



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**YÜKSEK YAĞLI DİYETLE OBEZİTE OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA N-ASETİLSİSTEİNİN SERUM VE
KARACİĞER PARAOKSONAZ-1 (PON-1)
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Deniz DUMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN

TRABZON-2014

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Prof. Dr. Asım ÖREM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Deniz DUMAN' nın hazırladığı "Yüksek Yağlı Diyetle Obezite Oluşturulan Sıçanlarda N-asetilsisteinin Serum ve Karaciğer Paraoksonaz-1 (PON-1) Aktiviteleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Fulya B. YÜCESAN

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ahmet ALVER

Yrd. Doç. Dr. Fulya B. YÜCESAN

Yrd. Doç. Dr. Tuğba DİNÇER

Tarih: 21/07/2014

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Ahmet KALKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

21.07.2014

Deniz DUMAN

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bu projenin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, başta danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN'a,

Yüksek lisans eğitimimde büyük ve sayısız emekleri olan Anabilim Dalımız öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Eşref Edip KEHA, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Birgül V. KURAL, Doç. Dr. Ahmet ALVER, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye,

Çalışma süresinde yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Serap ÖZER YAMAN'a, kendi çalışmasındaki bilgilerini ve deneyimlerini paylaşan Araş. Gör. Cemil KAHRAMAN'a

Teknik destek ve yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunan bütün arkadaşlarıma ve tüm KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde bulunan personele,

111S252 nolu proje ile maddi kaynak sağlayan TÜBİTAK'a

Eğitimim ve hayatımın her aşamasında beni olağanüstü bir özveriyle destekleyen aileme, en önemlisi de sevgili kızıma sonsuz ve yürekten teşekkür ederim.

Deniz DUMAN

İÇİNDEKİLER

ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

KISALTMALAR DİZİNİ

viii

1. ÖZET

1

2. SUMMARY

2

3. GİRİŞ ve AMAÇ

3

4. GENEL BİLGİLER

5

4.1. Obezite

5

4.2. Oksidatif Stres

6

4.3. Oksidatif Stres ve Obezite

7

4.4. Obezite ve Ateroskleroz

8

4.5. HDL ve Koruyucu Etkisi

9

4.6. Paraoksanaz (PON)

9

4.7. Obezite ve PON

12

4.8. PON1 Aktiviteleri ve Substratları

12

4.8.1. Paraoksanaz Aktivitesi

12

4.8.2. Arilesteraz Aktivitesi

13

4.8.3. Laktonaz Aktivitesi

13

4.9. NAC

15

5. GEREÇ ve YÖNTEM

17

5.1. Gereç

17

5.2. Yöntem

17

5.2.1. Deney Grupları

18

5.2.2. Serum Lipid Parametrelerinin Ölçülmesi

21

5.2.3. Serum PON1 Enzim Aktivitesinin Tayinleri

21

5.2.3.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

21

5.2.3.2. Serum Paraoksanaz Enzim Aktivitesi Tayini

22

5.2.3.3. Serum Arilesteraz Enzim Aktivitesi Tayini

23

5.2.3.4. Serum Laktonaz Enzim Aktivitesi Tayini

24

5.2.4. Mikrozom PON1 Enzim Aktiviteleri Tayini

25

5.2.4.1. Mikrozomal Fraksiyonun Hazırlanması	25
5.2.4.2. Mikrozomal Membranların Çözünmesi	25
5.2.4.3. Mikrozom Paraoksanaz Enzim Aktivitesi Tayini	26
5.2.4.4. Mikrozom Arilesteraz Enzim Aktivitesi Tayini	26
5.2.4.5. Mikrozom Laktonaz Enzim Aktivitesi Tayini	27
5.2.5. Protein Tayini	27
5.2.5.1. Kullanılan Çözeltiler	28
5.2.5.2. Deneyin Yapılışı	28
5.2.6. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	29
6. BULGULAR	30
6.1. Çalışma Grubu Ağırlık Değerleri	30
6.2. Çalışma Grubu Glukoz-Lipid Değerleri	30
6.3. Çalışma Grubu Serum PON1 Değerleri	31
6.4. Çalışma Grubu Mikrozom PON1 Değerleri	31
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	33
8. KAYNAKLAR	36
9. EKLER	44
9.1. Ek 1. Etik Kurul Onayı	44
10. ÖZGEÇMİŞ	45

KISALTMAR DİZİNİ

ARE	Arilesteraz
HDL-K	Yüksek Dansiteli Lipoprotein Kolesterol
LAC	Laktonaz
LDL-K	Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol
NAC	N-Asetilsistein
oxLDL	Okside LDL
PON	Paraoksonaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
TEKHARF	Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri Çalışması
TG	Trigliserid
TK	Total Kolesterol
TURDEP	Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevelans Çalışması
VKİ	Vücut Kütle İndeksi
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

1. ÖZET

YÜKSEK YAĞLI DİYETLE OBEZİTE OLUŞTURULAN SIÇANLARDA N-ASETİLSİSTEİNİN SERUM VE KARACİĞER PARAOKSONAZ-1 (PON-1) AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Obezite, glukoz ve lipid metabolizması bozuklukları, kardiyovasküler hastalıklar ve oksidatif stresin artışı ile ilişkilidir. Paraoksonaz-1 antioksidan etkiye sahip bir enzimdir. Paraoksonaz-1'in yüksek yağlı diyet ile oluşan obezite ve obezite ile ilişkili bozukluklara karşı koruyucu etki gösterdiği öne sürülmektedir. Çalışmamızda yüksek yağlı diyetle indüklenmiş obez sıçanların serum ve karaciğer paraoksonaz-1 enzim aktivitelerini (paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz) N-asetilsistein (NAC) varlığında değerlendirmeyi amaçladık. NAC glutatyon öncülü olan antioksidant etkiye sahip bir moleküldür.

Çalışma grubu her birinde 6 adet Sprague Dawley ırkı erkek sıçan bulunan kontrol, obez ve diyetine NAC ilave edilen obez (2 g/L NAC) gruplarından oluşturuldu. Kontrol grubu standart sıçan yemiyle, obez ve NAC grubu yüksek yağ içerikli yemle beslendi. Serum ve karaciğer paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri spektrofotometrik yöntem ile belirlendi.

Serum paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri obez ve NAC grubunda kontrol grubuna göre düşük bulunsada istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Mikrozom paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri NAC grubunda kontrol ve obez gruba göre yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

Yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda paraoksonaz-1 enzim aktivitelerinin değişmediği kanatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Arilesteraz, HDL, laktonaz, N-asetilsistein, obezite

2. SUMMARY

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE ON PARAOXONASE-1 (PON-1) ACTIVITIES OF SERUM AND LIVER AT HIGH FAT DIET INDUCED OBESE RATS

Obesity is related with glucose and lipid metabolism disorders, cardiovascular diseases and increased oxidative stress. Paraoxonase-1 is an enzyme which has antioxidant effect. It has been suggested that paraoxonase-1 has protective effects against high fat diet induced obesity and obesity related disorders. The aim of this study was to evaluate the serum and liver paraoxonase-1 enzyme activities (paraoxonase, arylesterase and lactonase) at high fat diet induced obese rats in the presence of N-acetylcysteine (NAC). NAC is a molecule which has an antioxidant property and precursor of glutathione.

Control, obese and NAC-supplemented obese (2 g/L NAC) groups were established. Each group consisted of 6 Sprague-Dawley rats. Control rats were fed by standart food and obese and NAC groups were fed by high fat diet. The serum and liver paraoxonase, arylesterase and lactonase activities were determined by colorimetric methods.

Serum paraoxonase, arylesterase and lactonase activities decreased in obese and NAC groups when compared to control groups. On the other hand microsomal paraoxonase, arylesterase and lactonase activities increased in NAC group when compared to control and obese groups. However these were not statistically significant.

It has been concluded that the serum and liver paraoxonase-1 enzyme activities did not change at high fat diet induced obese rats in the presence of N-acetylcysteine.

Key Words: Arylesterase, HDL, lactonase, N-acetylcystein, obesity

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Obezite glukoz, lipid ve lipoprotein metabolizması bozuklukları, kardiyovasküler hastalık riskinin ve oksidatif stresin artışı ile ilişkilidir. Obez insanlarda kolesterol, triaçilgliserol, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol ve apolipoprotein B düzeylerinin arttığı, yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol düzeyinin azaldığı gözlenmiştir. Obez insanların lipid ve lipoprotein profillerinde gözlenen bu bozukluklar kardiyovasküler hastalık riskini arttırabileceği için oldukça önemlidir. Buna ek olarak lipid profilinde meydana gelen değişiklikler obezitede oksidatif stresin artmasına katkıda bulunur (1). Antioksidan savunma mekanizmalarının azalması kadar reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artması obezitede oksidatif stres oluşumunda rol oynar. Oksidatif stres biyobelirteçlerinin obezitede arttığı gözlenmiştir. Hücre metabolizması sırasında üretilen ROS normalde antioksidanlar tarafından uzaklaştırılarak dengelenir. Normal koşullar altında katalaz ve süperoksit dismutaz gibi koruyucu hücre içi enzimler ve glutatyon, A, C ve E vitamini gibi non-enzimatik antioksidanlar ROS birikimini önler. Oksidatif stres prooksidan-antioksidan dengenin bozulması sebebi ile meydana gelir (1).

Paraoksonaz 1, HDL yapısında bulunan antioksidan etkiye sahip bir enzimdir. PON-1, paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz olmak üzere üç farklı enzimatik aktiviteye sahiptir. HDL ve LDL'yi oksidasyondan korur. HDL, oksidatif stres altında oksidasyona maruz kalmaktadır. HDL-Kolesterol yapısında bulunan hidroperoksitler reaktif hidroksitlere indirgenmektedir. Ancak bu olay LDL'den daha hızlı ve az miktarda gerçekleşmektedir. HDL' nin oksidasyona uğraması ters yönde kolesterol taşınım fonksiyonunu bozmaktadır. PON-1 HDL' yi oksidasyondan koruyarak ters yönde kolesterol taşınım mekanizmasının devamını sağlamaktadır. Böylece makrofajlarda kolesterol birikimini engelleyerek köpük hücre oluşumunu ve ateroskleroz gelişimini yavaşlatmaktadır (2, 3). PON-1 okside fosfolipidleri yıkmak suretiyle, okside LDL'nin monositlere bağlanıp transmigrasyona uğramasını ve dolayısıyla damar duvarında inflamasyon oluşumunu azaltır (2).

Obezitenin kardiyovasküler hastalık riskini ve oksidatif stresi arttırdığı düşünüldüğünde paraoksonaz aktivitesi önem kazanmaktadır. Obez insan ve hayvanlarda PON-1 aktivitesini belirleyen çalışmalar mevcuttur. Ferreti ve ark. sağlıklı

ve obez kişilerde lipoprotein, oksidatif stres ve HDL-PON aktivitesini araştırdıkları bir çalışmada obezlerde HDL-PON aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu göstermiş ve HDL içeriğindeki değişimlerin HDL yüzeyine paraoksonaz bağlanmasını etkileyerek enzim aktivitesini azalttığını öne sürmüşlerdir (5). Knockout ve transgenik fare çalışmalarında PON-1'in vasküler hastalıklarda güçlü bir rolü olduğu ileri sürülmüş, serum PON-1 seviyesinin düşük olduğu farelerde ateroskleroza yatkınlığın ve stenoz oranının arttığı gözlenmiştir (6). Serum PON-1 düzeyini etkileyen çevresel ve genetik faktörler HDL' nin LDL'yi oksidasyondan koruma kapasitesini etkiler (7). 2007 yılında yapılan bir çalışmada obez bireylerin diyetlerine eklenen orlistatin PON-1 aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir (8).

N-asetilsistein (NAC) bazı gıdalarda bulunan antioksidan, antikarsinojen ve anjiyogenezi önleyici özelliklere sahip bir moleküldür, vücut için önemli bir antioksidan molekül olan glutatyonun öncülüdür (9). Novelli ve ark. yaptıkları çalışmalar sonucunda NAC'ın sukroz içeriği yüksek diyet ile indüklenen obezitede kalp dokusunda oksidatif stresi azalttığını saptamış ve NAC'ın obezitenin kalp dokusu üzerindeki olumsuz etkisini önlediğini ileri sürmüştür (10).

Bu çalışmanın amacı, yüksek yağlı diyet uygulanarak obez yapılmış sıçanlarda oksidatif stresi azaltıcı etkiye sahip N-asetilsistein takviyesinin PON-1 enzimi paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktivitelerine etkilerini ortaya koymaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Obezite

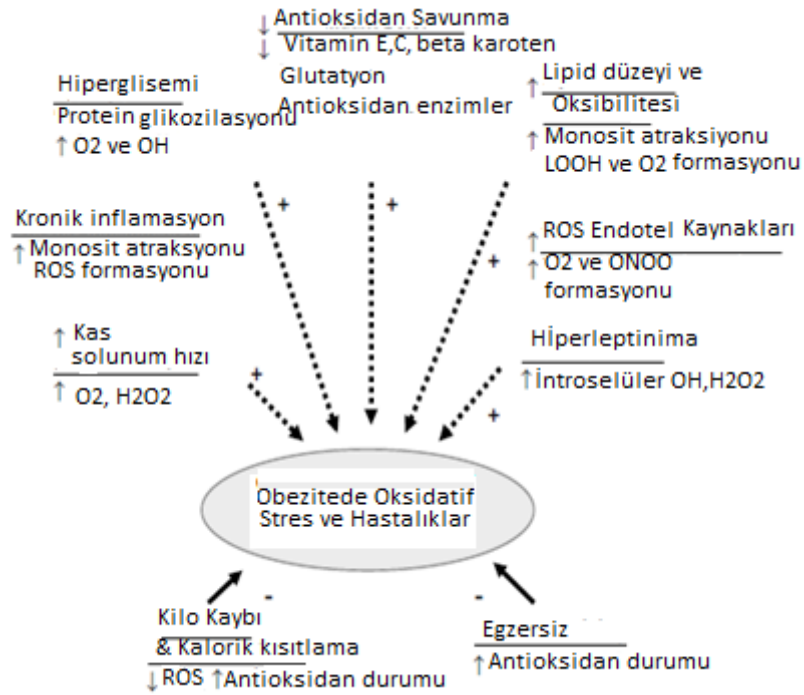
Obezite anormal derecede yağ birikimiyle birlikte ortaya çıkan ve sağlık üzerine negatif etki yapan hayat standardını düşüren bir koşuldur. Harcanamayarak vücut içinde birikmiş fazla enerjinin yağ hücresi olarak depolanması sonucu ortaya çıkar. Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenmiş sınıflamaya göre vücut kütle indeksi (VKİ=kişinin kilosunun boyunun karesine oranı) 30.0-39.9 aralığında olanlar obez, 40.5 ve üzerinde olanlar morbid (ciddi obez) şeklinde tanımlanmıştır (4).

Dünya Sağlık Örgütü 2008 yılında 1.5 milyar yetişkinin fazla kilolu olduğunu açıklamış, bu sayının 2015 yılında 2.3 milyar yetişkine çıkacağı ve bu fazla kilolu insanların içinde de 700 milyon yetişkinin obez olacağı ön görülmüştür (4).

Türkiye’de 24.788 kişinin tarandığı bir çalışmanın (TURDEP-I) sonuçları değerlendirildiğinde kadınlarda %30, erkeklerde %13, genelde ise %22.3 düzeylerinde obezite prevalansı tespit edilmiştir. Yaş dağılımı incelendiğinde obezite sıklığının 30’lu yaşlarda arttığı, 45-65 yaşları arasında artarak zirve yaptığı görülmüştür. TURDEP-I çalışmasından 12 yıl sonra yapılan TURDEP-II çalışmasında Türk erişkin toplumunda obezite sıklığının 1998’de %22.3’ten %40 artarak 2010’da %31.2’ye ulaştığı görülmüş. Kadınlarda obezite sıklığı %44, erkeklerde ise %27’dir ve son 12 yılda kadınlarda obezite %34, erkeklerde ise %107 artmıştır (12, 13).

TEKHARF çalışmasında Onat ve ark. 1990’dan 2000 yılına ülkemizde obezite prevalansının kadınlarda %36, erkeklerde %75 oranında arttığını 2000 yılında obezite prevalansının erişkin kadınlarda %43, erkeklerde ise %21.1 olduğunu bildirmişlerdir (14).

Vücut kütlesindeki artış ile adipoz dokunun birikimi yaşla bağlantılı olan çeşitli hastalıkların (kardiyovasküler hastalıklar, tip2 diyabet, kas-iskelet sistemi hastalıkları, solunum yolu bozuklukları ve bunun gibi) ortaya çıkma riskini arttırır (15, 16). Özellikle abdominal obezitenin kalp hastalıklarını ciddi oranda arttıran ve tip II diyabet oluşumuna zemin hazırlayan Metabolik Sendrom ile ilişkisi bilimsel olarak kanıtlanmıştır (16). Vücut kompozisyonundaki ve kütlesindeki bu dengesizlik şimdilerde organizma için oksidatif stres ve inflamasyonun bir basamağı olarak tanınmıştır (Şekil 1) (16, 17).



Şekil 1. Obezite, oksidatif stres ve hastalıklar ile ilişkisi (17).

4.2. Oksidatif Stres

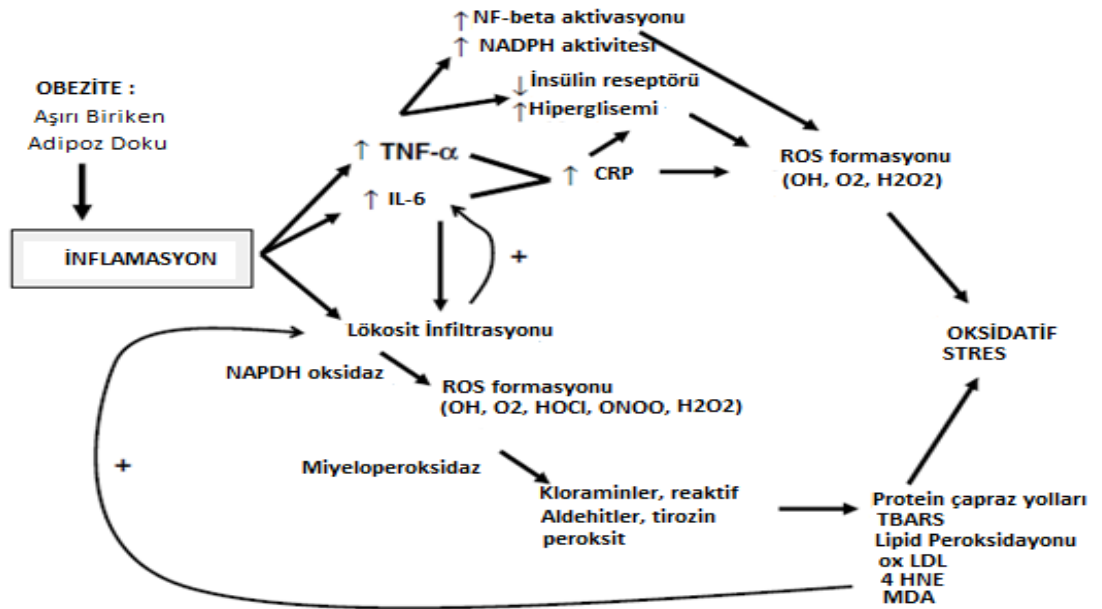
Serbest radikaller vücudumuzda besinlerin oksijen kullanarak enerjiye çevrilmesi sırasında oluşan metabolik yan ürünlerdir. Serbest radikaller (reaktif oksijen türleri) kararsız yapıdadırlar ve kararlı hale gelmek için hücrelere saldırarak hasar oluştururlar. Antioksidanlar ise serbest radikalleri etkisiz hale getirerek hücreleri bu hasarlardan korurlar. Serbest radikaller ve antioksidanlar vücutta dengede olmalıdır ki, antioksidanlar serbest radikalleri etkisiz hale getirebilsin. Eğer serbest radikal seviyesi, antioksidan seviyesine göre artar ise serbest radikaller hücrelerde oksidatif hasarlara yol açar ve bu duruma oksidatif stres denir (18). Başka bir deyişle oksidatif stres oksidan ve anti-oksidan sistemler arasındaki dengenin oksidan sistemler lehine bozulması sonucu lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen ürünlerinin açığa çıkarak organizmada hücrel hasara yol açması olarak da tanımlanabilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda adipoz dokunun artışıyla birlikte cinsiyet ve yaş faktörleri de göz önüne alındığında obezitenin yaşam süresini (özellikle genç yaşlarda ortaya çıkmışsa) ciddi ölçüde azalttığı görülmüştür. Obezitenin yol açtığı

oksidatif stres ve inflamasyonun artışı olumsuz yönde telomerleri etkiler. Telomerler DNA-protein yapıda özelleşmiş olup ökaryotik kromozomların en sonunda yer alır ve biyolojik yaşlanmanın hızından sorumludur. Oksidatif stres ve inflamasyon sonucu telomerler kısalır bu durum biyolojik yaşlanmayı hızlandırır (16).

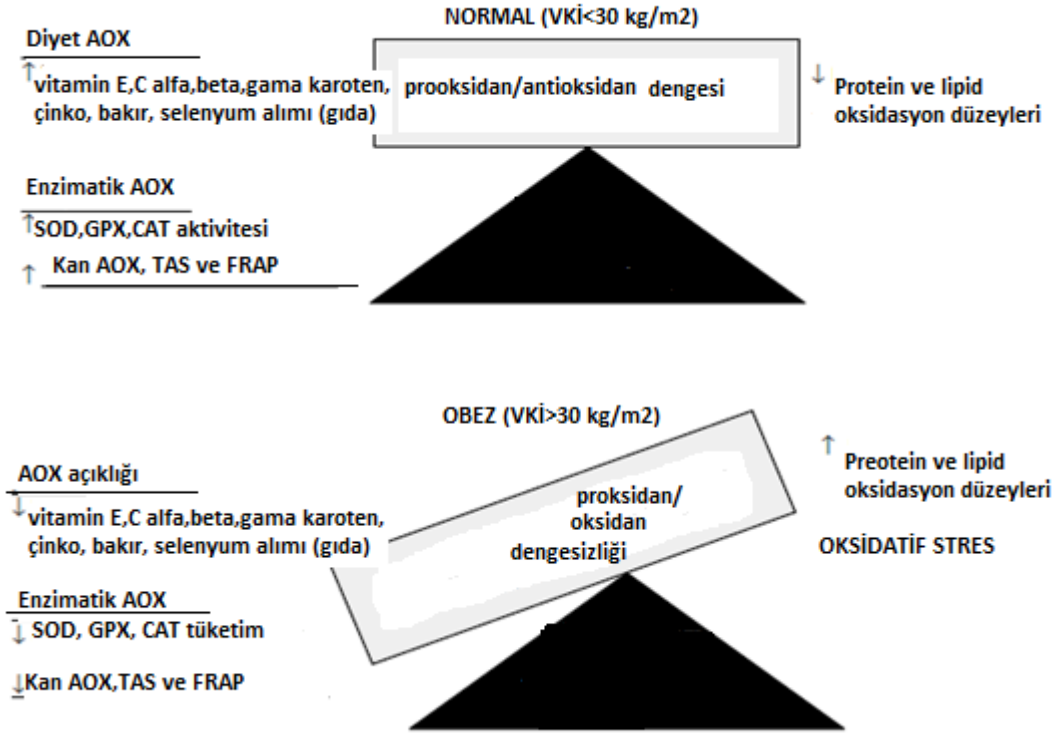
4.3. Oksidatif Stres ve Obezite

Oksidatif stres birçok hastalığın patogeneğinde kritik öneme sahip bir olaydır (18). Obezite de barındırdığı kardiyovasküler risk faktörlerinden bağımsız olarak “artmış kronik oksidatif stres durumu” olarak tanımlanmış bir hastalık sürecidir (17). Obezite ile ilişkili oksidatif stres artışının mekanizması için ileri sürülen nedenlerden birisi obezitenin miyokardın metabolik ve mekanik iş yükünü arttırmasıdır. Miyokartta artmış oksijen tüketiminin negatif sonucu olarak mitokondriyal respirasyon artmakta ve bu durum reaktif oksijen ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (19, 20). Öne sürülen ikinci mekanizma ise geniş vücut kütlelerinden kaynaklanan basınç nedeniyle tümör nekroz faktör alfa (TNF-alfa) başta olmak üzere çeşitli sitokinlerin salınımına yol açar ve bu durum dokularda reaktif oksijen ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olur (Şekil 2) (19, 20, 22).



Şekil 2. Obezitede inflamasyon yolları (22).

Diğer olası mekanizmalardan biri de doğrudan diyetle ilgilidir. Diyetle antioksidan kapasiteyi aşacak şekilde aşırı miktarda serbest yağ asidi alımı lipid peroksidasyonuna yol açarak oksidatif stresi indükleyebilir (19).



Şekil 3. Obezitede oksidan-antioksidan durumu (21).

4.4. Obezite ve Ateroskleroz

Ateroskleroz orta ve büyük arterlerin intima tabakasında gelişen, “aterom” denilen fibröz-yaglı plak oluşumu ile karakterize, kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Ateroskleroz gelişimi uzun yıllar alan kronik bir süreçtir (23).

Ateroskleroz genellikle ergenlik çağında arter duvarında yağlı bir çizgilenme şeklinde başlar. Çoğu büyük arterlerde olduğu için kendini belli etmez. Bu çizgisel yağlanma LDL geçişi ile arterin intima tabakasına ilerler. Oksidatif faktörlerin varlığında intimada LDL birikimi kolaylaşır. LDL oksidasyonu sonucunda okside LDL (ox-LDL) ortaya çıkar. ox-LDL monosit adezyon protein, MCP-1 (monosit kemoatraktan protein) ve GM-CSF (granülosit-monosit koloni uyarıcı faktörler) salgılamasına yol açar. Lökositler gibi mononükleer hücrelerin de ortama katılmasıyla düz

kas hücrelerinde migrasyon başlar, yağlı çizgiler büyür ve patolojik aterosklerotik plaklar haline gelir (24).

Obezite ve ateroskleroz arasındaki ilişki adipoz doku birikimi ile açıklanabilir. Adipoz doku birikimi vücut kütleinde artış neden olur. Kanda bulunan lipit düzeyi artar ve damar duvarında yağ çizgilenmesi başlar. Bu çizgisel yağlanma diyetle alınan serbest yağ asitleri ve vücut kütleindeki artışla birlikte bu yağlanma LDL geçişi ile birlikte arter intimasına ilerler. Vücut kütleindeki artış aterosklerozun oluşmasında ana nedenlerden biridir.

4.5. Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL) ve Koruyucu Etkisi

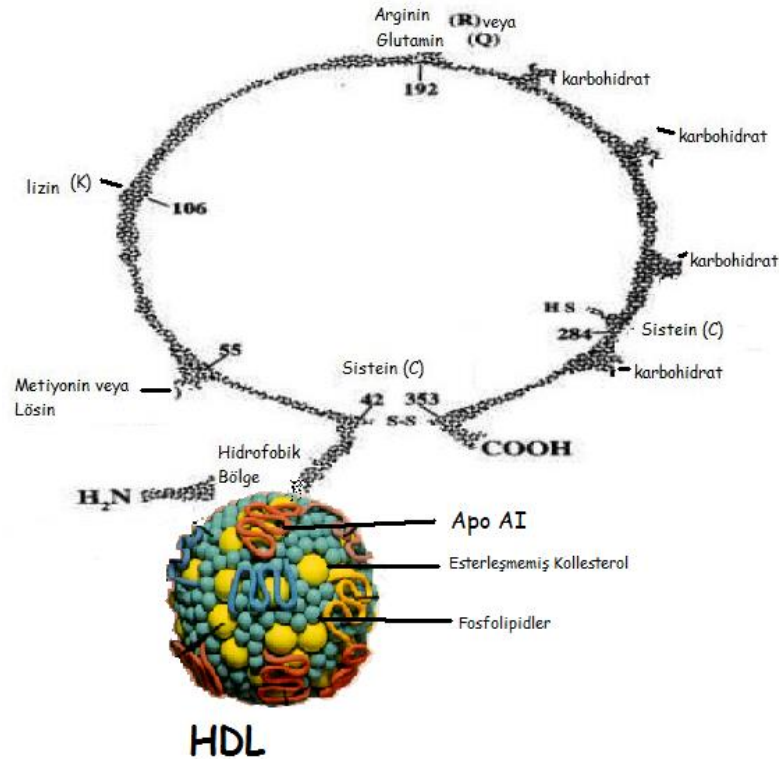
HDL karaciğerde ve ince bağırsak duvarında sentezlenir. Karaciğerde ve ince bağırsak duvarında sentezlenen HDL diskoidal şekillidir. ApoA-I, ApoA-II, lesitin ve serbest kolesterol içerir. Yeni sentezlenen ve kan dolaşımına salıverilen HDL, dolaşımdaki diğer lipoproteinlerden kolesterol esterlerini toplar ve küre şekilli olgun HDL şekline dönüşür. Kolesterolde zenginleşen HDL, karaciğere dönünce kolesterolü bırakır; böylece HDL, kolesterolü dokulardan karaciğere taşımış olur. HDL kitlesinin %50'si protein, %30'u fosfolipid, %20'si kolesteroldür. HDL'nin artması organizmanın lehine, azalması ise aleyhinedir. HDL serumda PON-1 taşınmasında görev alır (25, 26).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda HDL üzerinde bulunan kalsiyuma bağlı paraoksonazın okside olmuş lipitlerin metabolizması ve aterosklerozdan korumada önemli fizyolojik rolü olduğu görülmektedir. PON-1 antioksidan ve antienflamatuar özellikleri sayesinde HDL'yi oksidasyondan korur (27-30).

4.6. Paraoksonaz (PON)

Paraoksonaz kalsiyum bağımlı glikoprotein yapıda olan bir ester hidrolazdır. Hem arilesteraz (E.C 3.1.1.2) hem de paraoksonaz (E.C 3.1.8.1) aktivitesine sahiptir (31). Yapısındaki iki kalsiyum iyonundan birinin uzaklaşması halinde denatüre olur. Diğer kalsiyum iyonu ise katalitik etki göstererek su molekülü ve fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşerek organofosfat bileşiklerin hidrolizinde görev alır. Yapısında bulunan 3 tane hidrofobik heliks zincir HDL'ye bağlanmasında, aktif bölgenin yapısının belirlenmesinde görev alır (Şekil 4) (32-35).

İlk bulunduğunda enzime paraoksonaz adı verilmesinin sebebi son derece tehlikeli bir organofosfat tarım ilacı parationun toksik metaboliti olan paraoksonu (organofosfat substratı) hidroliz edebilmesidir (36). İlk olarak Abraham Mazur tarafından 1946 yılında keşfedilmiştir (37). Fakat sonraki yıllarda yapılan keşifler sonunda enzim insan serum paraoksonazı (PON-1) ismini almıştır (38, 39).



Şekil 4. HDL'ye bağlı PON yapısı (35).

Paraoksonaz PON-1, PON-2 ve PON-3 olmak üzere 3 üyeden oluşmuştur. PON-1 insanda karaciğerde sentezlenip kana salınır. 43kDa moleküler ağırlığa sahip ve 354 aminoasitten oluşan bir proteindir. PON-1 serumda genellikle HDL üzerinde bulunur (31, 40, 41). PON-3 de PON-1 gibi karaciğerde eksprese olur, düşük miktarda böbreklerde bulunur ve HDL ile ilişkilidir. PON-2 ise serumda tespit edilememesine rağmen beyin, karaciğer, böbrek ve testis gibi birçok dokuda eksprese olur ve pek çok mRNA formu vardır (42, 43).

PON-1 karaciğerde sentezlenmesine karşın serumda HDL yapısında bulunur. Dolaşımda taşıyıcıya gereksinim duyar ve bu taşıyıcı da HDL'dir. Apo I ve Apo J,

PON-1'in HDL'ye bağlanmasında rol aldığı düşünülebilir (3, 45). PON-1 aktivitesi serumda lipoproteinlerin yokluğunda gözlemlenmemiştir. Bu durum serumdaki PON-1 düzeyini etkileyen faktörün HDL olduğunu ortaya koymuştur (3,32). Fakat bazı çalışmalar şilomikronlar ve VLDL'lerde çok az da olsa PON-1 bulunduğunu göstermiştir (3).

Yapılan diğer çalışmalarda ise PON-1 ve PON-3' ün LDL' nin lipid oksidasyonunu inhibe ettiği böylece ateroskerozu başlatan ve ilerleten okside lipid seviyelerini azalttığını göstermiştir (47). PON' lar aynı zamanda platelet aktive faktör hidrolizi (48), lipid oksidasyonu (49), homosistein tiyolakton hidroliz ve inaktivasyonu yapar (50). PON-1'in ateroskleroz üzerinde olumlu aktivitesi HDL üzerindeki lokasyonu ile ilgilidir. Kolesterol akışına aracılık eder ve LDL' nin lipid oksidasyonunda sınırlama rolünün üstlenir. Bunların dışında PON-1 makrofaj kolesterol biyosentezini inhibe eder ve makrofajlara kolesterol akışını stimüle eder. Ayrıca PON-1 kolesterol esterlerinin peroksitlerini metabolize eder (51, 52). HDL'nin glikasyon ve homosisteinilasyon yakınlığında modilatör etkinliği vardır (5). Bunun dışında PON-1' in LDL oksidasyonunun engellenmesinde Lesitin Kolesterol Açıltransferaz (LCAT) ve Apo A1 üzerinden etkili olduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır (54).

PON-1 ile ateroskleroz arasındaki ilişki PON-1 ile HDL'nin arasındaki ilişki ile alakalıdır. PON-1 antioksidan ve antienflamatuar özellikleri sayesinde HDL'yi oksidasyondan koruyarak LDL'yi hidrolizler. Lipid peroksit oluşumunu büyük ölçüde azaltır. Böylece fatty streak (yağlı çizgi) oluşumunu önlemede ciddi rol oynamış olur.

Serumda PON miktarının artması sonucunda HDL'nin oksidasyona karşı direncinin arttığı gözlenmiştir. PON inhibitörleri ise serum PON aktivitesini azaltarak ve HDL oksidasyonunu artırır (58). HDL' ye bağımlı PON aktivitesi araştırıldığında HDL'nin LDL oksidasyonu üzerindeki inhibitör etkisinin metal iyon şelasyonu ve peroksidaz benzeri aktiviteden kaynaklandığı saptanmıştır (60). Knockout ve transgenik fare çalışmalarında PON-1'in vasküler hastalıklarda güçlü bir rolü olduğu ileri sürülmüştür. Serum PON-1 seviyesinin düşük olduğu farelerde ateroskleroza yakınlığın ve stenoz oranının arttığı gözlenmiştir (61).

4.7. Obezite ve PON

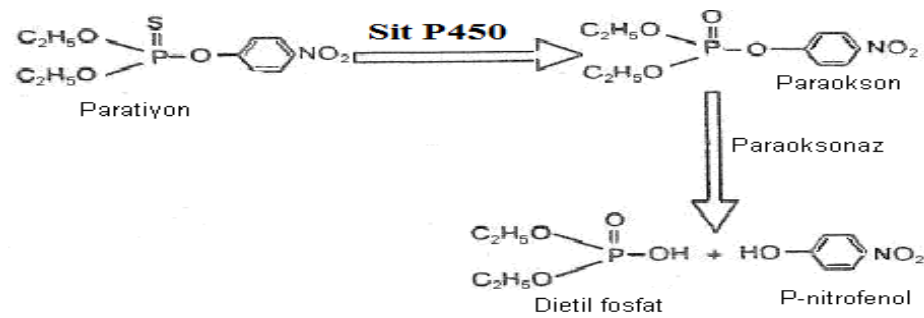
Obezite-PON ilişkisi oksidatif stres ve ateroskleroza bağlı bir ilişkidir. Obezite ve diyabet kendi başına da kardiyovasküler hastalık için bir risk faktörüdür. Ferreti ve ark. (53) sağlıklı ve obez kişilerde lipoprotein, oksidatif stres ve HDL-PON aktivitesini araştırdıkları bir çalışmada, obezlerde HDL-PON aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu ifade etmişlerdir. Bu durumu obezite sonucu adipoz dokudaki birikimin ateroskleroza ve HDL oksidasyonuna yol açmasına ve dolayısıyla HDL yüzeyine paraoksonaz bağlanmasının etkilenmesi sonucu enzim aktivitesinin azalabileceği sonucuna bağlamışlardır.

4.8. Paraoksonaz-1 Aktiviteleri ve Substratları

PON-1 fizyolojik substratlarının lakton türevi bileşikler olduğu düşünülen bir enzimdir. Ayrıca paraoksonaz, laktonaz ve arilesteraz aktivitesine sahiptir ve çok farklı substratlarla da etkileşime girebilir. Buna rağmen aktif merkezin enzimde nerede olduğu ve substratı neye göre seçtiği hala tam olarak çözülebilmemiş değildir (62, 63).

4.8.1. Paraoksonaz Aktivitesi

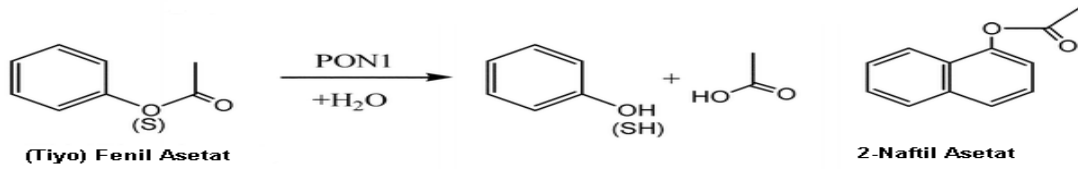
PON-1 paraoksonaz aktivitesi sayesinde paratiyonun oksidatif desülfürasyonu sonucu oluşan paraoksonu hidrolizler, p-nitrofenol ve dietilfosfat açığa çıkar (62-64).



Şekil 5. Paraoksonun PON-1 tarafından enzimatik hidrolizi (64).

4.8.2. Arilesteraz Aktivitesi

PON-1 arilesteraz aktivitesi sayesinde ester substratı olan fenilasetatı hidrolizer. Fenil asetattan başka aromatik ester yapısındaki bileşiklerden olan 2-naftil asetat ve tiofenil asetat da PON-1 substratları arasındadır (63, 66).



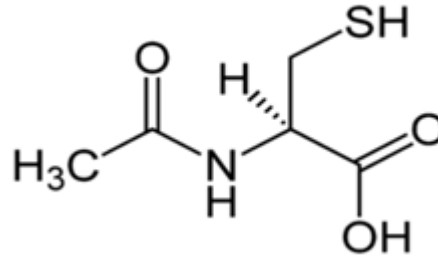
Şekil 6. Fenil asetatın PON-1 tarafından enzimatik hidrolizi (66).

4.8.3. Laktonaz Aktivitesi

PON-1 ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda, sahip olduğu laktonaz aktivitesinin PON-1 enziminin doğal aktivitesi olduğu belirtilmekte ve kalsiyum bağımlı lipofilik laktonaz olarak tanımlanmaktadır. PON-1'in ateroskleroza karşı koruyucu fonksiyonunun temelinde, HDL ve LDL yapısında oluşan ve bir yağ asidi oksidasyon ürünü olan 5-hidroksieikozotetraenoik asit lakton gibi lakton türevi bileşikler laktonaz aktivitesi ile hidrolize ederek zararsız hale getirmesidir (63, 66, 67).

rolü ortaya çıkmış başka bir antioksidan özelliğe sahip molekül olan N-Asetilsisteinin (NAC) PON-1 üzerindeki etkisinin nasıl olacağı araştırılmaya başlanmıştır.

4.9. N-asetilsistein (NAC)



Şekil 9. N-asetilsisteinin açık formülü (68).

Vücut için önemli antioksidan molekül olan glutatyonun öncüsüdür. Antioksidan, antikanserojen ve anjiyogenez önleyici özelliklere sahip bir moleküldür. N-asetilsistein (NAC) sisteinin asetilenmiş halidir. Sistein yüksek protein içeren gıdalarda bulunur ama NAC bulunmaz. Yapısında bulunan sülfidril grubu ile glikoprotein içerisindeki disülfid bağlarını koparma özelliğinden dolayı mukoid ve mukopürülan sekresyonlar üzerine mukolitik etki göstermektedir. Solunum yollarında biriken balgam yoğunluğunu, yapışkanlığını azaltır ve bu özelliği sayesinde balgamı su gibi akıcı kıvama getirir. Balgamın çözülmesinde yardımcı olur. Mukolitik etkisinden başka asetaminofen zehirlenmesinde tedavi edici bir ajan olarak da kullanılır. NAC vücut içinde üretilir. Sistein sülfür vericisi olarak faz II detoksifikasyonunda, metil donörü olarak homosistein-metionin dönüşümünde ve sülfasyon döngüsünde önemli bir rol oynar (68). Sistein vücut için önemli olan antioksidanlardan ve detoksifiye edici ajanlardan biri olan glutatyonun sentezinde de rol oynar. Asetilsistein, asetaminofenin doz aşımına bağlı olarak oluşan hepatotoksiste üzerine etkisini karacaiğer glutatyon seviyesini koruyarak veya arttırarak gösterir. Glutatyon hepatotoksik olduğu bilinen asetaminofenin ara metabolitini inaktif etmek için gerekmektedir. Doz aşımı sonucu primer metabolik yolu (glukoronid ve sülfat konjugasyon) satüre olduğu için bu ara metabolit düzeyinde artış görülmektedir. Asetil sistein etkisini bu ara metaboliti ana madde haline dönüştürerek ve/veya metabolitin konjugasyonu için sülfhidril vererek

gösteriyor olabilir. Deneysel çalışmaların gösterdiği gibi asetilsisteinin ve sülfhidril içeren diğer drogların kullanımının bu ara metabolitin inaktivasyonu üzerine direkt etkisi vardır (69).

Yapılan çalışmalar sonucunda NAC yüksek sukrozun indüklediği obezitenin ve bunun kalp dokusu üzerindeki etkisinin önlenmesinde umut verici değerler sunmuştur. Yüksek sukroz ile beslenmenin olduğu koşullarda NAC'ın oksidatif stresi azalttığı ve kalp dokusundaki metabolik shifting reaksiyonlarını engellediği bununla birlikte yağ asidi oksidasyonunu arttırdığı ve anaerobik metolik reaksiyonları azalttığı saptanmıştır (70).

Antioksidan özelliği sayesinde oksidatif stresi azalttığı düşünülen NAC ile antioksidan ve antienflamatuar özellikleri sayesinde HDL'yi oksidasyondan koruduğu böylece aterosklerozun oluşmasında önemli rol üstlendiği ortaya çıkmış olan PON-1 arasındaki ilişki merak edilir hale gelmiştir.

Bu çalışmanın amacı, daha önce yapılan çalışmalarla aterosklerozdaki koruyucu rolü ortaya çıkmış, oksidatif stresi azaltan antioksidan etkiye sahip N-asetilsisteinin yüksek yağlı diyet uygulanarak obezite yapılmış sıçanlardaki PON-1 enziminin gösterdiği paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktivitelerini nasıl etkilediğini ortaya koymaktır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereç

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve kimyasal malzemeler üretici firmaları ile birlikte Tablo 1’ de listelenmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve kimyasal malzemeler

Otomatik pipetler	(Socorex, Isolab)
Santrifüj	(Eppendorf Centrifuge 5810, Beckman Coulter, Allegra 64R)
Otoanalizör	(Roche, Simens)
Spektrofotometre	(SHIMADZU UV-1601, Versamax Mikroplate Reader)
Hassas Terazi	(METTLER TOLEDO AB 204-S)
Saf Su Arıtma Cihazı	(Kros)
Vorteks	(IKA® Vortex, Genius 3)
pH Metre	HANNA Instruments pH211
Paraokson	SIGMA
Fenilasetat	ALDRICH
Dihidroksümarin	ALDRICH
NAC	SIGMA
Tris - HCl	AppliChem
CaCl ₂	MERCK

5.2. Yöntem

Yapılan deneylerin tümü Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2013/46 protokol no’lu etik kurulu başvurusunun onayı ile yapıldı. Çalışma “Diyetle İndüklenmiş Obezitede Yağ Dokusunda Oksidan-Antioksidan Dengenin İncelenmesi” isimli 111S 252 kodlu TÜBİTAK tarafından desteklenen projenin bir parçasıdır.

Çalışmamızda kullanılan sıçanlar Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinden temin edilip yine aynı yerde deneyler için 12 saatlik karanlık-aydınlık ortam sağlanarak barındırılıp beslendi. Çalışmada 18 adet erkek 6-8 haftalık 150-200 g Sprague-Dawley ırkı sıçanlar kullanıldı. Çalışmada kullanılan tüm yemler (D12450B ve D12451) *Research Diyet*'ten satın alındı.

5.2.1. Deney Grupları

Sıçanlar standart sıçan yemi (D12450B) ile alınan kalorinin % 70'ini karbohidrattan, % 20'sini proteinden, % 10'unu yağdan sağlayarak 15 gün süreyle beslendi. Yem ve su ad libitum olarak verildi. On beş gün sonra sıçanlar rastgele her grupta 6 adet sıçan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı ve tartım işlemleri gerçekleştirildi.

Kontrol Grubu: Standart sıçan yemi ile beslendi.

Obez Grubu: Yüksek yağlı diyetle (%45 yağ, % 35 karbohidrat, % 20 yağ) beslendi.

NAC Grubu: Yüksek yağlı diyetle (%45 yağ, % 35 karbohidrat, % 20 yağ) beraber N-asetilsistein (NAC, 2g/L) ile beslendi. Tüm gruplara su ve yem ad libitum olarak verildi.

Sıçanların kullanmış olduğu D12450B ve D12451 yemlerin içeriği Tablo 2 ve Tablo 3'da sunulmuştur.

Toplam 85 günlük beslenme periyodunun sonunda, sıçanların tartımı gerçekleştirildi ve anestezi altında aortadan kanları alınarak sakrifiye edildi. Serum ve karaciğer dokuları analiz sürelerine kadar -80 °C de saklandı.

Tablo 2. D12540B kodlu standart sıçan yemi içeriği.

D12540B kodlu standart sıçan yemi içeriği	% g	% kcal
Protein	19.2	20
Karbohidrat	67.3	70
Yağ	4.3	10
Toplam kilo kalori / g	3.83	100
Bileşenler	g	kcal
Kazein	200	80
L-sistin	3	12
Mısır nişastası	315	1260
Maltodeksrin 10	35	140
Sükroz	350	1400
Selüloz	50	0
Soya yağı	25	225
Hayvansal yağ	20	180
Mineral karışımı S10026	10	0
Dikalsiyum fosfat	13	0
Kalsiyum karbonat	5.5	0
Potasyum sitrat (H ₂ O' lu)	16.5	0
Vitamin karışımı W10001	10	40
Kolin bitartarat	2	0
Sarı gıda boyası	0.05	0
TOPLAM	1055.05	40.57

Tablo 3. D12541 kodlu yüksek kalorili sıçan yemi içeriği

D12541 kodlu yüksek kalorili sıçan yemi içeriği	% g	% kcal
Protein	24	20
Karbohidrat	41	35
Yağ	24	45
Toplam kilo kalori / g	4.73	100
Bileşenler	g	kcal
Kazein	200	800
L-sistin	3	12
Mısır nişastası	72.8	291
Maltodeksrin 10	100	400
Sükroz	172.8	691
Selüloz	50	0
Soya yağı	25	225
Hayvansal yağ	177.5	1598
Mineral karışımı S10026	10	0
Dikalsiyum fosfat	13	0
Kalsiyum karbonat	5.5	0
Potasyum sitrat (H ₂ O' lu)	16	0
Vitamin karışımı W10001	10	40
Kolin bitartarat	2	0
Sarı gıda boyası	0.05	0
TOPLAM	858.15	40.57

5.2.2. Serum Lipid Parametrelerinin Ölçülmesi

Total kolesterol (TK), Trigliserid (TG), HDL kolesterol (HDL-K), LDL kolesterol (LDL-K) parametreleri KTÜ Farabi Hastanesi, Rutin Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Sözü geçen parametrelerin ölçümleri Roche Cobas 8000 Modüler otoanalizöründe orijinal Roche kitleri kullanılarak kolorimetrik olarak ölçüldü. Serum lipid profili “Diyetle İndüklenmiş Obezitede Yağ Dokusunda Oksidan-Antioksidan Dengenin İncelenmesi” isimli 111S 252 kodlu TÜBİTAK tarafından desteklenen projede belirlenmiş olup ortak değerlendirilmiştir.

5.2.3. Serum PON-1 Enzim Aktiviteleri Tayini

5.2.3.1 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

a) 100 mM pH 8.00 Tris-HCl Çözeltisi

Stok katı kimyasaldan (MA= 121.14 g/mol Tris-Baz) 6.73 g tartıldı. Yaklaşık 450 mL saf su eklenerek katı Tris-Baz çözüldü. Manyetik karıştırıcı üzerinde pH metre kullanılarak çözeltiye pH 8.00 olana kadar damla damla HCl eklendi. Çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra çözelti saf su ile son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

b) 50 mM pH 8.00 Tris-HCl Çözeltisi

Hazırlanan 100 mM'lık Tris-HCl çözeltisinden 250 mL alındı. Saf su ile son hacim 500 mL olacak şekilde tamamlandı.

c) 125 mM pH 8.50 Tris-HCl + 1.25 mM CaCl₂ Çözeltisi

Stok katı kimyasaldan (MA= 121.14 g/mol Tris-Baz) 1.51 g alındı. Yaklaşık 80 mL saf su eklenerek katı Tris-Baz çözüldü. Diğer stok katı kimyasaldan (MA=110.99 g/mol CaCl₂) 0.014 g alındı. Tris-Baz çözeltisine eklenerek katı CaCl₂ çözüldü. Manyetik karıştırıcı üzerinde pH metre kullanılarak çözeltiye pH 8.50 olacak şekilde damla damla HCl eklendi. Çözeltinin pH'sı ayarlandıktan sonra çözelti saf su ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

d) 1 mM CaCl₂ Çözeltisi

Stok katı kimyasaldan (MA= 110.99 g/mol CaCl₂) 0.13 g alındı. Saf su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözüldü. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

e) 1 mM Paraokson Çözeltisi

Stok çözeltiden (4.17 M paraokson) 28 µL alındı. Son hacim etanolle 10 mL'ye tamamlandı. Çözelti ölçüm sırasında taze olarak hazırlandı.

f) 1 mM Fenilasetat Çözeltisi

Stok çözeltiden (7.8 M fenilasetat) 128 µL alındı. Son hacim etanolle 10 mL'ye tamamlandı. Çözelti ölçüm sırasında taze olarak hazırlandı.

g) 1 mM Dihidroksümarin Çözeltisi

Stok çözeltiden (7.81 M dihidroksümarin) 128 µL alındı. Son hacim metanolle 10 mL'ye tamamlandı. Çözelti ölçüm sırasında taze olarak hazırlandı.

5.2.3.2. Serum Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Tayini

Paraoksonaz aktivite tayini Furlong ve ark.'ın kullandığı yöntem ile yapılmıştır (71). Serum PON-1 enzimi paraoksonaz enzim aktivitesi ile paraoksonu (O,O-dietil-O-p-nitrofenol fosfat) hidrolize ederek dietil fosfat ve p-nitrofenole ayırır. P-nitrofenolün 405 nm 'deki absorbanı, serum PON-1' in paraoksonaz aktivitesi ile doğru orantılıdır. Aktivite tayini için Tablo 4' deki gibi pipetlemeler yapıldı. Tüm örnekler duplike çalışıldı.

Tablo 4. Serum paraoksonaz enzim aktivite tayini için yapılan pipetlemeler

	Numune (µL)	Kör (µL)
100 mM pH 8.00 Tris-HCl	855	855
1 mM CaCl ₂	85	85
1 mM paraokson	10	10
Serum	50	-
dH ₂ O	-	50

Aktivite ölçümleri SHIMADZU UV-1601 cihazında, 25°C'de, 405 nm dalga boyunda, 3 dakika süreyle, köre karşı kinetik okuma yapılarak gerçekleştirildi. Delta absorbanı alınarak aşağıdaki formüle göre enzim aktiviteleri hesaplandı. Paraoksonaz

için 1 dakikada 1nmol para-nitrofenol oluşturan enzim miktarı 1 ünite olarak tanımlandı.

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A}{\text{dakika}} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times d \times V_s}$$

V_t: Toplam hacim (μL)

V_s: Numune hacmi (μL)

ε: Molar absorptivite sabiti (405 nm için 18700 M⁻¹ cm⁻¹)

d: Işık yolunun uzunluğu (cm)

ΔA: Son absorbans ile ilk absorbans arası fark

5.2.3.3. Serum Arilesteraz Enzim Aktivitesi Tayini

Arilesteraz aktivite tayini Gan ve ark.'ın kullandığı yöntem ile yapılmıştır (72). Serum PON-1 enzimi arilesteraz enzim aktivitesi ile fenilasetatı hidrolize ederek fenol ve asetata ayırır. Fenolün 270 nm 'deki absorbansı, serum PON-1'in arilesteraz aktivitesi ile doğru orantılıdır. Aktivite tayini için Tablo 5' deki gibi pipetlemeler yapıldı. Tüm örnekler duplike çalışıldı.

Tablo 5. Serum arilesteraz enzim aktivite tayini için yapılan pipetlemeler

	Numune (μL)	Kör (μL)
50 mM pH 8.00 Tris-HCl	900	900
1 mM CaCl ₂	85	85
1 mM fenilasetat	10	10
Serum	5	-
dH ₂ O	-	5

Aktivite ölçümleri için SHIMADZU UV-1601 cihazında, 25 °C'de, 270 nm dalga boyunda, 2 dakika süreyle, köre karşı kinetik okuma yapıldı ve delta absorbans alınarak aşağıdaki formüle göre enzim aktiviteleri hesaplandı. Arilesteraz için 1 dakikada 1 μmol fenilasetatı ürüne çeviren enzim miktarı 1 ünite olarak tanımlandı.

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A}{\text{dakika}} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times d \times V_s}$$

V_t: Toplam hacim (μL)

V_s: Numune hacmi (μL)

ε: Molar absorptivite sabiti (270 nm için 1310 M⁻¹ cm⁻¹)

d: Işık yolunun uzunluğu (cm)

ΔA: Son absorbans ile ilk absorbans arası fark

5.2.3.4. Serum Laktonaz Enzim Aktivitesi Tayini

Laktonaz aktivite tayini Teiber ve ark.'ın kullandığı yöntem ile yapılmıştır (73). Serum PON-1 enzimi laktonaz enzim aktivitesi ile dihidrokumarini hidrolize ederek 3-(o-hidroksifenil) propiyonik aside çevirir ve 3-(o-hidroksifenil) propiyonik asidin 270 nm 'deki absorbansı, serum PON-1'in laktonaz aktivitesi ile doğru orantılıdır. Aktivite tayini için Tablo 6' daki gibi pipetlemeler yapıldı. Tüm örnekler duplike çalışıldı.

Tablo 6. Serum laktonaz enzim aktivite tayini için yapılan pipetlemeler

	Numune (μL)	Kör (μL)
50 mM pH 8.00 Tris-HCl	900	900
1 mM CaCl ₂	85	85
1 mM dihidrokumarin	10	10
Serum	5	-
dH ₂ O	-	5

Aktivite ölçümleri için SHIMADZU UV-1601 cihazında, 37 °C' de, 270 nm dalga boyunda, 2 dakika süreyle, köre karşı kinetik okuma yapıldı ve delta absorbans alınarak aşağıdaki formüle göre numunelerdeki enzim aktivitesi hesaplandı. Laktonaz için 1 dakikada 1 μmol dihidrokumarini ürüne çeviren enzim miktarı 1 ünite olarak tanımlandı.

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A}{\text{dakika}} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times d \times V_s}$$

V_t: Toplam hacim (μL)

V_s: Numune hacmi (μL)

ε: Molar absorptivite sabiti (270 nm için 1295 M⁻¹ cm⁻¹)

d: Işık yolunun uzunluğu (cm)

ΔA: Son absorbans ile ilk absorbans arası fark

5.2.4. Mikrozm PON-1 Enzim Aktiviteleri Tayini

5.2.4.1. Mikrozomal Fraksiyonun Hazırlanması

Mikrozomal fraksiyonun hazırlanması için Gil ve ark. nın yöntemi kullanılmıştır (74). -80°C de saklanan karaciğer dokuları alınarak her birinden 500 mg tartıldı. Tartılan dokunun homojenizasyonu için 5mM Tris-HCl + 0.25 M sukroz pH 7.4 (sukrozlu tampon) tamponu ile 5 mM Tris-HCl pH 7.4 (sukrozsuz tampon) tamponu hazırlandı. 500'er mg olarak tartılan dokular falcon tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine 5 mL sukrozlu tampon eklenerek 13.500 rpm'de buz küveti içinde 6 dakika boyunca homajenize edildi. Homojenizasyon sonunda 12.500 g' de +4 °C'de 20 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant alındı. Alınan süpernatant 105.000 g' de +4 °C'de BECKMAN ultrasantrifüjünde 60 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pellet 1 mL sukrozsuz tamponda çözöldü.

5.2.4.2. Mikrozomal Membranların Çözünmesi

Mikrozomal membranların çözünmesi için Gil ve ark.nın yöntemi kullanılmıştır (74). Sukrozsuz tamponda çözölmüş örneklerden 250 μL alınarak eppendorf tüplerine konuldu. Üzerlerine 2 μL Triton X-100 eklendikten sonra ve 1 dakika boyunca vortekslendi. Vorteksleme işlemi sırasında +4 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan hemen sonra 16.000 rpm'de +4 °C'de 60 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar alındı ve enzim aktivite tayini için kullanıldı.

5.2.4.3. Mikrozm Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Tayini

Mikrozm paraoksonaz enzim aktivitesi tayini Gil ve ark. nınyöntemi modifiye edilerek yapılmıştır (74). Aktivite tayini için Tablo 7’ deki gibi pipetlemeler yapıldı. Tüm örnekler duplike çalışıldı.

Tablo 7. Mikrozm paraoksonaz enzim aktivite tayini için yapılan pipetlemeler

	Numune (µL)	Kör (µL)
125 mM pH 8.50 Tris-HCl + 1.25 mM CaCl ₂	240	240
1 mM paraokson	10	10
Mikrozm	50	-
dH ₂ O	-	50

Aktivite ölçümleri için Spectramax Mikroplate Reader cihazında, 37⁰C’de, 405 nm dalga boyunda, 10 dakika süreyle, köre karşı kinetik okuma yapıldı ve delta absorbans alınarak enzim aktiviteleri hesaplandı. Paraoksonaz için 1 dakikada 1nmol para-nitrofenol oluşturan enzim miktarı 1 ünite olarak tanımlanmıştır.

5.2.4.4. Mikrozm Arilesteraz Enzim Aktivitesi Tayini

Mikrozm arilesteraz enzim aktivitesi Gan ve ark.nın kullandığı yöntem ile yapılmıştır (72). Aktivite tayini için Tablo 8’ deki gibi pipetlemeler yapıldı. Tüm örnekler duplike çalışıldı.

Tablo 8. Mikrozm arilesteraz enzim aktivite tayini için yapılan pipetlemeler

	Numune (µL)	Kör (µL)
50 mM pH:8.00 Tris-HCl	900	900
1 mM CaCl ₂	85	85
1 mM fenilasetat	10	10
Mikrozm	5	-
dH ₂ O	-	5

Aktivite ölçümleri için SHIMADZU UV-1601 cihazında, 37°C’de, 270 nm dalga boyunda, 3 dakika süreyle, köre karşı kinetik okuma yapıldı ve delta absorbans alınarak aşağıdaki formüle göre enzim aktiviteleri hesaplandı. Arilesteraz için 1 dakikada 1 µmol fenilasetatı ürüne çeviren enzim miktarı 1 ünite olarak tanımlanmıştır.

5.2.4.5. Mikrozm Laktonaz Enzim Aktivitesi Tayini

Mikrozom laktonaz enzim aktivitesi tayini Teiber ve ark.’ ın kullandığı yöntem ile yapılmıştır (73). Aktivite tayini için Tablo 9’ daki gibi pipetlemeler yapıldı. Tüm örnekler duplike çalışıldı.

Tablo 9. Mikrozm laktonaz enzim aktivite tayini için yapılan pipetlemeler

	Numune (µL)	Kör (µL)
50 mM pH 8.00 Tris-HCl	900	900
1 mM CaCl ₂	85	85
1 mM dihidrokumarin	10	10
Mikrozom	5	-
dH ₂ O	-	5

Aktivite ölçümleri için SHIMADZU UV-1601 cihazında, 37°C’de, 270 nm dalga boyunda, 3 dakika süreyle, köre karşı kinetik okuma yapıldı ve delta absorbans alınarak enzim aktiviteleri hesaplandı. Laktonaz için 1 dakikada 1 µmol dihidrokumarini ürüne çeviren enzim miktarı 1 ünite olarak tanımlanmıştır.

5.2.5. Protein Tayini

Karaciğer mikrozom dokusunda PON-1 enzim aktivitelerinin tayini için mg başına hesaplama yapılacağından dokudaki protein miktarını hesaplamak için protein tayini Lowry metodu ile yapıldı (53). Bu metodun prensibi proteinin ilk önce alkali ortamda bakır iyonları ile muamele edilmesine ve daha sonra Folin-Ciocalteu’s fenol reaktifinin (fosfotungistik- fosfomolibdik asit) protein ile reaksiyonu sonucu oluşan mavi rengin optik dansite spektrofotometrede 660 nm’de ölçülür.

5.2.5.1. Kullanılan Çözeltiler

a) Reaktif I: %2 Cu₂SO₄.5H₂O

2 g Cu₂SO₄.5H₂O bir miktar distile suda çözülüp hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

b) Reaktif II: %2 Sodyum Potasyum Tartarat

2 g Sodyum potasyum tartarat bir miktar distile suda çözülüp hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

c) Reaktif A: 0,1 N NaOH çözeltisinde %2 Na₂CO₃

2 g Na₂CO₃, 100 mL 0.1 N NaOH çözeltisinde hazırlandı.

d) Reaktif B: Alkali Bakır Reaktifi

Reaktif I, Reaktif II, Reaktif A sırası ile 1:1:100 oranında karıştırıldı, taze hazırlandı.

e) Folin-Ciocalteu's Fenol Reaktifi

2 N Folin reaktifi 1:1 oranında distile su ile seyreltildi, taze hazırlandı.

f) Standartlar: Sığır Serum Albümini

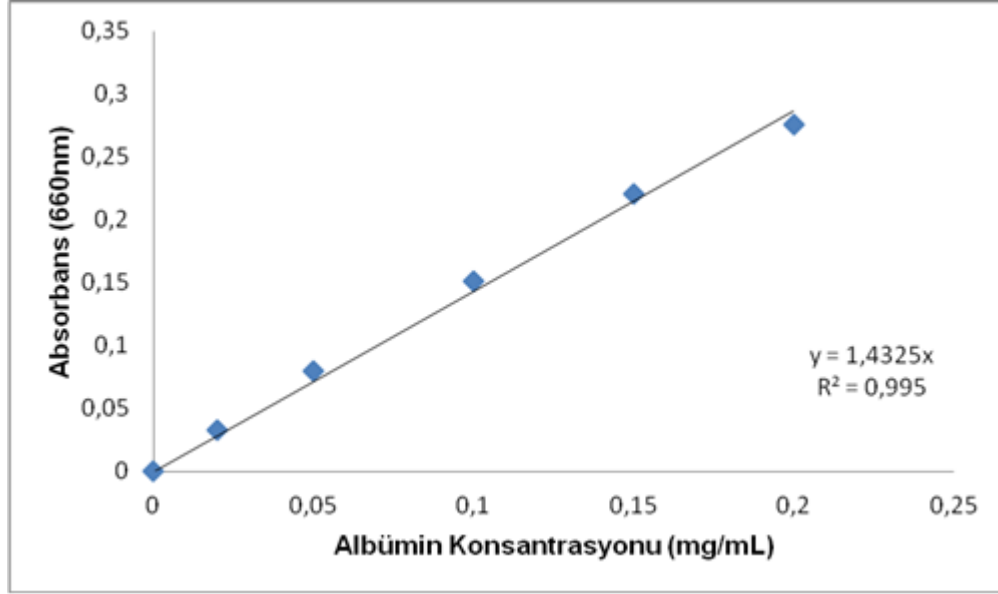
0.02 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.15 mg/mL, 0.2 mg/mL konsantrasyonlarında albümin standartları hazırlandı.

5.2.5.2. Deneyin Yapılışı

Aşağıdaki tabloya göre (Tablo 10) pipetlemeler yapıp 660 nm' de absorbanları okunarak standart grafik yardımıyla sonuçlar bulunmuştur (Şekil 10).

Tablo 10. Protein tayini için yapılan pipetlemeler

	Kör (µL)	Standart (µL)	Numune (µL)
Distile Su	100	-	95
Standart	-	100	-
Numune	-	-	5
Reaktif B	500	500	500
Vorteksle karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi.			
Folin reaktifi (1N)	50	50	50
Vorteksle karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dk. bekletildi.			
660 nm' de absorbanları okundu.			



Şekil 10. Protein tayini standart grafiği.

5.2.6. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Elde edilen sonuçlar ortanca ve çeyrekler arası oran $[X.(IQR)]$ olarak verildi. Grup ortancalarının karşılaştırılması için non-parametrik test olan Kruskal Wallis testi kullanıldı. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

Ağırlık, lipid ve glukoz değerleri “Diyetle İndüklenmiş Obezitede Yağ Dokusunda Oksidan-Antioksidan Dengenin İncelenmesi” isimli 111S 252 kodlu TÜBİTAK tarafından desteklenen projeden elde edilen veriler olup, bu proje ile desteklenen doktora tezi ile ortak kullanılmıştır (44).

6.1. Çalışma Grubu Ağırlık Değerleri

Çalışma grubuna ait ağırlık değerleri Tablo 11’de sunulmuştur.

Tablo 11. Ağırlık Değerleri

	KONTROL	OBEZ	NAC
Başlangıç ağırlığı (g)*	285 ± 21.3	284 ± 25.2	285 ± 21.5
Deney sonu ağırlık (g)	450 ± 31.3	518 ± 19.9	514 ± 65.2

* 15 günlük ön beslemeden sonraki ağırlık

6.2. Çalışma Grubu Lipid - Glukoz Değerleri

Çalışma grubuna ait lipid ve glukoz değerleri Tablo 12 ‘de sunulmuştur.

Tablo 12. Glukoz - Lipid değerleri

	KONTROL	OBEZ	NAC	p
TG (mg/dL)	179 (133-266)	185 (146-239)	139 (120-202)	0.476
TK (mg/dL)	76.7 (71.6-90.4)	78.2 (72.4-84.1)	87.5 (79.9-93.6)	0.238
HDL-K (mg/dL)	42 (28.7-44.2)	36.5 (29.7-44.2)	47 (36-49)	0.128
LDL-K (mg/dL)	12.5 (5-13.2)	12 (10-13)	16 (12-18.2)	0.114
Glukoz (mg/dL)	135 (124-198)	149 (130-163)	155 (146-180)	0.380

Değerler [Ortanca (IQR)] olarak verilmiştir. Kruskal Wallis testine göre p değerleri.

85 günlük beslenme sonucunda tüm grupların obez olduğu saptanmıştır. Ayrıca deney grupları arasında obez ve nac grubunun serum glukoz değerleri kontrol grubuna göre daha yüksek gözlemlendi. TK ve LDL-K düzeyleri NAC grubunda kontrol ve obez grubuna göre yüksek bulundu. TG düzeylerinin obez grupta kontrol grubuna göre yükseldiği NAC grubunda ise hem kontrol hem obez grubuna göre düştüğü tespit edildi. HDL-K düzeyleri ise obez grupta her iki gruba göre düşük bulundu. Parametrelerin seviyeleri gruplar arasında değişse de istatistiksel olarak anlamlı değildi.

6.3. Çalışma Grubu Serum PON-1 Aktivitelerinin Değerleri

Çalışma grubuna ait serum PON-1 enzim aktiviteleri değerleri Tablo 13’de sunulmuştur.

Tablo 13. Serum PON-1 enzim aktivitelerinin değerleri

	KONTROL	OBEZ	NAC	p
PON (U/mL)	205 (144-230)	192 (192-256)	201 (127-274)	0.773
ARE (U/mL)	68.7 (45.9-70.2)	61.1 (18.3-77.9)	63.8 (45.9-82.2)	0.66
LAC (U/mL)	55.4 (34.6-58.8)	52.2 (22.6-58.3)	47.9 (31.1-59.2)	0.833

Değerler [Ortanca (IQR)] olarak verilmiştir. Kruskal Wallis testine göre p değerleri.

Serum paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri obez ve NAC grubunda kontrol grubuna göre düşük bulunsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

6.4. Çalışma Grubu Mikrozom PON-1 Aktivitelerinin Değerleri

Çalışma grubuna ait sıçanların karcığır dokularından elde edilen mikrozom PON-1 enzim aktiviteleri değerleri Tablo 14’de sunulmuştur.

Tablo 14: Karaciğer mikrozomu PON-1 enzim aktivitelerinin değerleri

	KONTROL	OBEZ	NAC	p
PON (U/mg protein)	0.48 (0.35-0.74)	0.55 (0.41-0.87)	0.57 (0.48-0.59)	0.717
ARE (U/mg protein)	8.57 (7.09-11.09)	10.78 (8.49-13.42)	12.77 (11.47-16.24)	0.064
LAC (U/mg protein)	5.7 (5.11-6.25)	5.59 (5.15-6.26)	6.50 (5.74-8.53)	0.198

Değerler [Ortanca (IQR)] olarak verilmiştir. Kruskal Wallis testine göre p değerleri.

Mikrozom paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri NAC grubunda kontrol ve obez gruba göre yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Obezitenin görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır. Bu artış sebebiyle obezite günümüzün en önemli sağlık problemlerinin başında gelmektedir. Obezitenin mekanizmasının ve vücut üzerindeki etkisinin anlaşılması ve obeziteye karşı uygun tedavi yollarının anlaşılması için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Obezite, diyabet, yüksek tansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığı da beraberinde getirir (15).

Bu çalışmada, yüksek yağlı diyet ile obez yapılmış ve diyetlerine NAC ilave edilmiş obez sıçanlarda (Tablo 11) karşılaştırma yapıldığında TK ve LDL-K düzeylerinin NAC grubunda kontrol ve obez grubuna göre yüksek; TG düzeylerinin obez grupta kontrol grubuna göre yüksek NAC grubunda ise hem kontrol hem obez grubuna göre düştük; HDL Kolesterol düzeylerinin obez grupta her iki gruba göre düşük olduğu tespit edilmesine rağmen parametrelerin seviyeleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 12).

Çalışmamızda kullanılan yüksek yağlı diyet insülin rezistansı ve hiperglisemi ile karakterizedir. Yüksek karbohidrat içerikli diyetle göre daha fazla kilo kazanımına sebep olur. Çoğunlukla da TG miktarlarında önemli değişikliği sebep olmaz (72). Deney TG sonuçlarını incelediğimizde TG düzeylerinin obez grupta kontrol grubuna göre yükseldiği NAC grubunda ise hem kontrol hem obez grubuna göre düştüğü gözlemlendi (Tablo 12). Son 2 yıldır yapılan çalışmalarda sukrozun TG oluşumuna neden olduğu için fruktoz üzerinden obeziteye yol açtığı kanısına varılmış ve bu yüzden de yeni kullanılan standart diyetle sukroz oranı azaltılmıştır (79). Ayrıca ratlar üzerinde yapılan başka çalışmalara göre Sprague-Dawley ırkı sıçanların %12'lik kısmının obeziteye karşı direnç gösterdiği saptanmıştır (79). Çalışmamızda kullanılan diyetle sukroz içeriği ve sıçan ırkı beklediğimiz sonuçlara ulaşamamıza neden olmuş olabilir.

Novelli ve ark. (10) 30 gün yüksek sukrozlu (%30) diyetle obez yapılmış sıçanlarda N-asetilsisteinin (2g/L) enerji metabolizmasına ve kardiyak oksidatif strese etkisi inceledikleri çalışmada obez grupta kalp dokusunda TG birikiminin olduğunu, oksidatif stres ve metabolik değişiklikler gözlemlendiğini ancak NAC takviyesinin yağ oksidasyonunu ve enerji harcanmasını arttırarak obeziteden kaynaklanan olumsuz etkileri azalttığını ifade etmişlerdir.

Oksidatif stres oksidan-antioksidan dengenin oksidan lehine bozulması sonucu ortaya çıkar. Obezite orta derecede inflamasyon seyreden bir hastalık türüdür ve oksidatif stresi tetikler. Oksidatif stresin; kalp-damar hastalıkları, diyabet ve metabolik sendrom gibi obezitenin komplikasyonlarının altında yatan mekanizmalardan biri olduğu bildirilmiştir (21, 71).

Yapılan birçok çalışmada obezlerde E vitamini, C vitamini, karotenler, fitokimyasallar, çinko, bakır, selenyum obez olmayan bireylere daha düşük bulunmuştur. Bu nedenle obezlerde antioksidan savunmanın yetersizliği ortaya çıkmaktadır (21).

HDL'nin yapısında PON-1 enzimi HDL'ye antioksidan özellik kazandırmakta ve LDL oksidasyonunu inhibe etmesini sağlamaktadır (73). PON-1'in LDL oksidasyonunu inhibe ettiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmiştir. Yapılan çalışmalara göre o-ox-LDL düzeyleri ile PON-1 aktivitesi arasında ters bir ilişki bulunmaktadır (74).

PON-1 paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri gösteren bir enzimdir. PON-1 enzim aktiviteleri çeşitli faktörlere bağlı olarak değişim gösterir. Bunlar arasında genetik faktörler (polimorfizm), çevresel faktörler, yaşam biçimi, yaş ve cinsiyet sayılabilir (75). Genetik faktörlere ek olarak farmakolojik ve diyet modülatörlerinin etkisi ile bireyler arasında PON-1 aktivitesinin 40 kata kadar değişiklik gösterebileceği rapor edilmiştir (77). PON-1 aktivitesine etki eden en önemli faktörlerden birinin de diyetteki yağlar olduğu yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (5, 73, 76).

Farklı lipitlerin PON-1 enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren hayvan deneyleri de vardır. Aterojenik diyet sonrası farelerde, PON-1 aktivitesinin ve karaciğer mRNA düzeylerinin düştüğü gösterilmiştir. Erkek Sprague-Dawley ratlara uygulanan doymuş yağlardan zengin diyet sonrası PON-1 aktivitesin azaldığı rapor edilmiştir. Tekli doymamış yağ içeren diyetle beslenen çeşitli hayvan modellerinde PON-1 aktivitesinde belirgin bir artış olduğu kaydedilmiştir (5).

Çalışmamızda serum paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri obez ve NAC grubunda kontrol grubuna göre düşük bulunsada istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 13). Ayrıca, mikrozom paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri

NAC grubunda kontrol ve obez gruba göre yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 14).

Durak ve ark. (78) normal ve 3.6 g kolesterol takviyeli diyetle 3 ay besledikleri Sprague-Dawley ratlarda PON enzim aktivitelerine ve serum TK ve HDL-K düzeylerini değerlendirdikledikleri çalışmalarında kolesterol takviyeli grupta TK ve HDL-K düzeylerinin belirgin bir şekilde yükseldiğini PON-1 aktivitesinin ise düştüğünü rapor etmişlerdir.

Ferreti ve ark. (5) plazmadan izole edilen HDL üzerindeki paraoksonaz enzim aktivitelerinin obez kadınlarda normal kadınlara göre belirgin şekilde düşük olduğunu, lipidlerin modifikasyonlarının arttığını belirtmişlerdir. PON aktivitelerindeki değişikliğin HDL-K modifikasyon değişiklikleriyle ilişkili olabileceği sonucuna varmışlardır.

Bu çalışmada serum ve mikrozom paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktivitelerinde kontrol, obez ve NAC gruplarında farklılık olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamaması numune sayısının az oluşundan kaynaklanmış olabilir. Ayrıca 85 günlük NAC takviyesi değişiklikleri gözlemeye yetersiz olmuş olabilir. Her ne kadar bu çalışma neticesinde diyetle obezite oluşturulan Sprague-Dawley ırkı sıçanlarda 2 g/L NAC takviyesinin PON-1 enzim aktivitelerine ciddi bir etkisi olmadığının kanaatine varılsada bu çalışma ön bir çalışma olarak görülerek daha geniş ve uzun süreli çalışmayla NAC'ın obezlere etkisi yeniden değerlendirilebilir.

8. KAYNAKLAR

1. Karaouzene N, Merzouk H, Aribi M, Merzouk SA, Yahia-Berrouiguet A, Tessier C, Narce M (2011). Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers: A comparison of older with young men. *Nutr Metab Cardiovas*, 21(10): 792-799.
2. Aviram M, Rosenblat M, Bisgair (1998). CL Paraoxonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 101: 1581-90.
3. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN (1993). Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*, 104: 129-35.
4. World Health Organization: WHO (2011). Obesity Report 2011 (online) Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
5. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, Savino S, Liuzzi A, Balzola F, et al (2005). Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: a comparison between healthy and obese females. *J Clin Endocr Metab* 90(3): 1728-33.
6. Rozenberg O, Rosenblat M, Coleman R, Shih DM, Aviram M (2003). Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Radic Biol Med*;34(6): 774-84.
7. Deakin SP, James RW (2004). Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-I. *Clin Sci* 107(5): 435-47.
8. Audikovszky M, Pados G, Seres I, Harangi M, Fülöp P, Katona E, Illyes L, Winkler G, Katona E, Paragh G (2007). Orlistat increases serum paraoxonase activity in obese patients. *Nutr Metab Cardiovas* 17: 268-273.
9. Mansour H, Hafez H, Fahmy HF, Hanafi NM (2008). Protective effect of N-acetylcysteine against radiation induced DNA damage and hepatic toxicity in rats. *Biochem Pharmacol* 75: 773–780.
10. Novelli ELB, Santos PP, Assalin HB, Souza G, Rocha K, Ebaid GX, Seiva FRF, Mani F, Fernandes AA (2009). N-acetylcysteine in high-sucrose diet-induced obesity: Energy expenditure and metabolic shifting for cardiac health. *Pharmacol Res* 59: 74–79.

11. Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışma Grubu (2002). Population based study of diabetes and risk characteristics in Turkey, results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). 25(9): 1551-6. Türkiye Endokronoloji Metabolizma Derneği Dergisi (2002) ANKARA
12. Türkiye Hipertansiyon ve Obezite Taraması Çalışma Grubu (2002). Türkiye obezite ve hipertansiyon taraması sonuçları (TOHTA). 11(1): 1-15. Endokrinolojide Yonelişler Dergisi (2002) Sağlık Bakanlığı ANKARA
13. Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri Çalışma Grubu (2009). Türk erişkinlerde koroner risk faktörleri çalışması (TEKHARF). Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi Dergisi ANKARA
14. Ertem M, Bahceci M, Tuzcu A, Ozturk U and Gokalp D (2008). Association between high parity and obesity in women living in southeastern region of Turkey. Eating and Weight Disorders studying anorexia, blumia and obesity. Nutr Res 13(1):4-7.
15. Ahmet Kaya, Vedia Tonyukuk Gedik, Fahri Bayram, Mithat Bahçeci (2009). Obezite, dislipidemi, hipertansiyon hekim için tanı ve tedavi rehberi. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Rehber Yayını ANKARA
16. Lee M, Martin H, Firpo MA, Demeraht EW (2009). Inverse association between adiposity and telomere lenght: The fells longitudinal study. Am J Hum Biol 23(1): 100-106.
17. Higdon JV, Frei B (2003). Obesity and oxidative stress: a direct link to CVD. Arterioscler Thromb Vasc Biol; 23: 365-7.
18. Fearon IM, Faux SP (2009). Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. J Mol Cell Cardiol; 47: 372-81.
19. Khan NI, Naz L, Yasmeen G (2006). Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. Pak J Pharm Sci 19: 62-5.
20. Olusi SO (2002). Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotectic enzymes in humans. Int J Obes Relat Metab Disord 26: 1159-64.
21. Vincent HK, Taylor AG (2006). Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. Int J Obes (Lond) 30: 400-18.

22. Matthew A. Schrager, E. Jeffrey Metter, Eleanor Simonsick, Alessandro Ble, Stefania Bandinelli, Fulvio Lauretani, Luigi Ferrucci (2006). Sarcopenic obesity and inflammation in the InChianti study; *J Appl Physiol* (March 2007) 102: 919-925.
23. Balaban F (2006). Fındığın aterojenik ve antiaterojenik parametreler üzerine etkisinin incelenmesi. Doktora Tezi Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, TRABZON.
24. Navab M, Fogelman AM, Berliner JA (1995). Pathogenesis of atherosclerosis. *AM J Cardiol* 76: 18-23.
25. Barter P, Kastelein J, Nunn A, Hobbs R, Forum F, Board E (2003). High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis* 168: 195-211.
26. Mahley W, Huang Y, Weisgraben K (2006). Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *J Clin Invest* 116: 1226-1229.
27. Beer S, Moren X, Ruiz J, James R (2006). Postprandial modulation of serum paraoxonase activity and concentration in diabetic and non-diabetic subjects. *Nutr Metab Cardiovas* 16: 457-465.
28. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M (2006). Postprandial serum triacylglycerols and oxidative stress in mice after consumption of fish oil, soy oil or olive oil: Possible role for paraoxonase-1 triacylglycerol lipase-like activity. *Nutrition* 22: 922-930.
29. Ferretti G, Bacchetti T, Negre-Salvayre A, Salvayre R, Dousset N, Curatola G (2006). Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis* 184: 1-7.
30. Jiang XL, Li M, Zhou JG, Yang QB, Du LJ, Du J (2011). Plasma paraoxonase-1, oxidized low-density lipoprotein and lipid peroxidation levels in gout patients. *Cell Biochem Biophys* 61(2): 461-6.
31. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI (2001). Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(4): 473-80.
32. Bayrak T, Bayrak A, Demirpençe E, Kılınç K (2005). Yeni bir kardiyovasküler belirteç adayı: paraoksonaz. *Hacettepe Tıp Dergisi* 36: 147-51.
33. Josse D, Xie W, Renault F, Rochu, D, Schopfer LM, Masson P At al (1999). Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) Arylesterase/Organophosphatase Activities. *Biochemistry* 38 (9): 2816-2825.

34. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, et al (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 11: 412-9.
35. La Du BN, Aviram M, Billecke S, et al (1999). On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 119-120: 379-388.
36. Van Himbergen TM, Van Tits LJH, Roest M, Stalenhoef AFH (2006). The story of PON1: how an organophosphate hydrolyzing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Neth J Med* 64(2): 34-38.
37. Mazur A (1946). An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem* 164: 271-289.
38. Aldridge WN (1953). Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J* 53(1): 110-117.
39. Aldridge WN (1953). Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J* 53(1):117-124.
40. La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, et al (1999). On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 119-120:379-88.
41. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE (1993). The molecular basis of the human paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 3(1):73-6.
42. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay, A et al (2001). Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(4): 542-547.
43. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN (2000). Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 275(43):33435-42.
44. Cemil Kahraman (2013). KTÜ Tıbbi Biyokimya Doktora Tezi; Diyetle İndüklenmiş Obezitede Yağ Dokusundaki Oksidan Antioksidan Dengenin İncelenmesi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü TRABZON

45. Oda MN, Bielicki JK, Berger T, Forte TM (2001). Cysteine substitutions in apolipoprotein AI primary structure modulate paraoxonase activity. *Biochemistry* 40: 1710-18.
46. La Du BN (1992) Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow W. Genetic Factors Influencing the Metabolism of Foreign Compounds: International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics. Pergamon Press, New York; p.51-91.
47. Harel M, Brumshtein B, Meged R, Dvir H, Ravelli RBG, McCarthy A, et al (2007). 3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility and crystallizability. *Arch Hig Rada Toxicol* 58(3): 347-53.
48. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI (2001). Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 354(1): 1-7.
49. Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, et al (2001). Apolipoprotein A-I promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (PON-1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxynitrite donor. *J Biol Chem* 276 (27): 24473-81.
50. Jakubowski H (2000). Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein Nhomocysteinylation. *J Biol Chem* 275(6): 3957-62.
51. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M (2003). Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(3): 461-7.
52. Rosenblat M, Vaya J, Shih D, Aviram M (2005). Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 179(1): 69-77.
53. Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, Randel RI (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193: 265-275.
54. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI (2001). Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(4): 473-80.

55. Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Durrington PN (1997). The alloenzymes of paraoxonase determine the effectiveness of high-density lipoprotein in protecting low density lipoprotein against lipid-peroxidation. *Lancet* 349(9055): 851-2.
56. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P et al (1997). Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 99(1): 62-6.
57. Mackness M, Mackness B, Durrington PN, Fogelman AM, Berliner J, Lusis AJ, et al (1998). Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 9(4): 319-4.
58. Tuncel P, Örmən M, Şişman AR (2009). Paraoksonazın biyolojik varyasyonu ve HDL-Kolesterol ile ilişkisi. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 7(1): 17-22.
59. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, et al (1991). Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 86(2): 193-9.
60. Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW (1995). A polymorphism of the paraoxonase gene associated with variation in plasma lipoproteins in a genetic isolate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(1): 89-95.
61. Rozenberg O, Rosenblat M, Coleman R, Shih DM, Aviram M (2003). Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Radic Biol Med* 34(6): 774-84.
62. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA (1996). Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 7: 69-76.
63. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN (1991). Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos* 19: 100-6.
64. Dragonov DI, La Du NB (2004). Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369: 78-88.
65. Calebresi L, Gomaschi M, Francschini G (2003). Endothelial protection by high density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1724-31.
66. Ferretti G, Bacchetti T (2012). Effect of dietary lipids on paraoxonase-1 activity and gene expression. *Nutr Metab Cardiovas* 22: 88-94.

67. Khersonsky O, Tawfik DS (2006). The Histidine 115-Histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonase. *J Bio Chem* 281: 7649-56.
68. G.Voghel, Nathalie Thorin-Trescases, N.Farhat, AM. Mamarbachi, L.Villeneuve, Fortier A, Perrault LP, Carrier M, Thorin E (2008). Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mec Aging Dev* 129(5): 261-270.
69. Akça T, Canbaz H, Tataroğlu C, Çağlıkulekçi M, Tamer L, Çolak T, Kanık A, Bilgin Ö, Aydın S (2005). The Effect of N-Acetylcysteine on Pulmonary Lipid Peroxidation and Tissue Damage. *J Surci Res* 129(1): 38-45.
70. de Pablo MA, Alvarez G, Puertollano MA (2003). Antioxidant properties of N-acetyl-L-cystein do not improve the immune resistance of mice fed dietary lipids to *Listeria monocytogenes* infection. *J Clin Nutr* 22(3): 313-319.
71. Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M et al (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752-1761.
72. Vázquez-Vela MEF, Torres N, Tovar AR (2008). White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research* 39: 715-728.
73. Sutherland WHF, Walker RJ, de Jong SA, van Rij AM, Phillips V, Walker HL (1999). Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1340-7.
74. Mackness B, Mackness M, Aviram M, Paragh G (2008). *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism*. 1st ed. Published by Springer, PO Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands; 130-135.
75. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE (2005). Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol* 69: 541–550.
76. Wallace AJ, Sutherland WHF, JI Mann, Williams SM (2001). The effect of meals rich in thermally stressed olive and safflower oils on postprandial serum paraoxonase activity in patients with diabetes. *Eur J Clin Nutr* 55: 951–958.
77. Richter RJ, Furlong CE (1999). Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 9(6): 745-53.

78. Durak I, Ozbek H, Devrim E, Karagen E, and Ergtider IB (2004). Effects of cholesterol supplementation on antioxidant enzyme activities in rat hepatic tissues: possible implications of hepatic paraoxonase in atherogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 14: 211-214.
79. Wang CF, Godar RJ, Billington CJ, Kotz CM (2009). Chronic administration of brain-derived neurotropic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus revrses obesity induced by high-fat diet. *J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: 1320-1332.

ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmasının Adı : “Yüksek Yağlı Diyetle İndüklenen Obezitede N-Asetilsisteinin Serum ve Karaciğer Dokusu Paraoksonaz 1 (PON 1) Aktiviteleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi”
Çalışmacılar : Y.Doç.Dr.Fulya BALABAN YÜCESAN, Yük.Lis.Öğr.Deniz DUMAN, Doç.Dr.Ahmet ALVER, Arş.Gör.Cemil KAHRAMAN, Arş.Gör.Serap ÖZER, Doç.Dr.Sinan CANPOLAT, Prof.Dr.Asım ÖREM
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya ABD.

Etik Kurul Dosya No 2013/ 46	Etik Kurul Toplantı Tarihi 25.06.2013	Etik Kurul Toplantı No 2013/11	Etik Kurul Karar No 7
--	---	--	-------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu’nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN’ın başkanlığında; “Yüksek Yağlı Diyetle İndüklenen Obezitede N-Asetilsisteinin Serum ve Karaciğer Dokusu Paraoksonaz 1 (PON 1) Aktiviteleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi” başlığını taşıyan çalışmasının, Karadeniz Teknik Üniversitesi’nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (25.06.2013)

Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı: Deniz DUMAN

Uyruğu: T.C

Doğum tarihi ve yeri: 02.06.1981, Rize

E-Posta: deniz_duman@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü	2005
Lise	Rize Anadolu Lisesi	1999
YABANCI DİL	İngilizce	