumar, V., Newman, R. A., 2000, Anvirzel, an extract of Nerium oleander, induces cell death in human but non murine cancer cell, *Anti Cancer Drugs*, 11, 455-463.

Pernilla Lång, et al., 2008, Monomeric tartrate resistant acid phosphatase ınduces ınsulin sensitive obesity, *PLoS ONE*, 3(3), e1713.

Pietsch, J., Oertel, R., Trautman, S., Schulz, K., Kopp, B., Dressler, J., 2005, A non fatal oleander poisoning, *Int J Legal Med*., 119, 236- 240.

Pollack, J. R., Perov C. M., Alizadeh, A. A., Eisen M. B., Pergamenschikov, A., Williams, C. F., Jeffrey, S. S., Botstein, D., Brown, P. O., 1999, Genom-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays, *Nat. Genet*., 23, 41-46.

Qi, L., Heredia, J. E., Altarejos, J. Y., Screaton, R., Goebel, N., Niessen, S., Macleod, I. X., Liew, C.W., Kulkarni, R.N., Bain, J., Newgard, C., Nelson, M., Evans, R. M., Yates, J., Montminy, M., 2006, TRIB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism, *Science*.

Rakheja, D., Boriack, R. L., 2008, Precholesterol sterols accumulate in lipid rafts of patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome and X-linked dominant chondrodysplasia punctata, *Pediatr Dev Pathol*., 11 (2), 128–132.

Ramos-Valdivia, A., Van Der Heijden, R., Verpoorte, R., 1997, Isopentenyl diphosphate isomerase: A core enzyme in isoprenoid biosynthesis, *Natural product reports*, 14 (6), 591–603.

Robert, A. H., Laurence, A. M., Gray, S., Marc, P., David, R., 2006, Principles of Biochemistry, 4/E, *Pearson Prentice Hall*, Figure 16-18.

Rozman, D., 2000, Lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51)-a cholesterol biosynthetic enzyme involved in production of meiosis activating sterols in oocytes and testis-a minireview, *Pflugers Arch*., 439 (3), 56-57.

Ruf, A., Muller, F., D'Arcy, B., et al., 2004), The monotopic membrane protein human oxidosqualene cyclase is active as monomer, *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 315 (2), 247–54.

Saraçlı, M. A., 2007, DNA Chip Teknolojisi Ve Mikrobiyolojideki Uygulama Alanları, *Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Fakültesi, Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı*, Tıbbi Mikoloji Bilim Dalı, Ankara.

Satar B., 1996, Gürültüye bağlı işitme kaybında hiperkolesteroleminin etkisi, Uzmanlık Tezi, *Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Başkanlığı*, Ankara, 32-35.

Sato H., Kato R., Isogai Y., Saka G., *et al.,* 2008, Analyses of group ıı secreted phospholipase a2 transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis, *J. Biol. Chem*., 283, 33483-33497.

Satre, M. A., Zgombic-Knight, M., Duester, G., 1994, The complete structure of human class IV alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) determined from the ADH7 gene, *J. Biol. Chem*., 269 (22), 15606–12.

Saugakoff, W., Rodrigue, M., Truffotpernot, C., et al., 2004, USe of a high-density DNA probe array for detecting mutations invelved in rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis, *Clin Microbiol Infect*, 10, 289-294.

Savlı, H., 2003, DNA 'chip' Teknolojisi, KLİNİK XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji Ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kocaeli *Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AB Dalı*, 121-122.

Schabath, H., Runz, S., Joumaa, S., Altevogt, P., 2006, CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells, *J Cell Sci*., 15, 314-325.

Schaffer, R., Landgraf, J., Pereeamador, M., Wisman, E., 2000, Monitoring genome-wide expression in palnts*, Curropin Biotech*., 11, 162-167.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O., 1995, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science*, 270 (5235), 467-70.

Schlitt, A., Bickel, C., Thumma, P., Blankenberg, S., Rupprecht, H. J., Meyer, J., et al., 2003, High plasma phospholipid transfer protein levels as a risk factor for coronary artery disease, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*., 23, 1857–62.

Seçkin, K. A., Metin, M., 2003, Kimyasal yolla sütten kolesterolün uzaklaştırılması, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 37.

Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., Chretien, M., 2003, The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci*., 100 (3), 928–33.

Seidel, M., Niessner, R., 2008, Analytical microarrays: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 1521-1544.

Siddiqui, B. S., Begum, S., Siddiqui, S., Lichter, W., 1995, Two cytotoxic pentacyclic triterpenoids from *Nerium oleander*, *Phytochemistry*, 39, 171-4.

Siddiqui, S., Hafeez, F., Begum, S., Siddiqui, B. S., 1987, Isolation and structure of two cardiac glycosides from the leaves of *Nerium oleander*, *Phytochemistry*, 26 (1), 237-241.

Siddiqui, S., Siddiqui, B. S., Begum, S., Hafeez, F., 1990, Chemical constituents of *Nerium oleander*, Pak. *J. Sci. Res*., 33 (4), 127-141.

Siegenthaler, G., Hotz, R., Chatellard-Gruaz, D., Didierjean, L., Hellman, U. and Saurat, J., 1994, Purification and characterization of the human epidermal fatty acid-binding protein: localization during epidermal cell differentiation in viva and in vitro, *Biochem. J*., 302, 363-371.

Smith, J. A., Madden, T., Vijjswarapu, M., Newman, R. A., 2001, Inhibition of export of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by anvirzel and its cardiac glycoside component, oleandrin, *Biochemical Pharmocology*, 62, 469-472.

Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbower, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dohner, H., Cremer, T., Lichter, P., 1997, Matrix-based comperative genomic hybridisation: biochips to screen for genomic imalances, *Genes Chromosomes Cancer*, 20, 399-407.

Sreenıvasan, Y., Sarkar, A., Manna, S.K., 2003, Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor-kB and activator protein 1 and potentiates apoptosis induced by ceramide, *Biochemical Pharmacology*, 66, 2223-2239.

Sreenivasan, Y., Rafhavendra, P. B., Manna, S.K., 2006, Oleandrin- Mediated expression of fas potentiates apoptosis in tumor cells, *Journal of Clinical Immunology*, 26 (4), 308-310.

Stavropoulos, W. S., Crouch, R. D., 1974, A new colorimetric procedure for the determination of serum trigliserides, *Clin. Chem*., 20, 857-865.

Stein, E. A., Lane, M., Laskarzewski, P., 1998, Comparison of statins in hypertriglyceridemia, *Am J Cardiol*., 81, 66B-69B.

Steinberg, D., Witztum , J. L., 2009, Inhibition of PCSK9: A powerful weapon for achieving ideal LDL cholesterol levels*, Proc. Natl. Acad. Sci*., 106 (24), 9546–7.

Strömstedt, M., Rozman, D., Waterman, M. R., 1996, Arch. Biochem., *Biochem. Biophys*.,329, 73-81.

Summers, W. C., 1970, A simple method for the extraction of RNA from *E. coli* with DEPC, *Anal. Biochem*., 33, 459-463.

Svensson, L. T., Engberg, S. T., Aoyama, T., Usuda, N., Alexson, S. E. H. and Hashimoto, T., 1998, Molecular cloning and characterization of a mitochondrial peroxisome proliferator-induced acyl-CoA thioesterase from rat liver, *Biochem. J*., 329, 601-608.

Temel, R. E., Hou, L., Rudel, L. L., Shelness, G. S., 2007, ACAT2 stimulates cholesteryl ester secretion in apoB-containing lipoproteins*, J. Lipid Res*., 48 (7), 1618–27.

Thoma, R., Schulz-Gasch, T., D'Arcy, B., et al., 2004, Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase, *Nature*, 432 (7013), 188–22.

Thompson, M. P., Kim, D., 2004, Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs, *FEBS Lett*., 568 (1-3), 4-9.

Tok, E., 2007, Probiyotik olarak kullanılabilecek bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol giderimi özellikleri ve safra tuzu dekonjugasyonu etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 14-16.

Tok, E., Aslım, B., 2007, Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolestrol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 37 (1), 62-68. YAYININ ADI EKSİK)

Tol, A., et al., 2002, Phospholipid transfer protein, *Curr Opin Lipidol*., 13, 135–9.

Uelmen, P. J., Oka, K., Sullivan, M., Chang, C. C., Chang, T. Y., Chan, L., 1995, Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization, and regulation of ACAT in vivo and in vitro, *J. Biol. Chem*., 270 (44), 26192–201.

Ulrike, F., Taylor, A. K., Robert, A., Pascal, J., Akihiro, I., Mitsuhiro, T., and George, J., Schroepfer, J., 1981, Sterol synthesis: a simple method for the isolation of zymosterol (5a-cholesta-8,24-dien-3&01) from yeast and spectral properties of zymosterol, *J. Lipid Res*., 22, 171-177.

Vance, D. E., Vanden Bosch, H., 2000, Cholesterol in the Year 2000, *Biochimica et Biophysia Acta*, 1529, 1-8.

Vaughan, A. M. and Oram, J. F., 2006, ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins, *The Journal of Biologıcal Chemistry*, 280 (35), 30150–30157.

Veerkamp, J. H., Peeters, R. A. and Maatman, R. G. H. J., 1991, Primary structure and binding characteristics of locust and human muscle fatty-acid-binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta*., 1081, 1-24.

Vessby, B., Tengblad, S., and Lithell, H., 1994, Insulin sensitivity is related to the fatty acid composition of serum lipids and skeletal muscle phospholipids in 70-year-old men, *Diabetologia*, 1044-1050.

Voet, D., Voet, J. G., 1995, *Bochemistry*, Jhon Wiley and Sons, America, 1361s.

Voss, M. D., Beha, A., Tennagels, N. et al., 2005, Gene expression profiling in skeletal muscle of Zucker diabetic fatty rats: implications for a role of stearoyl-CoA desaturase 1 in insulin resistance, *Diabetologia*, 48, 2622-2630 .

Vrana, K. E. Freeman, W. M., Aschneer, M., 2002, Use of Microarray Technologies In Toxicology Research, *Neure Toxicology*, 24, 321-332.

Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., and Tall, A. R., 2004, ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain, *Proc. Natl. Acad. Sci*.,101, 9774–9779.

Wang, X., Plomley, J.B., Newman, R.A., Cisneros, A., 2000, LC/MS/MS analysis of an oleander extract for cancer treatment, *Anal. Chem*., 72, 3547- 3552.

Weickert, M. O., Loeffelholz, C. V., Roden, M., Chandramouli, V., Brehm, A., Nowotny, P., Osterhoff, M.A., Isken, F., Spranger, J., Landau, B. R., Pfeiffer, A. F., Mohlig, M., 2007, A Thr94Ala mutation in human liver fatty acid-binding

protein contributes to reduced hepatic glycogenolysis and blunted elevation of plasma glucose levels in lipid-exposed subjects, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293 (4), 1078–84.

Wilcox, C. B., Feddes, G. O., Willett-Brozick, J. E., Hsu, L C., DeLoia, J. A., Baysal, B. E., 2007, Coordinate up-regulation of TMEM97 and cholesterol biosynthesis genes in normal ovarian surface epithelial cells treated with progesterone: implications for pathogenesis of ovarian cancer, *BMC Cancer*, 11 (7), 223.

Wilson, M., Derisi, J., Kristensen, H., İmboden, P., Rane, S., Brown, P. O., Schoolnik, G. K., 1999, Exploring drug-induced alterations in gene expression in Mycobacterium tuberculosis by microarray hybridization, *Proc. Natl. Acad Sci*., 96, 12833-12836.

Wolfgang, M. C., Kulasekara, B. R., Liang, X., et al., 2003, Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc Natl Acad Sci*., 100, 8484-8489.

Yamada, J., Suga, K., Furihata, T., Kitahara, M., Watanabe, T., Hosokawa, M., Satoh, T. and Suga, T., 1998, cDNA cloning and genomic organization of peroxisome proliferator-inducible long-chain acyl-CoA hydrolase from rat liver cytosol, *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 248, 608-612.

Yamamoto, S., Lin, K., Bloch, K., 1969, Some properties of the microsomal 2,3-oxidosqualene sterol cyclase, *Proc. Natl. Acad. Sci*., 63 (1), 110–7.

Yamauchi, T., Takata, N., Mimura, T., 1975, Cardiac glycosides of the leaves of Nerium odorum, *Phytochemistry,* 14, 1379-1382.

Yazdanyar, A., Yeang, C. and Jiang, C., 2011, Role of Phospholipid Transfer Protein in High-Density Lipoprotein– Mediated Reverse Cholesterol Transport, *Curr Atheroscler Rep*., 13(3), 242–248.

Yazihan, N., Bas, A. L., Ermis, E., Demirci, Ş., Uney, K., 2012, Increased Glucose Uptake and Insulin Binding Activity of Nerium Oleander in Hepatocytes and Adipocytes, *Kafkas Univ Vet Fak Derg*.

Yoltaş, A., Karaboz, İ., 2010, DNA Mikroarray Teknolojisi Ve Uygulama Alanları, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 8, 01-19.

Zhang, J., Chen, S., Zhang, S., Lu, Z., Yang, H., Wang, H., 2009, Over-expression of phospholipase D3 inhibits Akt phosphorylation in C2C12 myoblasts, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 25(10), 1524-31.

Zhao, M., Zhang, S., Fu, L., Li, N., Bai, J., Sakai, J., Wang, L., Tang, W., Hasegawa, T., Ogura, H., Kataoka, T., Oka, S., Kiuch, M., Hirose, K., Ando, M., 2006, Taraxasterane- and ursane-type triterpenes from *Nerium oleander* and their biological activities, *J Nat Prod*, 69, 1164-7.

Zia, A., Siddiqui, B. S., Begum, S., Siddiqui, S., Suria, A., 1995, Studies on the constituents of the leaves of *Nerium oleander* on behavior pattern in mice, *J Ethnopharmacol*, 49, 33-9.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Burcu Asena Odabaşı
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Konya-13.03.1987
Telefon	**:**	0533 461 10 86
Faks	**:**	-
e-mail	**:**	burcuasenaodabasi@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Özel Ufuk Lisesi, Alanya, Antalya	2005
Üniversite	:	Akdeniz Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Muratpaşa, Antalya	2010
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi , Biyoloji A. B. D., Selçuklu, Konya	2013

YABANCI DİLLER

İngilice