

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BÖBREK EPİTEL HÜCRELERİNDE ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİNİN LİPİD DÜZEYLERİ,
İNFLAMATUAR VE APOPTOTİK YOLAKLAR
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Hanife Tuğçe ÇEKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BÖBREK EPİTEL HÜCRELERİNDE ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRESİNİN LİPİD DÜZEYLERİ,
İNFLAMATUAR VE APOPTOTİK YOLAKLAR
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Hanife Tuğçe ÇEKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mutay ASLAN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2019-5107 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu alışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Tıbbi Biyokimya Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 08/07/2021

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Güzin AYKAL
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erol GÜRPINAR

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Hanife Tuğçe ÇEKER

İmza

Tez Danışmanı

Mutay ASLAN

İmza

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren bana olan inancı için, bir bilim insanı olma yolunda teşvik ederek beni eğittiği ve hem akademik anlamda hem de manevi olarak daima ileriye yönlendirerek tecrübeleri ile bana yol gösterdiği için, her türlü süreçte yanımda olarak gösterdiği sabır ve hoşgörü için, beni her daim motive ettiği ve desteğini esirgemediği için öncelikle sayın danışman hocam Prof. Dr. Mutay ASLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam öncesinde ve sonrasında bilgi ve tecrübeleri ile katkı sağlayan sayın hocam Öğr. Gör. Esmâ KIRIMLIOĞLU ve tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma,

Aynı laboratuvarında araştırma yapmaktan mutluluk duyduğum, hayata ve deneylere olan farklı bakış açıları ile beni her daim şaşırtan ve ufkumu genişleten ve beni asla yarı yolda bırakmayan değerli asistan arkadaşım Çağatay YILMAZ'a,

Berber çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

TYL-2019-5107 numarası ile tez projemi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve her sorumu mutlulukla cevaplayan güler yüzlü Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Sevgileri ve sonsuz destekleri ile her daim yanımda olan canım kardeşlerim Emine ÇEKER ve Furkan ÇEKER'e ve son olarak bitmeyen koşulsuz şartsız sevgisi, inancı ve desteği ile beni bu günlere getiren, hayatımda gördüğüm en güçlü kadın olarak her türlü zorluğun üstesinden gelip gücüme güç katan, eğitim almamı yürekten isteyen ve yüksek lisans tezimi ithaf ettiğim hayattaki en güzel şansım biricik ANNEM'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Bu çalışma, insan böbrek epitel hücrelerinde (HEK-293), tunikamisin (TM) ile ilişkili sfingolipid ve poliansatüre yağ asidi (PUFA) değişimlerini ve bunların inflamatuvar ve apoptotik yollar üzerine etkilerini belirlemeyi amaçlamıştır. HEK-293 hücrelerine endoplazmik retikulum (ER) stresini indüklemek için tunikamisin ve sitotoksositeyi azaltmak için bir ER stres inhibitörü olan tauroursodeoksikolik asit (TUDCA) uygulanmıştır.

Yöntem: Hücre canlılığı 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit (MTT) analizi ile belirlendi. Sfingomiyelin (SM), seramid (CER) ve PUFA seviyeleri sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) ile ölçüldü. Glukozla düzenlenen protein 78-kd (GRP78), kesilmiş kaspaz-3 ve siklooksijenaz-1 (COX-1) protein seviyeleri immüno floresan yöntem ile değerlendirildi. Enzim aktivitelerindeki değişiklikler sitozolik fosfolipaz A₂ (cPLA₂), total COX ve prostaglandin E₂ (PGE₂) ölçümleri ile belirlendi.

Bulgular: Tunikamisin ile muamele edilmiş hücrelerde azalan hücre canlılığı gözlemlendi. Tunikamisin uygulamasını takiben TUDCA'nın muamelesi, tek başına TM uygulamasına kıyasla hücre canlılığını anlamlı olarak arttırdı. Tunikamisin ile indüklenen ER stresi, GRP78'in anlamlı olarak artmış protein seviyeleri ile doğrulandı. Kontrole kıyasla 5 µg/ml TM ile muamele edilen hücrelerde sfingosin-1-fosfat (S1P) seviyeleri ve cPLA₂ aktivitesinde anlamlı bir azalma meydana gelirken, C18-C24 CER'lerde ve kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı bir artış gözlemlendi. Tunikamisin uygulanan hücrelerde cPLA₂ aktivitesindeki azalmaya, anlamlı olarak artmış PUFA seviyeleri eşlik etti. Tunikamisin ile TUDCA'nın birlikte uygulaması, ER stresini, C18-C24 CER seviyelerini ve kaspaz-3 aktivitesini anlamlı olarak azalttı ve S1P seviyelerini arttırdı.

Sonuç: Bu çalışma ile ER stresine maruz kalan HEK-293 hücrelerinde artan apoptotik aktivitenin yanı sıra, hücrelerde uzun zincirli CER'lerin ve PUFA'ların birikimi gösterilmiştir. Tauroursodeoksikolik asit uygulaması, TM muamelesi sonucu biriken CER seviyelerini ve TM ile indüklenen apoptotik aktiviteyi azaltmıştır.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, Tunikamisin, Sfingolipid, Seramid, PUFA

ABSTRACT

Objective: This study aimed to determine tunicamycin (TM)-related sphingolipid and polyunsaturated fatty acid (PUFA) changes in human kidney cells (HEK-293) and their effects on inflammatory and apoptotic pathways. Tunicamycin was employed to induce endoplasmic reticulum (ER) stress in HEK-293 cells and an ER stress inhibitor, tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), was given to minimize cytotoxicity.

Method: Cell viability was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Sphingomyelin (SM), ceramide (CER) and PUFA levels were measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Glucose-regulated protein 78-kd (GRP78), cleaved caspase-3 and cyclooxygenase-1 (COX-1) protein levels were assessed by immunofluorescence. Cytosolic phospholipase A2 (cPLA₂), total COX and prostaglandin E2 (PGE₂) were measured to evaluate changes in enzyme activity.

Results: Decreased cell viability was observed in TM treated cells. Administration of TUDCA following TM treatment significantly increased cell viability compared to TM treatment alone. Tunicamycin-induced ER stress was confirmed by significantly increased protein levels of GRP78. A significant increase was observed in C18-C24 CERs and caspase-3 activity, while a significant decrease occurred in sphingosine-1-phosphate (S1P) and cPLA₂ activity in cells treated with $\mu\text{g/ml}$ versus controls. The decrease in cPLA₂ activity was accompanied by significantly increased PUFA levels in TM treated cells. Tauroursodeoxycholic acid treatment in conjunction with TM significantly decreased ER stress, C18-C24 CERs, caspase 3 activity and increased S1P levels.

Conclusion: Results show the build-up of long chain CERs and PUFAs in HEK-293 cells undergoing ER stress alongside increased apoptotic activity. Tauroursodeoxycholic acid administration, along with TM treatment alleviated the build-up of CERs and TM-induced apoptotic activity in kidney epithelial cells.

Key words: Kidney, Tunicamycin, Sphingolipid, Ceramide, PUFA

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek Morfolojisi ve Fonksiyonlarına Genel Bakış	3
2.1.1. Böbrek Anatomisi	3
2.1.2. Böbreklerin Fonksiyonları	5
2.2. Endoplazmik Retikulum Fonksiyonları ve Stresi	7
2.2.1. Katlanmamış Protein Cevabı (UPR)	8
2.2.2. Protein Kinaz RNA (PKR) Benzeri ER Kinaz (PERK) Sinyal Yolağı	9
2.2.3. Aktive Edici Transkripsiyon Faktör 6 (ATF6) Sinyal Yolağı	11
2.2.4. Inositol Gerektiren Kinaz 1 (IRE1) Sinyal Yolağı	13
2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis	14
2.4. Sfingolipitler	16
2.4.1. Seramid	17

2.4.2. Sfingosin	18
2.4.3. Sfingoin 1-fosfat (S1P) ve Seramid 1-fosfat (C1P)	18
2.5. Poliansature Yağ Asitleri (PUFA)	19
2.5.1. Eikozanoidler	20
2.5.2. Siklooksijenaz (COX) Yolağı	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	23
3.1.1. Hücre Besiyerinin Hazırlanması	23
3.1.2. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültür Başlangıcı	23
3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması	24
3.1.4. Hücrelerin Dondurulması	25
3.2. HEK-293 Hücrelerinde ER Stresi Oluşturulması	25
3.3. TUDCA Doz Çalışması	25
3.4. Hücre Canlılığı Deneyi	25
3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması	26
3.6. İmmünfloresan Boyama	27
3.7. Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi	28
3.8. Sitolitik Fosfolipaz A2 (cPLA2) Aktivitesinin Belirlenmesi	28
3.9. Siklooksijenaz (COX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	29
3.10. Prostaglandin E2 (PGE2) Seviyelerinin Belirlenmesi	30

3.11 Sfingomiyelin ve Seramid Seviyelerinin Belirlenmesi	31
3.12. Sfingolipid ve Seramid Kütle Spektrometrik Analizleri İçin Hücre Örneklerinin Hazırlanması	32
3.13. Yağ Asidi Seviyelerinin Belirlenmesi	32
3.14. Yağ Asidi Kütle Spektrometrik Analizleri İçin Hücre Örneklerinin Hazırlanması	34
3.15. Protein Ölçümleri	34
3.16. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	36
4.1. Hücre Canlılığı Analizi ve TUDCA'nın Koruyucu Etkinliğinin Değerlendirilmesi	36
4.2. ER Stresinin İndüklenmesi	40
4.3. Sfingolipid Düzeyleri	40
4.4. Kaspaz-3 Aktivitesi	41
4.5. Sitolitik Fosfolipaz A2, Siklooksijenaz ve Prostaglandin E2 Seviyeleri	42
4.6. Poliansature Yağ Asidi Seviyeleri	44
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	61

TABLolar DİZİNİ

Tablo 4.1.	TM ve TUDCA'nın 24 Saat Boyunca Birlikte Uygulanması Sonrası Hücre Canlılığı.	39
Tablo 4.2.	24 Saatlik TM Muamelesinden 12 Saat Önce TUDCA Uygulanması Sonucu Hücre Canlılığı.	39
Tablo 4.3.	HEK-293 Hücrelerinde Sfingolipid Düzeyleri.	41
Tablo 4.4.	HEK-293 Hücrelerinde Poliansatüre Yağ Asiti Düzeyleri.	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Genel böbrek anatomisi.	3
Şekil 2.2.	Böbrek anatomisi ve nefron yapısı.	4
Şekil 2.3.	Jukstaglomerüler aparat (JGA).	5
Şekil 2.4.	Nefronun temel fizyolojik mekanizmaları.	6
Şekil 2.5.	UPR sinyal mekanizmaları.	9
Şekil 2.6.	Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz	11
Şekil 2.7.	Aktive edici transkripsiyon faktör 6 (ATF6) sinyal yolağı.	12
Şekil 2.8.	Inositol gerektiren kinaz 1 (IRE1) sinyal yolağı.	14
Şekil 2.9.	ER stresi sonucu meydana gelen apoptoz yolakları.	15
Şekil 2.10.	Sfingolipid metabolizması.	17
Şekil 2.11	ALA ve LA dönüşümü özeti.	20
Şekil 2.12	Eikozanoidlerin sentezi.	21
Şekil 2.13	Prostaglandin sentez yolakları.	22
Şekil 4.1.	HEK-293 hücrelerinde MTT analizi ile hücre canlılığının değerlendirilmesi.	38
Şekil 4.2.	HEK-293 hücrelerinde GRP78 immüno Floresans düzeyleri.	40
Şekil 4.3.	HEK-293 hücrelerinde kaspaz-3 immüno Floresans ve aktivite düzeyleri.	42
Şekil 4.4.	HEK-293 hücrelerinde cPLA2, COX ve PGE2 aktiviteleri ve COX immüno Floresans düzeyleri.	44

SİMGELER ve KISALTMALAR

AA	: Araşidonik asit
AA-d8	: Döteryum bağı araşidonik asit
AChE	: Asetilkolinesteraz
ADPH	: 10-asetil-3,7 dihidroksifenoksazin
ALA	: α -linolenik asit
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ASK1	: Sinyal regüle edici kinaz
ATF6	: Aktive edici transkripsiyon faktör 6
BAK	: Bcl-2 homolog antagonist protein
BAX	: Bcl-2 ilişkili X protein
Bcl2	: B-hücre lenfoma 2
BSA	: Bovin serum albumin
bZIP	: Lösün fermuar transkripsiyon faktör
C16 CER	: N-palmitoil-D-eritro-sfingosin
C16 CER*IS	: N-palmitoil-D-eritro-sfingosin internal standartı
C16 SM	: N-palmitoil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin
C18 CER	: N-stearoil-D-eritro-sfingosin
C18 SM	: N-stearoil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin
C1P	: Seramid-1-fosfat
C20 CER	: N-araşidoil-D-eritro-sfingosin
C22 CER	: N-behenoil-D-eritro-sfingosin
C24 CER	: N-lignoseroil-D-eritro-sfingosin

C24 SM	: N-lignoseroil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin
CalB	: Kalsiyum-bağlı lipid bağlama proteini
CER	: Seramid
CERK	: Seramid kinaz
CERT	: Seramid transfer proteini
CHOP	: C/EBP homolog proteini
COPII	: COP kaplı protein II
COX	: Siklooksijenaz
cPLA₂	: Sitozolik fosfolipaz A ₂
CTCF	: Düzeltiilmiş total floresans
DAG	: Diaçilgliserol
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DEVD-AFC	: 7-amino-4-triflorometik kumarin
DGLA	: Dihomogama-linoleik asit
DHA	: Dokosaheksaenoik asit
DMEM/F-12	: Dulbecco modifiye Eagle medyum: F-12 karışımı
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DTNB	: 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit) reaktifi
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
eIF2α	: Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent assay
EPA	: Eikosapentaenoik asit
ER	: Endoplazmik Retikulum

ERAD	: ER ilişkili protein yıkımı
ERK	: Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz
ESI	: Elektro-sprey-iyonizasyon
FBS	: Fetal bovin serum
GADD34	: Büyüme aresti ve DNA hasarı ile indüklenebilir protein 34'
GRP78	: Glukozla düzenlenen protein 78-kd
HEK-293	: İnsan böbrek epitel hücreleri
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IgG	: İmmüoglobulin G
IL-1	: İnterlökin-1
IRE1	: İnositol gerektiren kinaz 1
IS	: İnternal standart
iPLA₂	: Kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A ₂
JGA	: Jukstaglomerüler aparat
JNK	: c-Jun N-terminal kinaz
LA	: Linoleik asit
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi
MPT	: Mitokondriyal permeabilite geçiş por kompleksi
MRM	: Çoklu reaksiyon izleme metodu
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	: Nükleer faktör κ B

NF-κB	: Nükleer faktör-κB
NRF2	: Nükleer faktör eritroid ilişkili faktör 2
p38MAPK	: p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PDI	: Protein disülfid izomeraz
PERK	: Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
PGG₂	: Hidroperoksi endoperoksit
PKR	: Protein kinaz RNA
PUFA	: Poliansatüre yağ asidi
RIDD	: Regüle IRE1-bağlı bozunma
ROS	: Reaktif oksijen türleri
S1P	: Sfingosin-1-fosfat
S1Paz	: Serin proteaz site-1 proteaz
S2P	: Metaloproteaz site-2 proteaz
SERCA	: Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca ²⁺ -ATPaz
SM	: Sfingomiyelin
SMaz	: Sfingomiyelinaz
SMS	: Sfingomiyelin sentazlar
SphK	: Sfingosin kinazlar
sPLA₂	: Sekretuar fosfolipaz A ₂
SPT	: Serin palmitoil transferaz
sXBP1	: Kırpılmış X kutusu bağlayıcı protein 1

TM	: Tunikamisin
TNF-α	: Tumor nekrozis faktör- α
TRAF2	: Tumor nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 2
TUDCA	: Tauroursodeoksikolik asit
UFLC	: Ultra-hızlı sıvı kromatografi
UPR	: Katlanmamış protein cevabı
XPB1	: X kutusu bağlayıcı protein 1

1. GİRİŞ

Endoplazmik retikulum stresi, akut ve kronik böbrek hastalığı olan kişilerde, tübüler ve glomerüler bozukluklarda rol oynamaktadır. Hiperglisemik ve proteinürik hastalıklarda, tübüler epitel hücreleri adaptif bir ER stresine maruz kalır. Bununla birlikte, hipergliseminin ve proteinürinin sürmesi, zamanla ER stresine bağlı apoptozise yol açabilir (Inagi, 2009). Çalışmalar, ER stresinin diyabetik nefropati, inflamasyona bağlı böbrek hasarı, renal iskemi-reperfüzyon ve proteinüri başlangıcında rol oynadığını (Taniguchi ve Yoshida, 2015) ve hem akut böbrek iskemisi (Kuznetsov ve ark., 1996) hem de kronik renal tübüler interstisyel hasar (Kimura ve ark., 2008) sonrasında ER stresinin indüksiyonunu göstermiştir. Glomerüllerdeki podosit ve mezanjiyal disfonksiyonlar da ER stresi ile ilişkilidir. Membran nefropatisinin pasif Heymann nefrit modelinde, komplement C5b-9'un glomerüler epitel hücre hasarını ve komplement C5b-9 membran atak kompleksi ile bu hücrelerde ER stresini indüklediği gösterilmiştir (Cybulsky ve ark., 2002). Tunikamisin veya thapsigargin gibi ER stres mediyatörlerinin ön koşullandırılmasının, mezanjiyoproliferatif glomerülonefriti geliştirdiği gösterilmiştir ve bu durum belirli böbrek hastalıklarında ER stresini hedefleyen terapötik yaklaşımların kullanılma olasılığını düşündürmektedir (Inagi ve ark., 2008).

Böbrek tübüler epitel hücreleri, artan seviyede protein glikolizasyonu ile ER stresini indükleyici etki gösteren TM gibi kimyasallara karşı çok hassastır (Price ve Tsvetanova, 2007). Dahası, TM'nin öldürücü olmayan tek bir intraperitoneal enjeksiyonu, farelerde geçici böbrek yetmezliği ile sonuçlanmaktadır (Zinszner ve ark., 1998). Endoplazmik retikulum stresi ve ER aracılı hücre ölümü belirteçleri, nefrotoksik dozlarda sisplatin, gentamisin ve asetaminofenin metabolitlerine maruz kalan böbrek dokusunda ve parasetamol ile indüklenmiş renal tübüler hasarlarda da tanımlanmıştır (Lorz ve ark., 2004; Peyrou ve ark., 2007).

ER stresi altında lipidlerin ve lipid ara metabolitlerinin birikmesi, böbrekte lipotoksisite olarak tanımlanan metabolik yetmezliği tetiklemektedir (Aslan, Elpek, ve ark., 2021). Sfingolipidler, böbrek hücrelerinde yapısal ve sinyal verici rollere sahip çeşitli metabolik lipidlerdir. Sfingolipid metabolizması ER stresini de içerebilen birtakım böbrek

hastalıkları sırasında değişmektedir (Ueda, 2017). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, sıçanlarda oluşturulan renal ER stres modelinde artmış seramid seviyeleri gösterilmiştir (Aslan, Elpek, ve ark., 2021). Aynı şekilde, yağ asiti birikimi de podositlerde gelişen ER stresi ile ilişkilendirilmiştir (Sieber ve ark., 2010).

Seramidin, hücre zarı fosfolipidlerini yıkıma uğratan ve araşidonik asit salınımı gerçekleştiren cPLA₂ aktivasyonunu sağladığı bilinmektedir (Huwiler ve ark., 2001). Seramidin ayrıca ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolakları ile COX-2 protein seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir (Subbaramaiah ve ark., 1998). Benzer şekilde, artan PUFA seviyelerinin mitokondriyal respirasyon ve ̢-oksidasyonu zayıflatarak hücresel hasarı arttırdığı yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Lu ve ark., 2010).

Bu alışma, insan böbrek epitel hücrelerinde, ER stresi aracılı lipotoksisitenin mekanizmasını anlamayı amaçlamıştır. HEK-293 hücre hattında ER stresi ile ilişkili sfingolipid ve PUFA değişimlerini incelemek için lipidomik ölümler yapıldı. Endoplazmik retikulum stresinin neden olduğu lipotoksisite ve inflamasyon arasındaki bağlantı da cPLA₂ aktivitesi, COX-1 protein ekspresyonu ve PGE₂ seviyeleri ölümlerle değerlendirildi.

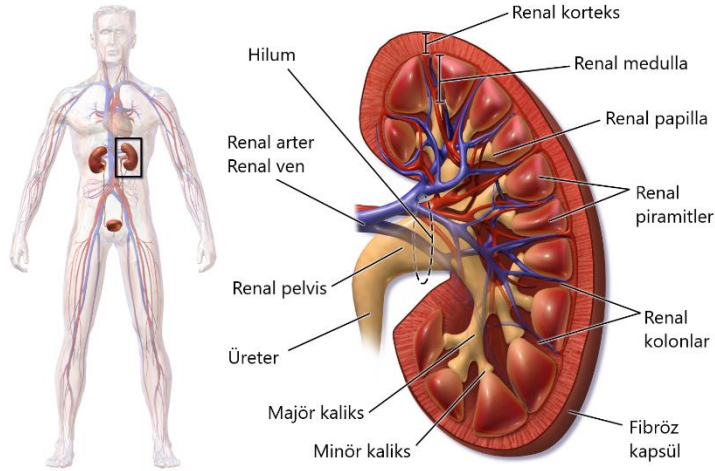
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Morfolojisi ve Fonksiyonlarına Genel Bakış

2.1.1. Böbrek Anatomisi

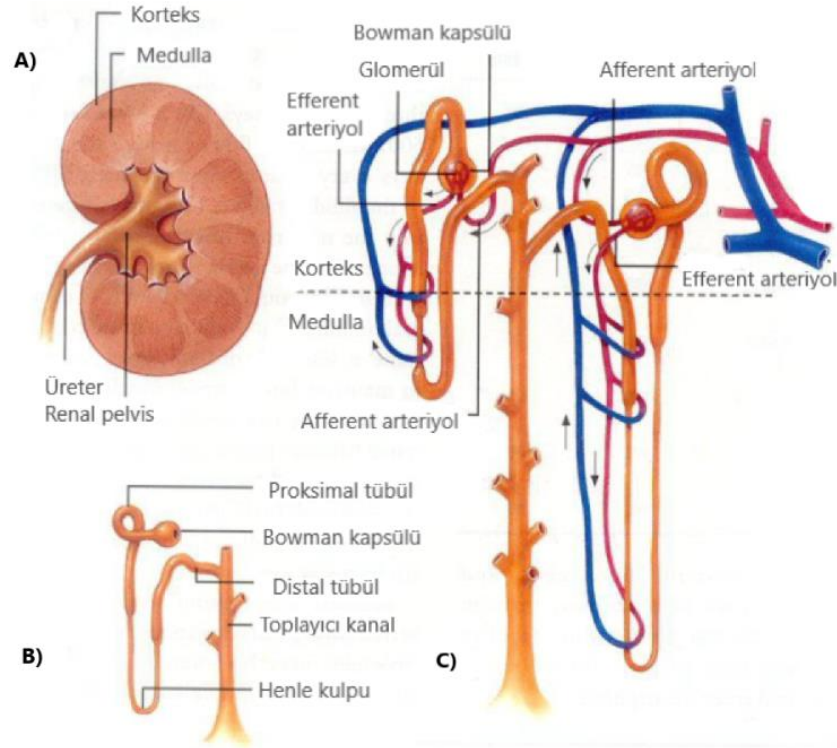
Böbrekler, vücutta hayati fonksiyonların sürdürülmesinde görevli, birçok farklı fonksiyona sahip karmaşık yapıları organlardır. Böbreklerin birincil fonksiyonu vücutta sıvı, elektrolit ve asit-baz dengelerinin sağlanması ve plazmadan artıkların temizlenmesidir. Düzgün işleyen bir madde-su homeostazının sağlanması dışında böbreklerin bir diğer önemli görevi de hormonal düzenlemelerdir (Wallace, 1998). Tüm bu fonksiyonların yerine getirilmesi için böbreklerde yirmiden fazla özelleşmiş hücre tipi bulunmaktadır (Sivakamasundari ve ark., 2017).

Böbrekler omurganın her iki yanında retroperitoneal olarak bulunmaktadır ve korteks olarak adlandırılan bir dış bölge ve medulla olarak adlandırılan bir iç kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.1.). Medulla kısmı böbrek piramitleri olarak adlandırılan konik oluşumlardan meydana gelir ve bu oluşumlar papilla kısmında son bulur. Papillalar yeni oluşan idrarı üreterler ile mesaneye göndermek üzere işlevselmiş böbreğin pelvis kısmına açılmaktadır (Wallace, 1998).



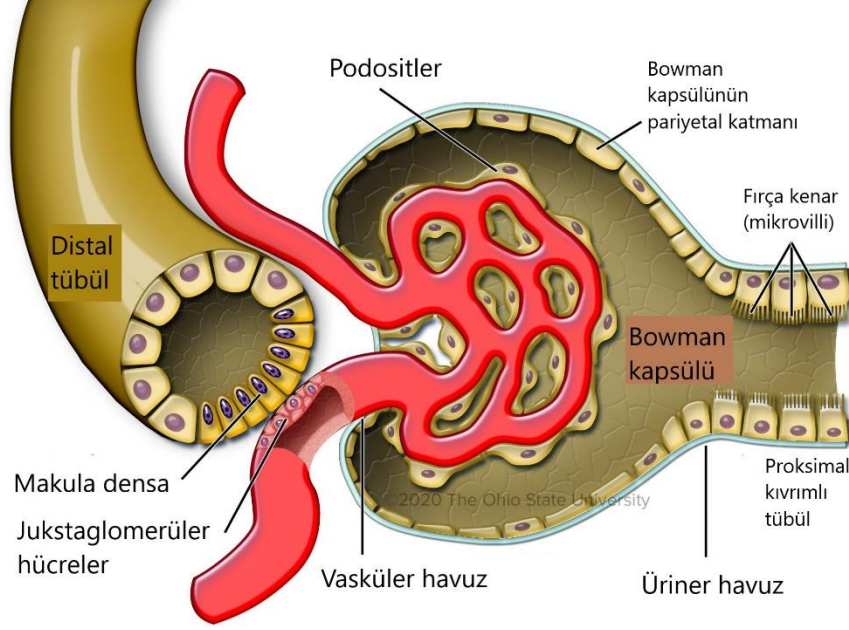
Şekil 2.1. Genel böbrek anatomisi. (Blausen, 2014)'ten uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

Böbreklerin ana fonksiyonel birimi nefrondur ve her böbrekte yaklaşık 1 milyon nefron bulunmaktadır. Kompleks bir aparat olan nefron beş temel bölümden meydana gelmektedir (Bishop ve ark., 2013). 1) Glomerül; kandan büyük miktarda sıvının filtre olduğu, Bowman kapsülü ile sarılmış renal tübülün sonundaki genişlemiş kapiller yumak sistemidir. Her glomerül kanı getiren afferent arteriyol ve kanı götüren efferent arteriyol ile beslenerek akış sağlanmaktadır. 2) Proksimal kıvrımlı tübül; kortekste bulunur ve kapillerden filtre olan sıvı Bowman kapsülünden sonra buraya akmaktadır. 3) Henle kulpu; medullada bulunur. İnen ve ikinci yarısı daha kalın olan çıkan kollarından oluşur. 4) Distal kıvrımlı tübül; Henle kulpu'nun çıkan kısmının kortekse yeniden girmesiyle oluşur. 5) Toplayıcı kanallar; İki veya daha fazla distal kıvrımlı tübülün birleşmesi ile oluşmaktadır ve nefrondan süzülen idrarın toplandığı medullada bulunur. Toplayıcı kanallar çapları giderek genişleyip birleşerek içeriklerini böbrek pelvisine boşaltırlar (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Böbrek anatomisi ve nefron yapısı. **A)** Böbrek genel anatomisi. **B)** Nefron yapısının beş temel bölümü. **C)** Nefron aparatının afferent ve efferent arteriyoller ile etkileşimi. (Filippo, 2012)'den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

Distal tübülün başlangıç kısmında macula densa olarak bilinen nefron fonksiyonlarının kontrolünde önemli işlevleri olan bir hücre grubu bulunmaktadır. Macula densa ve jukstaglomerüler hücreler bir araya gelerek jukstaglomerüler aparatı (JGA) oluştururlar (Şekil 2.3). Jukstaglomerüler aparat, hidrasyon, kan hacmi ve iyon konsantrasyonu gibi çeşitli faktörlere bağlı kan akış hızını kontrol etmektedir ve kan basıncı değişikliklerine yanıt olarak buradan renin salgılanmaktadır (Gürdöl, 2019).

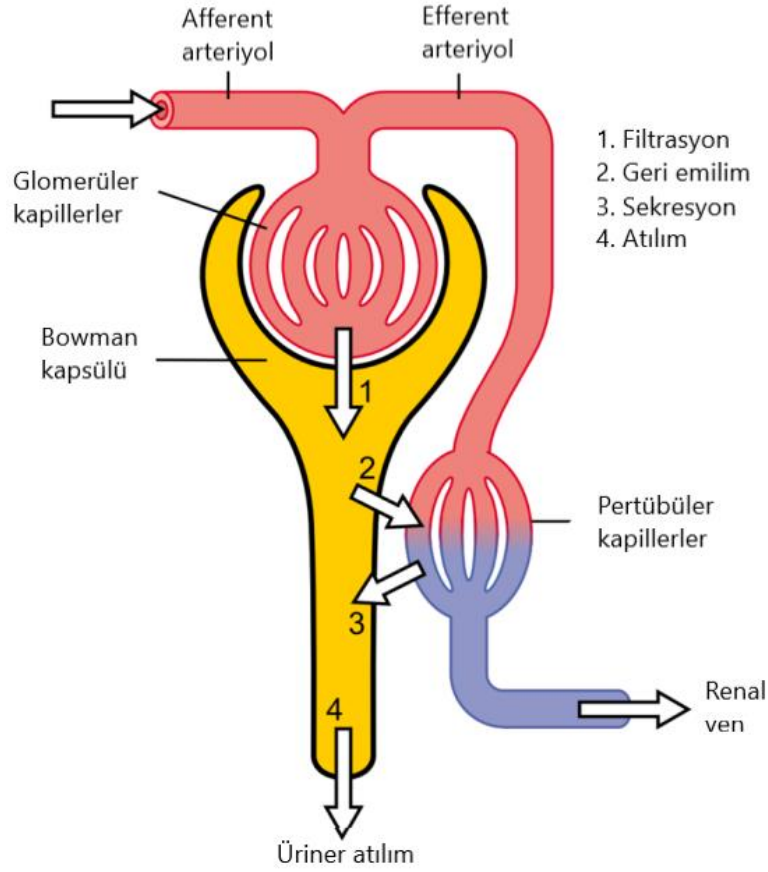


Şekil 2.3. Jukstaglomerüler aparat (JGA). (Jennings ve ark., 2020)'den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

2.1.2. Böbreklerin Fonksiyonları

Böbreklerin başlıca görevi vücut sıvılarını içeriğinin düzenlenmesi ve endokrin fonksiyonlardır. Şekil 2.4. böbreklerin temel fizyolojik mekanizmalarını özetlemektedir. Böbreğe gelen kan ilk olarak nefronun birincil kısmı olan glomerülde süzülür. Hücre ve proteinlerden arınmış kısım bir sonraki aşamada proksimal kıvrımlı tübüle ulaşır. Proksimal tübülde vücut için esansiyel maddeler geri emilerek dolaşıma kazandırılır. Ayrıca proksimal tübülün ikincil görevi olan tübüler sekresyon da bu aşamada meydana gelir. Sonraki aşamada Henle kulpunun inen ve çıkan kollarında su ve elektrolitlerin geri emilimi sağlanarak distal kıvrımlı tübülde filtrat artık son içeriğine ulaşır. Distal kıvrımlı tübülde ayrıca elektrolit ve asit-baz dengesinin sağlanması için birtakım hormonların salınımı gerçekleşir. Filtrat son aşamada toplayıcı kanallara gönderilir ve burada son

olarak su ve sodyum geri emilimleri kontrol edilerek renal fonksiyonlar tamamlanmış olur (Guyton ve Hall, 2005).



Şekil 2.4. Nefronun temel fizyolojik mekanizmaları. Filtrasyon, geri emilim, sekresyon ve atılımın basit şeması özetlenmiştir. Şekil, Wikimedia Commons web sayfasından alınarak Türkçeleştirilmiştir. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Physiology_of_Nephron.svg, Erişim tarihi: 17 Mayıs 2021)

Homeostazın sağlanmasında böbreklerin dört temel işlevi görülmektedir; *Sıvı-elektrolit homeostazının sürdürülmesi*: Böbrekler atılan su ve elektrolit oranı ile alınan miktarın bir denge halinde kalmasını sağlamaktadırlar. Diyetle alınan sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum gibi elektrolit düzeyleri değişken olduğundan, plazma-elektrolit dengesinin sağlanması hayati önem taşımaktadır. *Asit-baz homeostazının korunması*: Böbrekler akciğerlerle birlikte tampon işlevi görerek fazla asit oranlarının düşürülmesini ve asit-baz dengesinin korunmasını sağlamaktadır. *Metabolizma son ürünlerinin ve toksik bileşiklerin uzaklaştırılması*: Böbrekler vücutta meydana gelen metabolik son ürünlerin (üre, ürik asit, kreatinin vs.) ve suda çözünen yabancı kimyasal maddelerin atılmasında birincil görevlidir. *Hormonal fonksiyon*: Böbreklerde bazı hormonların sentezi, bazı hormonların

ise aktif hale getirilmesi gerçekleşmektedir. Bu bakımdan hem primer hem de sekonder endokrin organ olarak görülmektedir. Böbreklerde sentezlenen hormonlar arasında eritropoietin, renin gibi hormonlar yer almaktadır. Ayrıca böbreklerde D vitamini aktif formu olan, 1,25-dihidroksi D₃ oluşumu gerçekleşmektedir (Finco, 1997; Gürdöl, 2019).

2.2. Endoplazmik Retikulum Fonksiyonları ve Stresi

Endoplazmik retikulum (ER), proteinlerin katlanmasından, post-translasyonel modifikasyonlarından ve lipit biyosentezinden sorumlu (Görlach ve ark., 2006), zayıf çevresel değişimlerle ve hücre stresleriyle sinyal yollarını kontrol eden membranöz ağ yapısında önemli bir organdır (Ron ve Walter, 2007). ER hücre içinde birincil serbest kalsiyum depolama bölgesidir ve hücre içi kalsiyum homeostazisini sağlamaktadır (Inagi ve ark., 2014). Membran yapısına dahil olan ve ekstraselüler alana gönderilecek proteinlerin sentezi ER’de gerçekleştirilir ve N-glikozilasyon, oligomerizasyon, disülfid bağları, hidroksilasyon, gibi proteinlerin aktif yapılarının oluşma aşamaları, proteomun yaklaşık %30’unu oluşturan ve salgılanmak üzere sentezlenen proteinlerin doğru şekilde katlanması için çok önemlidir (Rutkowski ve Hegde, 2010; Hetz, 2012).

ER lümeni, içerisindeki iyon dengesi, sentez yükü gibi fizyolojik ve biyokimyasal seviyede meydana gelen değişimlere oldukça hassastır. Stres faktörlerinin neden olduğu hücre içi bozulmalar, ER’nin özelleşmiş ortamını bozar ve katlanmamış proteinlerin birikmesine neden olur (Chakrabarti ve ark., 2011). Enerji ya da besin eksikliği, anormal kalsiyum regülasyonu, viral enfeksiyonlar, hipoksi, serbest radikallere maruz kalma, aşırı kolesterol yükü gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylar protein katlanmasını değiştirebilir ve ER stresini indükleyebilir (Gombedza ve ark., 2019).

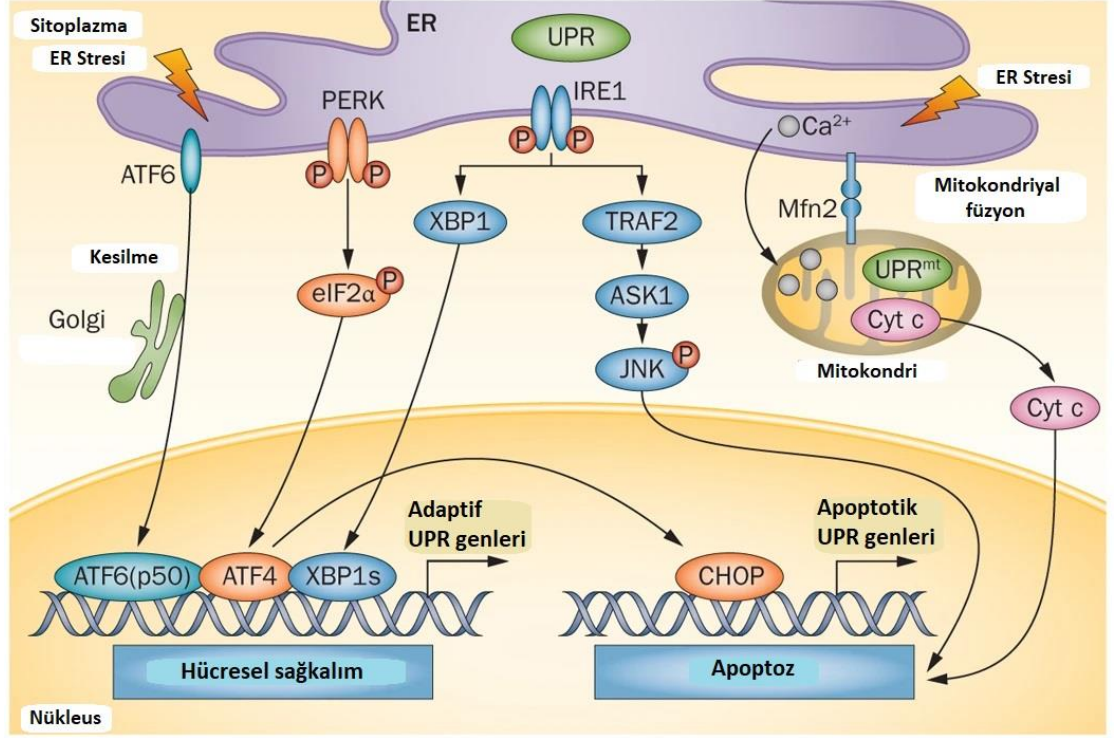
Yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikimi hücrelerde toksisite yaratmaktadır ve bu toksik etkiden dolayı hücrenin stresi hissetmesi, cevap vermesi ve azaltması gerekir. Uygun katlanma yeniden sağlanamaz ise yanlış katlanmış proteinler sitozole gönderilerek ER ilişkili protein yıkımı (ER associated protein degradation ERAD system) yoluyla işaretlenir ve ubiquitin ve proteozom aracılı parçalanma ile ortadan kaldırılır. ER sentez kapasitesinin aşılması durumunda katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler birikmeye devam eder ve bu durum “katlanmamış protein cevabı” (unfolded

protein response; UPR) mekanizmasının aktifleşmesine neden olur (Chakrabarti ve ark., 2011).

2.2.1. Katlanmamış Protein Cevabı (UPR)

Katlanmamış protein cevabı, ER stresi etkileri ile mücadele etmek için aktifleştirilen bir hücrel sinyal mekanizmasıdır. UPR üç temel mekanizma ile homeostazı düzenler; 1) katlanmamış proteinlerin tekrar katlanmasını sağlayan ER ile ilişkili şaperonları aktive ederek, 2) protein translasyonunu baskılayarak katlanmamış protein oluşumunu durdurarak ve 3) homeostaz sağlanamaz ve protein birikimi devam ederse çevre dokuya zarar vermemek adına hücreyi apoptozise yönlendirerek (Szegezdi ve ark., 2006).

Endoplazmik retikulumda bulunan katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler, ERAD makineleri tarafından sitoplazmaya geri transfer edilir ve proteozom tarafından parçalanır (Görlach ve ark., 2006). Fakat ERAD makinelerinin kapasitesini aşan miktarda protein sentezlendiğinde, katlanmamış proteinler ER’de birikir ve UPR, ER stresini azaltmaya yönelik olarak kompleks bir sinyalleşme mekanizması başlatır (Yoshida, 2007). Memeli hücrelerinde UPR sensörü olarak üç ER transmembran proteini tanımlanmıştır; aktive edici tanskripsiyon faktörü 6 (ATF6), inozitol gerektiren kinaz 1 (IRE1) ve protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK) (Chakrabarti ve ark., 2011) (**Şekil 2.5.**). Bu mediyatörler integral proteinlerdir ve ER lümeninde bir domaine ve downstream sinyal efektörlerini aktive eden sitozolik bir domaine sahiptirler (Rasheva ve Domingos, 2009). İyi işleyen “stressiz” bir hücrede bu üç transmembran protein GRP78 şaperonuna bağlı olarak inaktif halde bulunur (Hotamisligil, 2010).



Şekil 2.5. UPR sinyal mekanizmaları. ER stresi altında, UPR sensör proteinleri PERK ve IRE1, dimerizasyon ve sonrasında fosforilasyon ile, ATF6 ise Golgide restriksiyon enzimleri tarafından kesilerek aktif hale gelmektedir. (Inagi ve ark., 2014)'den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

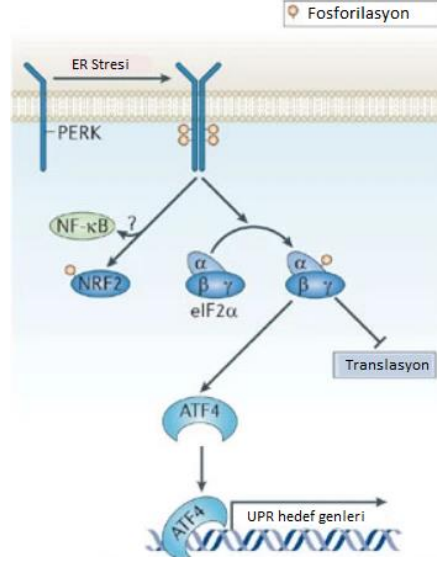
Glukozla düzenlenen protein 78 (GRP78), 78 kDa ağırlığında monomerik veya dimerik formda var olan, hücre yaşayabilirliğini korumak için birçok fonksiyona sahip bir proteindir (Düzgün ve ark., 2012). Sentezlenen proteinlerin ER'ye translokasyonunda, bir şaperon olarak protein katlanmasının sağlanmasında, katlanan proteinlerin kalite kontrollerinin sağlanmasında, yanlış katlanan proteinlerin yıkımında ve UPR yanıtlarının sağlanmasında önemli görevleri bulunmaktadır (Hebert ve Molinari, 2007). Oligomerik formu depolama şekli olup monomerik formda ise katlanmaya yardım ederek bir şaperon görevi görmektedir (Zhu ve Lee, 2015). GRP78 seviyeleri hücre içinde nispeten düşük seviyelerde tutulur. ER ve kalsiyum homeostazını etkileyen stresler altında seviyeleri önemli ölçüde artar (Casas, 2017).

2.2.2. Protein Kinaz RNA (PKR) Benzeri ER Kinaz (PERK) Sinyal Yoluğu

PERK yoluğu katlanmamış veya yanlış katlanmış protein birikimini takiben hem sağ kalım hem de pro-apoptotik sinyalleri başlatır (**Şekil 2.6.**). Ancak ana işlevi translasyonu modüle ederek protein sentezini genel olarak azaltmaktır (Chakrabarti ve ark., 2011). PERK, ER

lumeninde NH₂-terminal stres sensörü ve bir sitozolik protein kinaz bölgesinden oluşan, ER membranında lokalize Tip I transmembran serin treonin kinazdır. Stresiz bir hücrede GRP78'e bağlı olarak, inaktif ve monomerik formda bulunur (Zhang ve Kaufman, 2008). Endoplazmik retikulum, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikimi sonucu protein katlama kapasitesinin üzerinde bir yüke veya stres faktörlerine maruz kaldığı zaman, normal şartlarda PERK'e bağlı olan GRP78 ER lümenine protein katlanma kapasitesini arttırmak için gönderilirken, PERK kendisi ile dimerize olarak otofosforillenir. Aktive olan PERK'in C-terminal kinaz domaini, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α (eIF2 α)'yı serin 51'den fosforiller. Fosforillenen eIF2 α , hücre içinde genel translasyonu durdurur ve azalan translasyon, proteinlerin ER'de artışı engeller, bu sayede katlanması gereken protein yükü azalır (Randal J. Kaufman, 2002). Translasyonun zayıflamasının ardından biriken katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinler ERAD tarafından ER'den temizlenir ve sağkalım genlerinin ekspresyonu başlatılır (Harding ve ark., 1999; R. J. Kaufman, 1999). Bu genlerin en iyi bilinenlerinden biri olan transkripsiyon aktifleştirici faktör 4 (ATF4), eIF2 α 'nın başlattığı genel protein sentezi inhibisyonundan etkilenmez ve amino asit taşınması ve sentezi, glutatyon sentezi, redoks reaksiyonları ve protein sekresyonu gibi hayatta kalım yanlısı faktörleri kodlar (Ogen-Shtern ve ark., 2016). Böylece PERK aktivasyonu ile ER stresine karşı hücrenin protein yükü azaltılarak katlanmamış proteinlerin seviyelerinin azaltılması gerçekleştirilmiş olur.

ATF4, lösün fermuar transkripsiyon faktör (bZIP) ailesine mensup bir transkripsiyon faktörüdür ve transkripsiyonu süren ATF4, pro-apoptotik faktörlerin ekspresyonunu da indükleyebilir (Xu ve ark., 2005). ATF4, apoptotik hücre ölümü ile ilişkili transkripsiyon faktörü C/EBP homolog proteininin (CHOP) ekspresyonunu indükler (Urta ve ark., 2013). CHOP (GADD153 olarak da bilinir), bZIP ailesinden 29 kDa bir transkripsiyon faktörüdür. CHOP aktivitesi esas olarak B-hücresi lenfoma 2 (Bcl2) ekspresyonunun baskılanması ve hücrelerin ER stresini indükleyen ajanlara duyarlı hale gelmesiyle apoptozu teşvik eder (Oyadomari ve Mori, 2004). ATF4 ayrıca nükleusa geldiğinde büyüme aresti ve DNA hasarı ile indüklenebilir protein 34'ün (GADD34) transkripsiyonunu da indüklemektedir. GADD34, eIF2 α 'nın defosforilasyonuna neden olmaktadır ve bu şekilde ER stresi son bulduğunda translasyonun yeniden düzenlenmesi sağlanır ve UPR bazal duruma döner.



Şekil 2.6. Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK) sinyal yolağı. PERK, aktivasyonu sonrası genel protein sentezinin baskılanması için eIF2 α 'yı fosforile eder ve diğer bir yandan redoks metabolizmasında görev alan bir transkripsiyon faktörü olan NRF2 fosforile edilebilir. EIF2 α 'nın fosforilasyonu, otofaji, apoptoz, amino asit metabolizması ve antioksidan yanıtlarda görev alan genlerin transkripsiyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörünü kodlayan ATF4 mRNA'nın translasyonuna neden olur. (Hetz, 2012)'den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

Aktif PERK'in fosforillediği diğer bir protein ise nükleer faktör eritroid ilişkili faktör 2 (NRF2)'dir. NRF2'nin inflamasyon ile indüklenen oksidatif hasara karşı antioksidan proteinlerin ekspresyonunu regüle ettiği düşünülmektedir (Gold ve ark., 2012). Son olarak aktif PERK-eIF2 α etkisi sonucunda henüz tam olarak bilinmeyen mekanizmalar üzerinden nükleer faktör- κ B (NF- κ B) aktivasyonunun geliştiği gösterilmiştir (Fan ve ark., 2018). NF- κ B, proinflamatuvar yolların merkezi düzenleyicisidir ve aktivasyonu sonucu hücrede inflamasyonla ilişkili mediyatörlerin transkripsiyonları indüklenerek inflamasyon kaskatı meydana gelmektedir (Zhang ve Kaufman, 2008).

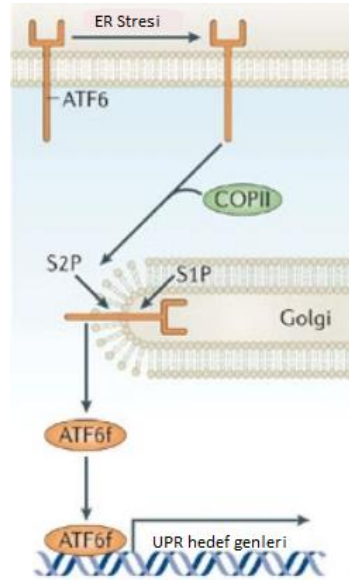
2.2.3. Aktive Edici Transkripsiyon Faktör 6 (ATF6) Sinyal Yolağı

Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) aktivasyonu, karmaşık bir dizi translokasyon ve geri dönüşümsüz proteolitik işlemleri içerir ve katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin varlığında sağ kalıma yönelik transkripsiyonel bir regülasyonu sağlar (Şekil 2.7.) (Chakrabarti ve ark., 2011).

ATF6, 90 kDa ağırlığında tip II ER transmembran proteinidir ve hücrede ER stresi olmadığı durumda GRP78'e bağlı olarak inaktif pozisyonda bulunur (Ariyasu ve ark.,

2017). Endoplazmik retikulum stresi, ATF6'nın N-terminalinden GRP78'in ayrılmasına neden olur ve serbest kalan ATF6 golgiye transloke olarak burada aktive olur (Randal J. Kaufman, 2002). ATF6 golgiye taşındıktan sonra düzenlenmiş intramembran proteolizine tabi tutulur; ilk olarak luminal domaini serin proteaz site-1 proteaz (S1Paz) ve ardından metaloproteaz site-2 proteaz (S2P) kesilmesi ile ayrılır (Lin ve ark., 2019). Bu kesilme ATF6'nın 50 kDa'luk transkripsiyonel alanının aktivasyonunu sağlar ve ER stres elemanları ile genlerin ekspresyonunun düzenlediği nükleusa taşınmasını sağlar (Chakrabarti ve ark., 2011).

Kesilmiş ATF6 ile GRP78, GRP94 gibi ER şaperon aktiviteleri ve katlanmamış proteinlerin degradasyonunu arttıran ERAD yolağı elemanları gibi gerekli ko-regülatörlerin gen ekspresyonları indüklenir. Ek olarak ATF6, aktif IRE1 ile şaperonların ekspresyonunu ve kontrol elemanlarını indükleyen X kutusu bağlayıcı protein 1'in (XBP1) ekspresyonunu indükler (Lin ve ark., 2019). Böylece ER katlanma kapasitesi artırılarak strese karşı bir korunma mekanizması gerçekleşmiş olur (Naidoo, 2009). Aktif ATF6'nın nükleusa translokasyonu ile GRP78, GRP94, CHOP, XBP1, kalretikulin ve protein disülfid izomeraz (PDI) gibi hedef genlerin aktivasyonu görülmektedir (Mei ve ark., 2013).



Şekil 2.7. Aktive edici transkripsiyon faktör 6 (ATF6) sinyal yolağı. ATF6, sitozolik domaininde bir Leu fermuar (bZIP) transkripsiyon faktöre sahiptir ve stressiz bir hücrede ER membranında lokalize olarak bulunmaktadır. ER stresine maruz kalan hücrelerde ATF6, COP kaplı protein II (COPII) aracılığıyla

Golgiye taşınır ve burada site 1 proteaz (S1Paz) ve site 2 proteaz (S2P) tarafından kesilir. Açığa çıkan sitozolik domain fragmenti, ATF6f, ERAD bileşenlerini ve XBP1'i kodlayan genlerin upregülasyonunu sağlar. (Hetz, 2012)'den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

2.2.4. Inositol Gerektiren Kinaz 1 (IRE1) Sinyal Yolağı

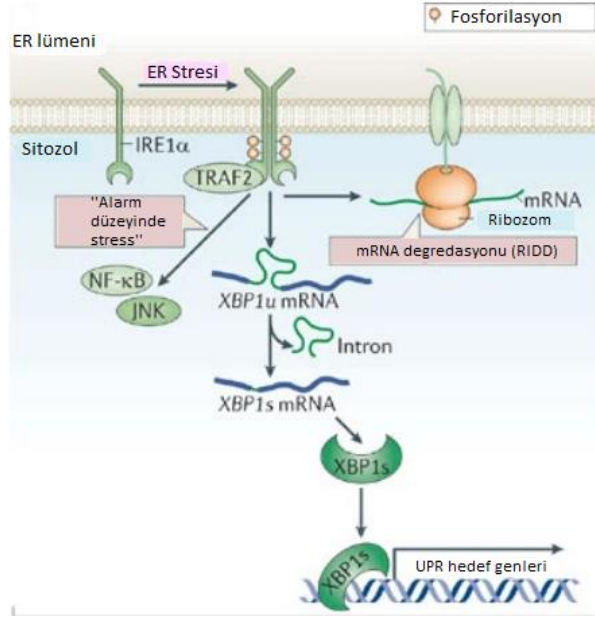
Inositol gerektiren kinaz 1 (IRE1), katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin varlığında hem sağ kalım hem de pro-apoptotik faktörleri içeren sinyal mekanizmalarını başlatır (**Şekil 2.8.**) (Chakrabarti ve ark., 2011).

IRE1 hem sitozolik domaininde endoribonükleaz hem de serin-treonin kinaz domainine sahip 100 kDa tip I ER transmembran proteinidir (Szegezdi ve ark., 2006). İki formu vardır; IRE1- α tüm hücrelerde bulunurken, β formu sadece intestinal epitelyal hücrelerde bulunmaktadır (Ron, 2002). ER lümeninde yer alan IRE1'in N-terminali, PERK ile benzer şekilde GRP78 ile etkileşimi yoluyla katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinleri algılar. Normal şartlar altında GRP78 IRE1'in N-terminaline bağlı halde bulunur, fakat katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin varlığında katlanmaya yardımcı olmak için IRE1'den ayrılarak lümeneye gider. Yapılan çalışmalarda IRE1'in ayrıca bir N-terminal peptid bağlayıcı domain ile GRP78'den bağımsız olarak katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinleri algılayabildiği gösterilmiştir (Bertolotti ve ark., 2000).

GRP78 ayrılması sonucu IRE1 homo-oligomerizasyon ve sonrasında C-terminal kinaz alanının otofosforilasyonu ile aktive olur. IRE1 aktivasyonu hem kinaz hem de endoribonükleaz aktivitelerinin iki ayrı sinyal eksenini aracılığıyla eşzamanlı olarak sinyal üretmesini sağlar. Endoribonükleaz aktivitesi sitoplazmada bulunan XBP1-mRNA'dan 26 nükleotit uzaklaştırır ve güçlü bir transkripsiyon faktörü olan 41 kDa sXBP1 üretir. Kırpılmış sXBP1, homodimerleri nükleer faktör Y (NF-Y) gibi yardımcı düzenleyicilerle birlikte çeşitli ER şaperonlarının, katlanmaya yardımcı enzimlerin ve ER ilişkili protein degradasyonuna bağlı genlerin ekspresyonunu düzenleyen oldukça aktif önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Chen ve Brandizzi, 2013). sXBP1 ile düzenlenen bu gen transkripsiyonlarının arttırılması ile hücrede uzun süreli ER stresi baskılanması sağlanmaya çalışılır.

Aktive edilmiş IRE1 α 'nın sitozolik domaini, geç-faz (alarm fazı) UPR sinyallerini üretir. Sitozolik IRE1 α dimerleri sinyal regüle edici kinaz (ASK1) aktivasyonunu ve daha sonra

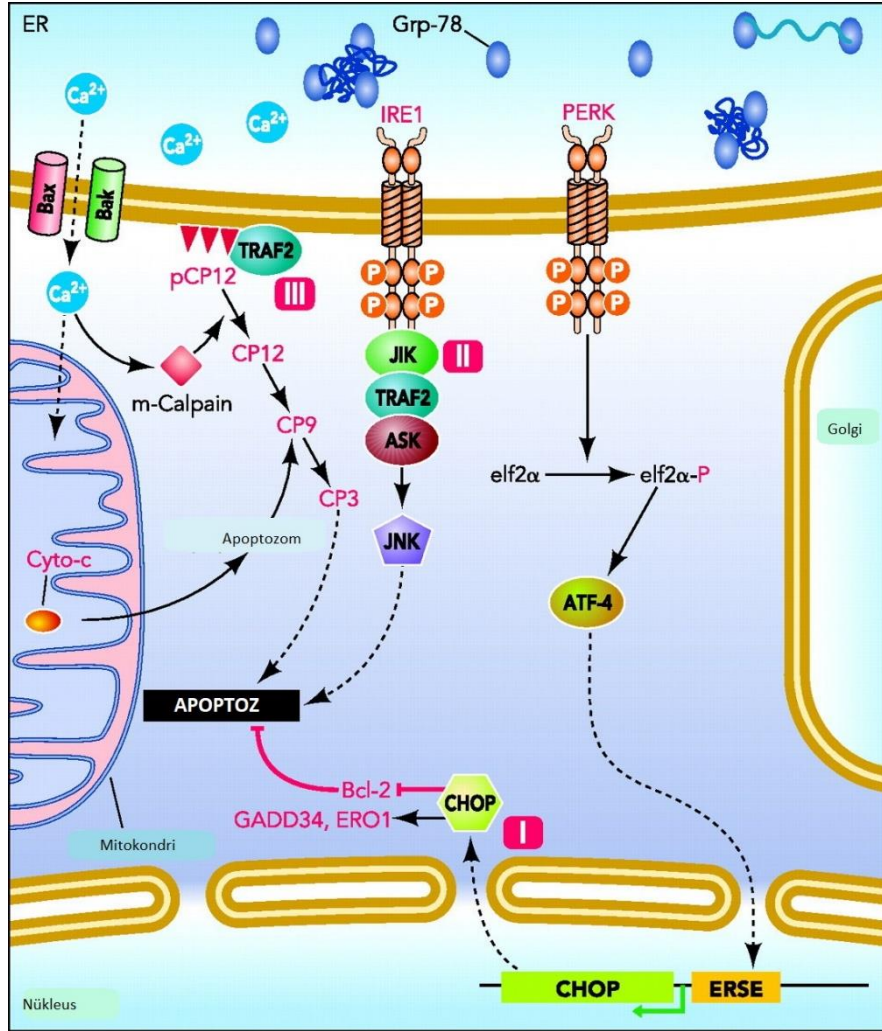
JNK ve p38 mitojen-aktif protein kinaz (p38MAPK) aktivasyonunu sağlamak için tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TRAF2) gibi reseptörlerle etkileşime girer. IRE1 α ayrıca NF- κ B yolağı gibi diğer kinazların aktivasyonunu gerçekleştirir. IRE1 α ile aktive olmuş JNK, pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonuna ve Bcl2'nin inhibisyonuna neden olur. Aktive olmuş pro-apoptotik proteinler sonrasında mitokondride kaspaz aktivasyonunu başlatırlar. Sonuçta Bcl2'nin inhibisyonu ve pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonu Bcl-2 ilişkili X protein/ Bcl-2 homolog antagonist proteine bağlı (BAX/BAK) apoptoza yol açar. Dolayısıyla IRE1 α 'nın sitozolik kinaz domaininden başlatılan sinyaller büyük ölçüde pro-apoptotiktir (Chen ve Brandizzi, 2013).



Şekil 2.8. Inositol gerektiren kinaz 1 (IRE1) sinyal yolağı. IRE1 α 'nın dimerizasyonu ve sonrasında otofosforilasyonu, RNAaz aktivitesini tetikleyerek mRNA kodlayan kesilmemiş X kutusu bağlayıcı protein 1'den (XBP1u) aktif transkripsiyon faktörü olan kesilmiş X kutusu bağlayıcı protein 1 (XBP1s) meydana gelmesini sağlar. XBP1s, protein katlanması, ER ile ilişkili degradasyon (ERAD), protein kalite kontrolü ve fosfolipid sentezinde yer alan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu kontrol eder. IRE1 α ayrıca regüle IRE1-bağlı bozunma (RIDD) yoluyla spesifik mRNA'ların degradasyonuna neden olur ve adaptör proteinlere bağlanarak JUN N-terminal kinaz (JNK) ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B) tarafından düzenlenenler de dahil olmak üzere birtakım 'alarm düzeyinde stres' yollarını indükler. (Hetz, 2012)'den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis

Tüm UPR yolları sonrasında ER homeostazı geri sağlanamazsa, hücreler otofaji veya apoptozis programlarını başlatırlar (Rasheva ve Domingos, 2009) (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. ER stresi sonucu meydana gelen apoptoz yolları. (Lai ve ark., 2017)'den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

ER stres sensörleri PERK, IRE1 ve sitozolik Ca^{2+} ER stresine maruz kalan hücrelerde otofajiyi başlatan efektörler olarak işlev görür. Bcl2'nin JNK1 aracılı fosforilasyonu sonucu Beclin-1'in ayrılması otofaji aktivasyonunu gerçekleştirir (Chakrabarti ve ark., 2011).

Ölüm programı olan apoptozun yaygın biyomarkerları, sistein-aspartat proteazlar olan kaspazlardır; apoptozis için kaspazların aktivasyonu gereklidir (Szegezdi ve ark., 2003). Kaspazlar hücrede inaktif zimojen formda bulunurlar ve proteoliz ile hücreyi hızla parçalarlar. Hücresel stres sonucu yanıt olarak kaspazlar zimojenlerinden aktive edilirler; ilk olarak başlatıcı kaspazlar kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivasyonu gerçekleşir. Bunu kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 gibi yürütücü kaspazların aktivasyonu izler (Momoi, 2004).

PERK ve IRE1 yolaklarının aktivasyonu, Bcl2 ekspresyonu ve aktivitesinin düzenlenmesi yoluyla stres kaynaklı apoptozu düzenler. Stres sinyalleri, Bax ve Bak gibi pro-apoptotik proteinlerin oligomerizasyonuna neden olur. Bu proteinler non-apoptotik koşullarda hayatta kalım proteini Bcl2 ile mitokondri dış membranında bağlı olarak bulunurlar. Bax ve Bak oligomerize olduklarında, mitokondriyal permeabilite geçiş por kompleksi (MPT) porlarını açarak membran bütünlüğünün bozulmasına ve sitokrom-c salınmasına neden olurlar (Aslan, Afsar, ve ark., 2021). Mitokondriden sitozole olan sitokrom-c akışı kaspaz-9 aktivasyon yolağının başlamasına neden olur (Momoi, 2004). Ayrıca ER stresine yanıt olarak Ca^{2+} iyonları ER'den sitozole salınır. Bu salınan Ca^{2+} iyonlarının mitokondri tarafından alınması yine kaspaz aktivasyonuna yol açar. Sitoplazmada Ca^{2+} konsantrasyonunun artması kalpaini aktive eder ve kalpain de pro-kaspaz 12'yi keserek aktifleştirir. Kaspaz 12, ER stresi ile indüklenen apoptozisin anahtar mediyatörüdür; kaspaz 9'u aktifleştirir ve kaskadı başlatmış olur (Szegezdi ve ark., 2003). Bununla birlikte ER stresi varlığında sfingomyelin metabolizmasında değişim olduğu ve seramid birikimi sonucunda apoptozisin meydana geldiği rapor edilmiştir (Lei ve ark., 2007).

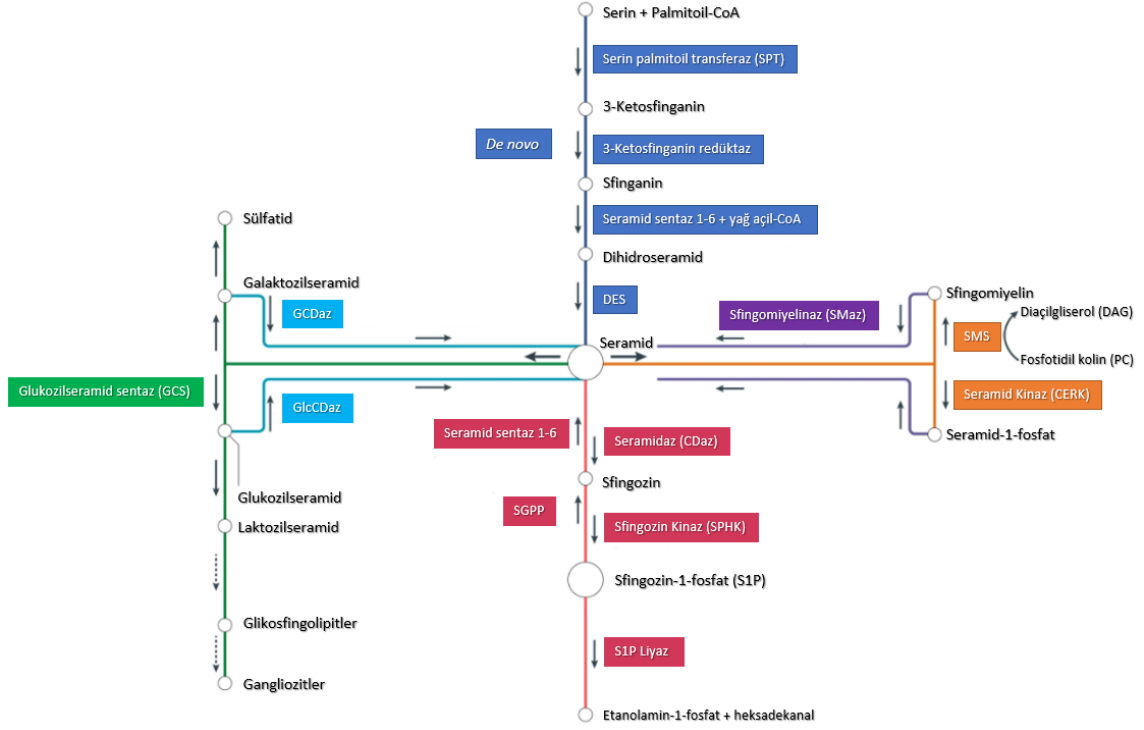
2.4. Sfingolipitler

Hücrede lipit sentezinin ana olarak gerçekleştiği yer ER'dir. Sfingolipit sentezinin ilk adımı ER'nin sitozolik kısmında başlar, sonrasında gerçekleşen ileri metabolizmalar ise golgide devam eder, bu bakımdan aktif sfingolipitlerin sentezi oldukça karmaşık ve kompleks birer yollar bütünüdür (Blom ve ark., 2011; Tidhar ve Futerman, 2013).

Sfingolipitler ökaryot membranlarının her noktasında bulunan bileşenlerdir ve uzun süre membran oluşumunda yalnızca yapısal rol oynadıkları düşünülmüştür (Wu ve ark., 2010). Bununla birlikte, mevcut çalışmalar sfingolipitlerin hücre proliferasyonu, farklılaşması, inflamasyonu ve apoptoz dahil olmak üzere birçok hücrel olayın düzenlenmesinde etkili olduğunu göstermiştir (El Alwani ve ark., 2006).

Sfingolipit metabolizmasının anlaşılmasında son zamanlardaki moleküler aydınlatma çalışmaları ve kütle spektrometrisi gibi analitik ölçümlerdeki teknik gelişmeler büyük önem taşımaktadır (Aslan, 2021).

Sfingolipit metabolizması seramid, sfingosin, sfingosin 1-fosfat, seramid 1-fosfat ve diğer birçok biyoaktif molekülün içeren kompleks yollardan oluşur (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. Sfingolipid metabolizması. (Öğretmen, 2018)'den uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

2.4.1. Seramid

Seramid, sfingolipit metabolizmasının merkezi olarak kabul edilir (Wu ve ark., 2010). Seramidler hücrede tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinler, ısı, radyasyon, hipoksi, ER stresi gibi çeşitli uyarıcılara yanıt olarak üretilmektedir. Birçok çalışma seramidin hücre büyümesi, farklılaşması, proliferasyonu, apoptozu ve inflamasyonu gibi diğer hücre yanıtını içeren birçok hücre sinyal yollarının bir mediyatörü olduğunu göstermiştir (El Alwani ve ark., 2006).

Seramid, bir yağ asidi zincirinin bağlı olduğu bir sfingoid bazın temel yapısına sahip bir molekül ailesini temsil etmektedir. Birçok seramid türü doymuş/doymamışlığı, yağ açıl zincir uzunluğu ve yağ asitlerinin (α)-N-bağlı hidroksilasyonu ile farklılık gösterir (Bikman ve Summers, 2011).

Seramid de novo olarak veya sfingomiyelinin veya diğer kompleks sfingolipitlerin hidrolizinden sentezlenebilir. De novo yolağında serin palmitoil transferaz (SPT) serin ve palmitoil-CoA kondenzasyonu ile seramid sentezinin hız sınırlayıcı basamağını katalizler. Bir dizi enzimatik reaksiyonun ardından dihidroseramid sentezlenir ve dihidroseramid desaturaz ile seramid elde edilir (Blom ve ark., 2011).

Sfingomiyelinazlar (SMaz), seramid ve fosfokolin sentezi için sfingomiyelinin hidrolizini katalizler. Asit, nötral ve bazik olmak üzere üç çeşit SMaz tanımlanmıştır. Bu enzimler optimum pH'larına, moleküler yapılarına ve bölgesel farklılıklarına göre adlandırılmıştır (Tani ve ark., 2007).

Seramid, ER'de üretilir ve daha sonra ileri metabolizması ve diğer sfingolipitlerin sentezi için sentez bölgesinden diğer subselüler bölgelere, özellikle golgiye taşınır. Seramidin seramid transfer proteini (CERT) ile golgiye transferinin, diaçilgliserol (DAG) oluşumu ile birlikte sfingomiyelin sentazlar (SMS) tarafından SM üretimi için esansiyel olduğu görülmüştür (Hanada, 2010). İki SMS geni tanımlanmıştır; SMS1 ve SMS2. SMS2 de novo SM sentezi için asıl enzim işlevi görmektedir (El Alwani ve ark., 2006).

2.4.2. Sfingosin

Seramidin amid bağının seramidazlar ile yıkılması sfingosin ve serbest yağ asitlerini üretir. Asit, nötr ve bazik olmak üzere üç tip seramidaz tanımlanmıştır. Hem nötr hem de bazik seramidazlar sfingosin ve S1P sentezinde önemli rol oynamaktadır (El Alwani ve ark., 2006). Sfingosin seramidazların katalizlediği reaksiyonlarla sadece seramiden üretilir ve önemli bir sinyal molekülü olarak protein kinazları ve diğer sinyal yollarını düzenleyerek hücre döngüsünün durmasını ve apoptozu indükler (Hannun ve Obeid, 2008).

2.4.3. Sfingosin 1-fosfat (S1P) ve Seramid 1-fosfat (C1P)

Fosforile sfingolipit metabolitleri S1P ve C1P güçlü biyoaktif moleküllerdir. Sfingosin, sfingosin kinazlar (SphK) için bir substrat ve S1P öncüsüdür. S1P, hücre yüzey reseptörleri için ligand görevi görür, ancak reseptörlerinden bağımsız olarak hücre içi etkiler de yapabilir. Hücre büyümesini ve sağkalımı teşvik ettiği için seramid etkilerine

karşıt etkilere sahiptir ve hücre içi sinyalleşmede, anjiyogenezde ve bağışıklık fonksiyonlarında rol oynar (Gomez-Munoz ve ark., 2013).

Sfingosin-1-fosfat, SphK1 ve SphK2 katalizi sonucu meydana gelir. Her iki enzim de sfingosini fosfatlayarak S1P eldesi sağlar fakat yapılan çalışmalarda bu enzimlerin hücre sağkalımı ve sfingolipit metabolizması üzerine farklı etkileri olduğu gösterilmiştir (Pyne ve ark., 2016).

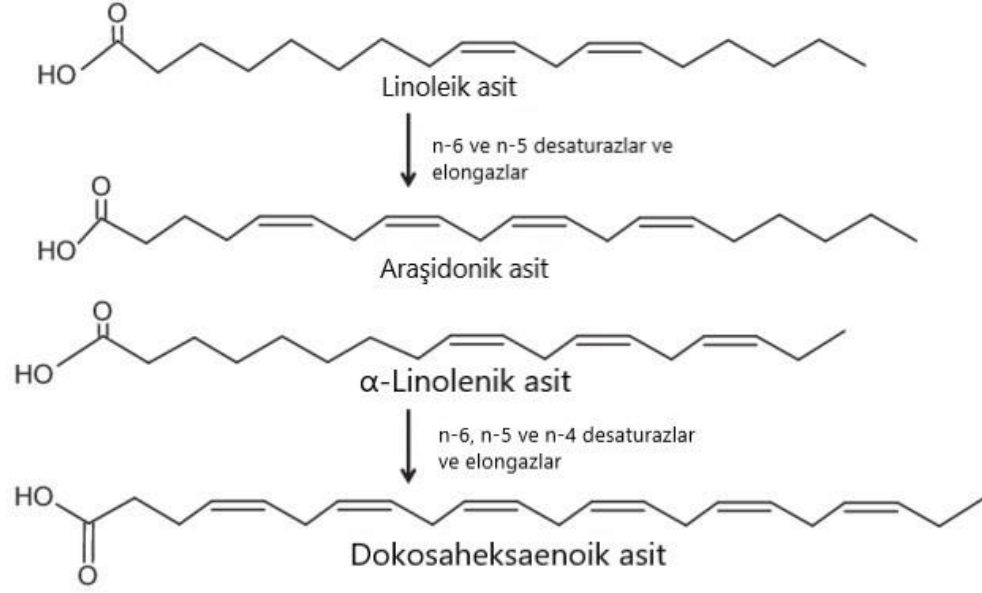
Sfingosin-1-fosfat liyaz, S1P'nin fosfoetanolin ve heksadekanole metabolize olmasını katalizlerken, S1P fosfataz S1P defosforilasyonunu ve sfingosin rejenerasyonunu katalizlemektedir (El Alwani ve ark., 2006).

Seramidin seramid kinaz (CERK) ile fosforillenmesi sonucu C1P üretilir. Seramid-1-fosfat, inflamatuvar yanıtın önemli düzenleyicilerinden biridir ve yapılan çalışmalarda, seramide antagonist bir şekilde, güçlü apoptoz inhibitörü ve hücre sağkalımının indükleyicisi olarak tanımlanmıştır (Gomez-Munoz, 2006).

2.5. Poliansature Yağ Asitleri (PUFA)

Yağ asidi zincirinde iki veya daha fazla doymamış çift bağa sahip olan uzun zincirli yağ asitlerine doymamış yağ asitleri (PUFA; polyunsaturated fatty acid) denir. PUFA'ların hidrokarbon zincir uzunluğu ve çift bağın zincirin neresinde bulunduğu biyolojik fonksiyonlarını belirlemede temel bir etkidir (Burr ve ark., 1973.) . PUFA'ların retinal, immünolojik, kardiyovasküler ve sinirsel sistemler başta olmak üzere birçok doku ve organ sistemi üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir (Jump, 2004). PUFA'lar ayrıca eikozanoidlerin sentezinde rol oynamaları nedeniyle inflamatuvar yanıt yollarında esansiyel işlevleri bulunmaktadır (Iwasaki ve ark., 2010.) . Esansiyel yağ asitleri olarak adlandırılan bazı PUFA'lar memelilerde sentezlenmemektedir ve diyetle alınmaları zorunludur. Bu PUFA'lar zincirde bulunan son çift bağın zincir sonu metil grubuna olan pozisyonuna göre omega-6 (n-6) ve omega-3 (n-3) olarak sınıflandırılırlar. İnsan vücudunda α -linolenik asit (ALA, 18:3) omega-3 yağ asidi ailesinin, linoleik asit (LA, 18:2) ise omega-6 yağ asidi ailesinin temel üyesidir. ALA n-3 ve LA n-6 PUFA'ların sentezinde öncül moleküllerdir.

İnsan vücudunda yağ asitlerinin karboksil karbonundan itibaren 9. karbonuna kadar olan karbonlara ancak çift bağ eklenebilmektedir; bu nedenle diyetle alınması zorunlu olan ALA ve LA'dan desaturasyon ve elongasyon işlemleri ile fizyolojik olarak önem taşıyan araşidonik asit (AA, C20:4n-6) ve dokosaheksaenoik asit (DHA, C22:6n-3) başta olmak üzere ileri PUFA'lar sentezlenir (Nelson ve Cox, 2017) (**Şekil 2.11**).

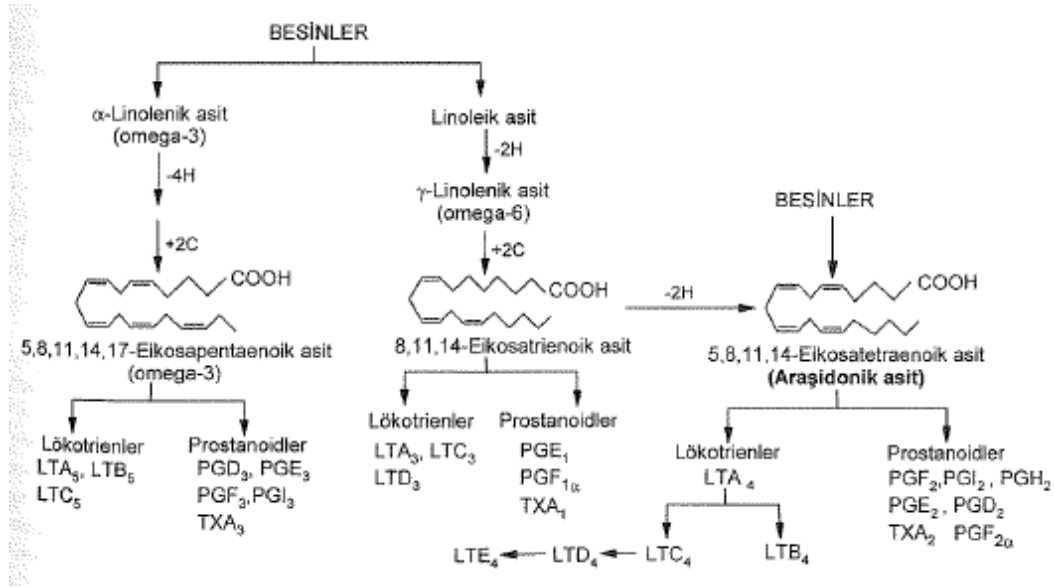


Şekil 2.11. ALA ve LA dönüşümü özeti. (Elsherbiny, 2013)'ten uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

2.5.1. Eikozanoidler

Eikozanoidler, neredeyse tüm canlı organizmalarında sentezlenebilen, kısa süreli etki göstererek biyokimyasal süreçlerde önemli fonksiyonları bulunan ve yapısında 20 karbon olan poliansatüre yağ asiti araşidonik asit (eikozatetraenoat) ile eikozapentaenoat ve eikozatrienoattan sentezlenen lipid türevi moleküllerdir. Eikozanoidler otokrin ve parakrin etki gösteren hormon benzeri yapılar olarak tanımlanmışlardır ve G protein üzerinden etki göstererek geniş çapta etki alanları bulunan bileşiklerdir (Murray ve ark., 2003).

Prostaglandinler (PG), tromboksanlar (TX) ve lökotrienler (LT) olmak üzere diyetle alınan esansiyel yağ asitlerinden üç farklı grup eikozanoid sentezi gerçekleşmektedir. En önemli sentez yolağı araşidonik asitten sentezlenen eikozanoidlerdir. Diğer sentez basamaklarının başlangıç moleküllerini ise γ -linolenik asit ve α -linolenik asit oluşturmaktadır (Gürdöl, 2019) (**Şekil 2.12**).



Şekil 2.12. Eikosanoidlerin sentezi (Gürdöl, 2019).

Eikozanoidlerin sentezlenebilmesi için öncül molekül olan araşidonik asitin membran fosfolipitlerinden salınması gerekmektedir. Araşidonik asit başlıca fosfolipaz A₂ (PLA₂) aktivitesi ile hücre membranından ayrılarak serbest hale geçmektedir. Fosfolipaz A₂ enzim ailesi çeşitli özelliklerine göre üç farklı şekilde sınıflanmıştır; bunlar sekretuar PLA₂ (sPLA₂), kalsiyumdan bağımsız PLA₂ (iPLA₂) ve sitozolik PLA₂ (cPLA₂) olarak isimlendirilmektedir. Genel olarak PLA₂ enzimleri fosfolipidlerde sn-2 pozisyonunda bulunan ester bağının hidrolizi ile serbest araşidonik oluşumunu sağlamaktadırlar (Ren ve ark., 2010).

Eikozanoidlerin sentezlenmesinde PLA₂ aktivitesi sonucu elde edilen araşidonik asit iki farklı yolak üzerinden metabolize olmaktadır. Siklooksijenaz (COX) yolağı ile prostaglandinler, prostasiklin ve tromboksan A₂ olmak üzere prostanoidler sentezlenmektedir. Lipooksijenaz (LOX) yolağı ile ise lökotrienler ve lipoksinlerin sentezi gerçekleşmektedir (Wall ve ark., 2010).

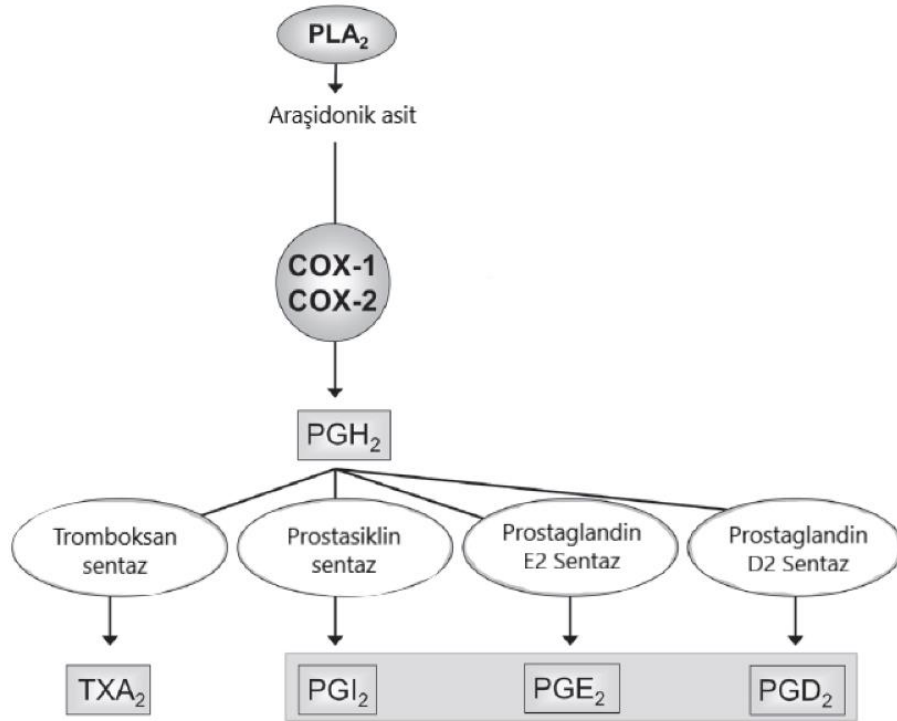
2.5.2. Siklooksijenaz (COX) Yolağı

Siklooksijenaz enzimleri ER ve nükleus membranında lokalize, hem grubu içeren integral proteinlerdir. İki izoenzim olarak incelenirler; COX-1 ve COX-2 çoğunlukla benzer yapıda enzimler olmalarına karşın COX-2 aktif bölgesi COX-1'den %20 oranında

fazladır. COX-1 birçok farklı dokuda bazal düzeyde sentezlenmektedir ve sağlıklı bir mide epitel, böbrek dokusu ve trombositlerin fonksiyonlarında yapısal rol oynar. Siklooksijenaz-2 ise uyarılma sonucu aktive olan bir enzimdir ve aktivasyonu inflamasyonu artırır (Morita, 2002).

Siklooksijenaz aktivitesi sonucu prostaglandinlerin sentezi için başlangıç molekülü olan prostaglandin H₂ (PGH₂) ilk olarak sentezlenir, bu bakımdan COX aynı zamanda prostaglandin H₂ sentaz olarak da adlandırılmaktadır. Oluşan PGH₂ kararsız bir moleküldür ve birçok farklı dokuda dokuya özgün olarak farklı prostanoidlerin oluşum enzimleri sayesinde ilgili moleküllere dönüşümü gerçekleşir (Nelson ve Cox, 2017) (Şekil 2.13).

Prostaglandin E₂, prostaglandin E₂ sentaz enzimi aktivasyonu ile tüm dokularda yaygın olarak PGH₂'den sentezlenen bir moleküldür. Hücrelerde gelişen inflamasyon sinyallerinde PGE₂ seviyelerinde genel olarak artış görülmektedir.



Şekil 2.13. Prostaglandin sentez yolları. (Resler ve ark., 2014)'ten uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.1.1 Hücre Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmamızda HEK-293 (ATCC® CRL-1573™) böbrek hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Virginia, USA) tarafından sağlanmıştır. Hücreler 1 X Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12; Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK) besiyeri ile çoğaltıldı. 500 ml'lik besiyeri içerisine son konsantrasyonu % 10 (v/v) olacak şekilde fetal bovin serum (FBS; Gibco, Life Technologies Corporation, Paisley, UK), % 1 (v/v) olacak şekilde 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin (Gibco, Life Technologies Corporation, Grand Island, USA) ve her 1 L besiyeri için 200 µl olacak şekilde Amfoterisin-B (Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK) eklendi. Hazırlanan karışım 0.22 µm bottle-top filtreden geçirilerek steril hale getirildi ve kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

3.1.2. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültür Başlangıcı

Hücreler 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren steril CO₂ inkübatöründe çoğaltıldı. Hücrelerin %80-90 yoğunluğa ulaşması 2-5 gün arasında gerçekleşti. Toplam canlı hücre sayısının ortalama değerine göre cm² başına 5000 hücre başlangıç yoğunluğu elde etmek için ne kadar hücre ekileceği hesaplanarak çoğaltma işlemleri gerçekleştirildi. Sıvı azot içerisinde muhafaza edilen donmuş hücre vialı çıkartılmadan önce hazırlanan besiyeri 37°C su banyosuna konuldu ve hücrelerin çoğalması için uygun sıcaklığa getirildi. Azot tankından çıkarılan hücre vialı 37°C su banyosunda hafifçe sallanarak 1-2 dakika içerisinde hızlı bir şekilde çözüldü ve dış yüzeyi %70 alkol ile silinerek laminar flow kabin içerisine alındı. Bundan sonra yapılan tüm işlemler sıkı aseptik koşullar altında gerçekleştirildi. 1 ml hücre vial içeriği tüpe aktarıldı ve üzerine osmatik şoku engellemek için damla damla 9 ml önceden ısıtılmış besiyeri eklendi. Hücreler 125 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve hücre pelletini dağıtmadan süpernatant atıldı. Uygun hacimde önceden ısıtılmış besiyeri ile hücreler resüspanse edildi ve ilgili hesaplamalar doğrultusunda kültür flasklarına aktarıldı. Hücre flaskı nazikçe hareket ettirildi ve hücrelerin flask yüzeyine eşit

bir şekilde dağılması sağlandı. Son olarak hücrelerin durumu mikroskop altında gözlemlendi ve 37°C CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

HEK-293 hücreleri %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında % 0,05 tripsin-EDTA (Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK) kullanarak tutundukları flasktan kaldırıldı ve yeni flasklara pasajlandı. Pasaj prosedürüne başlamadan önce yeterli miktarda besiyeri, tripsin-EDTA ve steril fosfat tampon salin (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 37°C su banyosuna konuldu ve hücrelerin çoğalması için uygun sıcaklığa getirildi. Pasajlanacak hücre flaskında hücrelerin morfolojisi ve yoğunluğu mikroskop altında gözlemlendi ve hücre flaskı % 70 alkol ile temizlenerek laminar flow kabin içerisine alındı. Bundan sonra yapılan tüm işlemler sıkı aseptik koşullar altında gerçekleştirildi. Öncelikle hücre flaskındaki kullanılmış besiyeri uzaklaştırıldı. Tripsin-EDTA'nın daha iyi etki gösterebilmesi için hücre flaskına 5-10 ml steril PBS eklendi ve flaskta birkaç dakika bekletilerek hücre atıklarının PBS ile tamamen temizlenmesi sağlandı. Hücreleri flasktan ayırmak için 25 cm² için yaklaşık 3 ml, 75 cm² için yaklaşık 9 ml önceden ısıtılmış tripsin-EDTA tüm flask yüzeyini kaplayacak şekilde eklendi. Flask en fazla 5 dakika 37°C CO₂ inkübatöründe bekletildi ve mikroskop altında tüm hücrelerin kalktığından emin olduktan sonra flaska eklenen tripsin-EDTA miktarının iki katı kadar besiyeri eklenerek tripsin-EDTA'nın inaktivasyonu sağlandı. Besiyeri eklendikten sonra steril pipet ile birkaç kez pipetleme yapılarak hücre kümelerinin birbirinden ayrılması sağlandı ve flask içeriği santrifüj tüpüne aktarılarak 125 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve hücre pelleti 10 ml önceden ısıtılmış besiyeri ile resüspanse edildi. Laboratuvarımızda bulunan Micro Counter 1300 (Celeromics Technologies, Grenoble, France) cihazı ile hücre sayımı yapıldı. HEK-293 hücreleri için cm² başına 2 x 10³- 6 x 10³ hücre olacak şekilde gerekli hesaplamalar yapıldı ve 25 cm²'lik flaska son hacim 5-7.5 ml, 75 cm²'lik flaska son hacim 15-22.5 ml olacak şekilde hücreler ekildi. Pasajlar tamamlandığında yeni alt kültür flaskları 37°C'de % 5 CO₂ ve % 95 nemlendirilmiş hava içeren steril CO₂ inkübatörüne kaldırıldı. Çalışmamız boyunca 3. ile 10. arası pasaj hücreleri kullanıldı.

3.1.4. Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hücrelerin bir kısmı sıvı azot tanklarında stoklandı. Dondurma işlemi için % 80-90 yoğunluğa ulaşmış HEK-293 hücreleri flasktan uygun protokole göre tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve 125 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve hücre pelleti % 5 (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO; Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA) içeren besiyeri ile resüspanse edildi. Hücre süspansiyonu, her bir vialde 1 ml olarak şekilde cryo viallere transfer edildi ve kademeli dondurma işlemi yapmak için vialler izopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) içeren dondurma kabına (freezing-container) konularak bir gece -80°C'de bekletildi. Sonrasında kalıcı depolanmaları için vialler sıvı azot tankına transfer edildi.

3.2. HEK-293 Hücrelerinde ER Stresi Oluşturulması

Çalışmamızda ER stresi, protein glikolizasyon inhibitörü tunikamisin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ile oluşturuldu. Tunikamisinin DMSO'daki çözünürlüğü 50 mM'dır. 10 mg tunikamisin 1 ml DMSO'da çözülerek 10 mg/ml TM stok çözeltisi oluşturuldu ve gerekli dilüsyonlar bu stok çözeltiden yapıldı. Tunikamisinin ER stresi oluşturmada optimum dozunu belirlemek için 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml dozları kullanıldı. Çalışmamızda 5 µg/ml TM dozu optimum doz olarak belirlendi.

3.3. TUDCA Doz Çalışması

Literatürde tunikamisin ile ER stresi oluşturulmuş HEK-293 hücrelerinde ER stres inhibitörü olarak tauroursodeoksikolik asit (TUDCA; EMD Millipore Corp. Billerica, MA, USA) uygulanan bir çalışma yoktur. Bu nedenle HEK-293 hücrelerine 5 mM- 0,156 mM doz aralığında TUDCA uygulandı ve hücre canlılığı testi ile TUDCA uygulamasının hücre canlılığına etkisi değerlendirildi. TUDCA'nın moleküler ağırlığı 521,7 g/mol, suda çözünürlüğü ise 100 mg/ml'dir. 5,2 mg TUDCA, 1 ml steril % 0,9 izotonik sodyum klorür çözeltisi içerisinde çözülerek 10 mM stok çözelti hazırlandı ve farklı TUDCA dozları bu stok çözeltiden seri dilüsyon ile hazırlandı.

3.4. Hücre Canlılığı Deneyi

Hücre canlılığı toz 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromit (MTT; Gold Biotechnology Inc., St. Louis, MO, USA) kullanılarak ölçüldü. MTT, çözünmeyen bir formazana indirgendiğinde mor renge dönen sarı bir tetrazolyum boyadır. Bu indirgenme,

hücrelerdeki NADH ve NADPH'ye bağımlı oksidoredüktaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir ve aktif oksidoredüktaz enzimlerinin seviyesi, hücrel metabolik aktiviteyi gösterir. Hücreden üretilen formazanın çözünmesinden sonra absorbans ölçülür ve hücrel metabolik aktivitenin artmış veya artmamış olduğunu belirlemek için kontrol grubu ile karşılaştırılır. Çalışmamızda 5 mg MTT tozu 1 ml 1 X PBS içinde çözüldü ve 0.22 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Hazırlanan bu çözelti 6 ay boyunca -20°C'de stabildir.

MTT analizi öncesi hücreler 96-well plakalara ekildi ve 1-2 gün tutunmaları beklendi. Tutunma sonrası 200 µl istenen konsantrasyonlarda uygulama medyumları eklendi ve 12-24-36 saat inkübasyon süreleri bitiminde karanlık odada MTT protokolüne başlandı. Grup başına en az 6 tekrar çalışıldı. İnkübasyon medyumunu çekildi ve her bir kuyucuğa 200 µl % 10 MTT çözeltisi eklendi. 96-well plaka karanlıkta 2 saat 37°C, % 5 CO₂ inkübatöründe bekletildi. İnkübasyon sonrası dipte mor renkli formazan kristallerinin oluştuğu gözlemlendi. Dikkatli bir şekilde üstteki sıvı uzaklaştırıldı her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. 5 dakika boyunca orbital shaker üzerinde formazan kristallerinin DMSO içinde iyi bir şekilde çözülmesi sağlandı. 570 ve 690 nm absorbanslarında mikropilaka okuyucuda (MicroQuant Plate Reader, Bio-Tek Instruments Inc. Vermont, USA) kolorimetrik olarak ölçüldü. 570 nm absorbans değerleri 690 nm absorbans değerlerinden çıkarıldı. Deney gruplarındaki formazan kristali oluşum miktarı, kontrol hücrelerine kıyasla % canlılık olarak ifade edildi.

3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda MTT analizleri sonucunda beş farklı deney grubu oluşturuldu. Kontrol grubu (sağlıklı HEK-293 hücreleri), ER stresi grubu (24 saat boyunca 5 µg/ml TM uygulanan HEK-293 hücreleri), DMSO grubu (TM çözünmesinde kullanılan 1µl/ml DMSO ile 24 saat boyunca inkübe edilen HEK-293 hücreleri), TUDCA grubu (12 saat boyunca 0,156 mM TUDCA ile inkübe edilen HEK-293 hücreleri), ER stresi + TUDCA grubu (24 saat, 5 µg/ml TM toksisitesinde 12 saatlik koruyucu doz olan 0,156 mM TUDCA ile inkübe edilen HEK-293 hücreleri).

3.6. İmmünfloresan Boyama

Hücrede ER stresinin geliştiğini gösteren protein belirteçleri arasında yer alan GRP78, apoptoz belirteçlerinden kesilmiş kaspaz-3 ve inflamatuvar yolak belirteçleri arasında gösterilen COX proteinlerinin ekspresyonu immünfloresan mikroskopi yöntemi ile gösterildi. Bunun için 8 chamber-slide Millipore, Cork, Ireland) içerisine kuyucuk başına yaklaşık 100.000 hücre olacak şekilde HEK-293 hücreleri ekildi. Hücrelerin tutunması için chamber slide gece boyunca 37⁰C, %5 CO₂ inkübatöründe bekletildi ve % 70 yoğunluğa ulaşmış hücrelerin besiyerleri her bir grup için belirlenen dozlardaki besiyerleri ile değiştirildi. İnkübasyon sürelerinin bitimini takiben chamber içerisindeki besiyeri çekildi ve 0,01 M soğuk PBS ile iki kez yıkama yapıldı. Oda sıcaklığında taze hazırlanmış % 4 paraformaldehit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ile 10 dakika fikse edilen hücreler üç kez soğuk PBS ile yıkama sonrasında 10 dakika boyunca PBS içerisinde hazırlanmış % 0,2 Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ile permeabilize edildi. Tekrar 5 kez soğuk PBS ile yıkama yapıldı ve bloklama için 30 dakika PBS içerisinde hazırlanmış % 5 normal goat serum (NGS; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ile inkübe edildi. Süre bitiminde bloklama çözeltisi çekildi ve yıkama yapılmadan hücreler bir gece boyunca kuyucuk başına 200 µl olacak şekilde anti-GRP78 (1:200, #ab21685 Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-kesilmiş kaspaz-3 (1:100, #9664, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) ve anti-COX-1 (1:200, #ab227513, Abcam, Cambridge, MA, USA) primer antikorları ile 4⁰C’de ve karanlıkta inkübe edildi. Bir sonraki gün chamber slidelar oda sıcaklığında 5 kez PBS ile yıkandı ve karanlık odada kuyucuk başına 200 µl olacak şekilde Alexa Fluor-488 konjuge goat anti-rabbit (1:300, # A11008 life Technologies, USA) sekonder antikoruna ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS ile 3 kez yıkama sonrasında chamber slide düzeneği ayrıldı ve slayt üzerine nükleus boyaması için birer damla DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) damlatılarak hava kabarcığı kalmadan bir lamel ile kapatma işlemi yapıldı. Slaytlar görüntü alınana kadar +4⁰C’de ve karanlıkta saklandı.

Slaytlar floresan mikroskop (Olympus IX81, inverted fluorescein microscope Tokyo, Japan) altında 20x büyütmede uygun filtreler kullanılarak görüntülendi. Elde edilen görüntülerden floresans yoğunluğu NIH ImageJ 1.53e yazılımı ile analiz edildi. Her bir grup için 20x büyüklüğündeki hücrelerin floresans ışına yayan bölgeleri çizilerek seçildi

ve Integrated Yoğunluk program vasıtasıyla belirlendi. Hücrelerin düzeltilmiş total floresans (CTCF) miktarlarını hesaplamak için ‘‘CTCF= Integrated Yoğunluk – (Seçilen hücrenin alanı x Background okumaları ortalaması)’’ formülü kullanıldı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.7. Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi

Kaspaz-3 aktivitesi hücre lizatlarından florometrik assay kit (Katalog #K105-200 BioVision Milpitas, CA, USA) kullanılarak ölçüldü. Analiz, DEVD (Asp-Glu-Val-Asp)-7-amino-4-triflorometik kumarin (DEVD-AFC) substratının parçalanmasının deteksiyonuna dayanmaktadır. DEVD-AFC $\lambda_{maks} = 400$ nm’de ışımaya yapmaktadır (mavi ışık) ve substratın kaspaz-3 ile parçalanması sonucu serbest AFC, bir florometre tarafından ölçülebilen $\lambda_{maks} = 500$ nm’de sarı-yeşil bir floresans ışması yayar. Örneklerden ölçülen AFC floresansı, indüklenmemiş kontrol grubu floresansı ile karşılaştırılarak kaspaz-3 aktivitesindeki değişim belirlendi. HEK-293 hücreleri 24 saat 1 μ l/ml DMSO, 24 saat 5 μ g/ml tunikamisin, 12 saat 0,156 mM TUDCA ve 24 saat 5 μ g/ml tunikamisin uygulaması süresince 12 saatlik 0,156 mM TUDCA ile inkübe edildi. Kontrol grubu yalnızca hücre medyumunu ile inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin bitiminde hücreler kit içeriğinde bulunan liziz tamponu ile toplandı ve hücre pelletleri homojenize edilerek 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi için her bir grubun protein konsantrasyon miktarları belirlendi ve çalışmada 200 μ g hücre lizatı kullanıldı. Kit prosedürü uygulandı ve örnekler 400 nm eksitasyon ve 505 nm emisyon ile florometrede okunarak kaspaz-3 aktivitesindeki artış, kontrol seviyesindeki artış ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.8. Sitolik Fosfolipaz A₂ (cPLA₂) Aktivitesinin Belirlenmesi

cPLA₂ aktivitesi cPLA₂ assay kit (Abcam, Cat No: ab133090, Cambridge, MA, USA) olan PLA₂ tarafından sn-2 pozisyonundaki araşidonil tiyoester bağının hidrolizi sonucu açığa çıkan serbest tiyol grubunun, DTNB (5,5’-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit) reaktifi ile bağlanması sonucu $\lambda_{maks} = 412$ nm’de absorban veren 5-tiyo-2-nitrobenzoik asitin kolorimetrik olarak ölçümüne dayanmaktadır. Enzim miktarı olarak tanımlanan bir ünite enzim aktivitesi 25⁰C’de 1 dakikada 1 μ mol araşidonil tiyo-PC hidroliz etmektedir.

HEK-293 hücreleri 24 saat 1 µl/ml DMSO, 24 saat 5 µg/ml tunikamisin, 12 saat 0,156 mM TUDCA ve 24 saat 5 µg/ml tunikamisin uygulaması süresince 12 saatlik 0,156 mM TUDCA ile inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde hücreler uygun yöntemlerle flasklardan kaldırıldı ve hücre pelletleri 1 ml soğuk PBS tamponu içerisinde yaklaşık $4-5 \times 10^6$ hücre olacak şekilde toplandı. Hücre pelletleri sonikasyon işleminden geçirildi ve elde edilen lizatlar 10.000 g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar ayrılarak kit prosedürü gerçekleştirilene kadar -80°C'de saklandı. Kit prosedürü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi ve 414 nm'de absorbans değerleri okundu. cPLA₂ aktivitesini hesaplamak için enzimatik olmayan kontrol kuyucuklarının ortalama absorbans değeri örneklerin absorbans değerlerinden çıkarıldı ve inkübasyon süresi olan 60 dakikaya bölündü. Böylelikle her örneğin 414 nm'deki absorbans değerleri elde edildi. Daha sonra elde edilen bu değerler DTNB için 414 nm'deki molar absorblama katsayısına ($10,66 \text{ mM}^{-1}$) bölündü. Sonuçlar ilgili dilüsyon faktörleri ile çarpıldı ve her bir örneğin protein konsantrasyonuna bölündü. cPLA₂ aktivitesi nmol/min/mg protein olarak ifade edildi.

3.9. Siklooksijenaz (COX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Siklooksijenaz aktivitesi florometrik assay kit (Cayman Chemical Cat No: 700200, Cat Ann Arbor, MI, USA) kullanılarak ölçüldü. Analiz, COX'un peroksidaz bileşenini kullanmaktadır. Araşidonik asitten örnekte bulunan COX aktivitesi sonucu elde edilen hidroperoksi endoperoksit (PGG₂) ve ADPH (10-asetil-3,7 dihidroksifenoksazin) arasındaki reaksiyon, oldukça floresan olan resorufin üretmektedir. Resorufin floresansı 530 nm eksitasyon ve 585 nm emisyon dalga boylarında analiz edilmektedir.

HEK-293 hücreleri 24 saat 1 µl/ml DMSO, 24 saat 5 µg/ml tunikamisin, 12 saat 0,156 mM TUDCA ve 24 saat 5 µg/ml tunikamisin uygulaması süresince 12 saatlik 0,156 mM TUDCA ile inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde hücreler uygun yöntemlerle flasklardan kaldırıldı ve hücre pelletleri 1 ml soğuk PBS tamponu ve proteaz inhibitör kokteyli (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) içerisinde yaklaşık $4-5 \times 10^6$ hücre olacak şekilde toplandı. Hücre pelletleri sonikasyon işleminden geçirildi ve elde edilen lizatlar 10.000 g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar ayrılarak kit prosedürü gerçekleştirilene kadar -80°C'de saklandı. Kit prosedürü belirtildiği şekilde

gerçekleştirildi ve 585 nm emisyon, 530 nm eksitasyon dalga boylarında florometrede okundu. Elde edilen örnek absorbansları background absorbanslarından çıkarılarak düzeltilmiş absorbans değerleri hesaplandı ve resorufin standart grafiğinden her bir örneğin florofor konsantrasyonları hesaplandı. Bir ünite COX aktivitesi 22⁰C'de ve bir dakikada 1 nmol floroforun dönüşümüne sebep olan enzim miktarıdır. Total COX aktivitesi her bir örnek için protein konsantrasyonlarına bölünerek nmol/min/mg protein olarak ifade edildi.

3.10. Prostaglandin E₂ (PGE₂) Seviyelerinin Belirlenmesi

HEK-293 hücre medyumlarından PGE₂ seviyeleri monoklonal bir ELISA kit (Cayman Chemical, Cat No:514010 Ann Arbor, MI, USA) kullanılarak ölçüldü. Analiz, sınırlı miktarda PGE₂ monoklonal antikor için PGE₂ ile bir PGE₂-asetilkolinesteraz (AChE) konjugatı (PGE₂-Tracer) arasındaki rekabete dayanmaktadır. PGE₂-tracer'ın konsantrasyonu sabit tutulurken örnekteki PGE₂ konsantrasyonu değiştiği için, PGE₂ monoklonal antikoruna bağlanabilen PGE₂-tracer miktarı kuyudaki PGE₂ konsantrasyonu ile ters orantılı olacaktır. Bu antikor-PGE₂ kompleksi, daha önce kuyuya bağlanmış olan goat-poliklonal anti-fare IgG'sine bağlanır. Plaka, bağlanmamış reaktifleri uzaklaştırmak için yıkanır ve ardından (AChE substratı içeren) Ellman Reaktifi kuyuya eklenir. Bu enzimatik reaksiyonun ürünü belirgin bir sarı renge sahiptir ve 412 nm'de güçlü bir absorbans verir. Spektrofotometrik olarak belirlenen bu rengin yoğunluğu, kuyuya bağlanan PGE₂-tracer miktarı ile orantılıdır ve bu, inkübasyon sırasında kuyuda bulunan serbest PGE₂ miktarı ile ters orantılıdır.

HEK-293 hücreleri 24 saat 1 µl/ml DMSO, 24 saat 5 µg/ml tunikamisın, 12 saat 0,156 mM TUDCA ve 24 saat 5 µg/ml tunikamisın uygulaması süresince 12 saatlik 0,156 mM TUDCA ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her gruptaki hücre kültürü medyumları toplandı. Analiz standart eğrisi için aynı hücre kültürü medyumunu kullanılarak standartların örnekler ile karşılaştırılabilir olması sağlandı. Kit prosedürü belirtildiği şekilde gerçekleştirildi ve 420 nm'de absorbanslar elde edildi. Her bir örnek için blank absorbanslar çıkarılarak düzeltilmiş absorbans değerleri hesaplandıktan sonra PGE₂ konsantrasyonları standart grafikten elde edildi. Sonuçlar protein konsantrasyonlarına bölünerek pg/ml olarak ifade edildi.

3.11 Sfingomiyelin ve Seramid Seviyelerinin Belirlenmesi

Seramid ve sfingomiyelin ölçümleri ultra-hızlı sıvı kromatografi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japonya) sistemine bağımlı LC-MS/MS (LCMS-8040 Shimadzu Corporation, Japonya) cihazı ile daha önce belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir (Özer ve ark., 2018). N-palmitoil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin (C16 SM), N-stearoil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin (C18 SM), N-lignoseroil-D-eritro-sfingosilfosforilkolin (C24 SM), N-palmitoil-D-eritro-sfingosin (C16 CER), N-stearoil-D-eritro-sfingosin (C18 CER), N-araşidoil-D-eritro-sfingosin (C20 CER), N-behenoil-D-eritro-sfingosin (C22 CER) ve N-lignoseroil-D-eritro-sfingosin (C24 CER) standartları Avanti Polar Lipids'ten (Alabaster, AL, USA), işaretli C16 CER d18:1/16:0 (Palmitoil-U-13C16) internal standart ise Cambridge Isotope Laboratories'ten (Andover, MA, USA) alındı. Her bir sfingolipid standart çözeltisi metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ile çözüldü ve 40°C'de sonikasyon işlemi ile hazırlandı. Ölçüm için ultra hızlı sıvı kromatografisi (UFLC) sistemine bağlı MS/MS kullanılarak optimize edilmiş çoklu reaksiyon izleme (MRM) metodu geliştirilmiştir. Kromatografik ayırmalar 60°C'de yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kolonu (XTerra C18, 2.1 mm X 50 mm, Waters, MA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sfingolipidler için akış hızı 0.450 ml/dk bir elüsyon gradientinde ve enjeksiyon volümü 10 µl olarak uygulandı.

Mobil faz A, su/asetonitril/ 2-propanol (8:1:1, v/v/v, 10 mM amonyum format ilavesiyle); Mobil faz B asetonitril/2-propanol (9:1 v/v, 10 mM amonyum format ilavesiyle) şeklinde hazırlandı. Gradient programı, solvent B % 65 (0-2 dk), % 90 (2.01-13 dk), % 100 (13.01-20 dk) ve % 65 (20.1-23 dk) şeklindedir. Sfingomyelin ve seramidler için kalibrasyon aralığı 39-625 ng/ml linear kalibrasyon aralığında optimize edildi ve örnek ölçüm süresi 30 dakika olarak ayarlandı. Pozitif elektro-sprey-iyonizasyon (ESI) modunda ölçüm yapıldı. Her bileşiğin MRM geçişleri ve yanıtları otomatik olarak optimize edildi. Tüm analiz edilen sfingolipidlerin pozitif ESI-MS mod ana ve ürün m/z değerleri aşağıdaki gibidir;

C16 SM, precursor m/z: 703.30, product m/z: 184.20

C18 SM, precursor m/z: 731.40, product m/z: 184.20

C24 SM, precursor m/z: 815.50, product m/z: 184.20

C16 CER, precursor m/z: 538.50, product m/z: 264.40

C16 CER *IS, precursor m/z: 554.30, product m/z: 264.30

C18 CER, precursor m/z: 566.30, product m/z: 264.40

C20 CER, precursor m/z: 594.60, product m/z: 264.50

C22 CER, precursor m/z: 622.60, product m/z: 264.40

C24 CER, precursor m/z: 650.40, product m/z: 264.30

3.12. Sfingolipid ve Seramid Kütle Spektrometrik Analizleri İçin Hücre Örneklerinin Hazırlanması

Uygun metodlar ile kaldırılıp ($4-5 \times 10^6$) pellet haline getirilen 500 µl HEK-293 hücre lizatları içerisine bir önceki çalışmada gösterildiği gibi (Afşar ve ark., 2020) 2 µl 5000 ng/ml IS stok çözeltisi eklendi ve üzerlerine 375 µl kloroform:metanol (1:2 v/v) ilave edildi. Örnekler 30 saniye sonikasyon uygulandı ve 100 µl distile su ilave edilerek 5 dakika vortekslendi. Elde edilen karışım 30 dakika boyunca oda ısısında bekletildi ve inkübasyon sonrası 2000 g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Süpernatantlara 125 µl kloroform ve 125 µl distile su ilave edildi, vortekslenip yeniden 30 dakika oda ısısında bekletildi. İnkübasyon sonrası yaklaşık 500 µl üst-organik tabaka yeni bir cam tüpe aktarıldı ve sabit bir azot akışı altında uçurma işlemi gerçekleştirildi (VLM, Bielefeld, Germany). Uçurma sonrası kurumuş kalıntılar 100 µl metanol:formik asitte (99,9:0,1) çözüldü ve tamamı insert viallere aktarılıp LC-MS/MS ölçümlerine hazır hale getirildi.

3.13. Yağ Asidi Seviyelerinin Belirlenmesi

Yağ asidi ultra-hızlı sıvı kromatografi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japonya) sistemine bağımlı LC-MS/MS (LCMS-8040 Shimadzu Corporation, Japonya) cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Aslan ve ark., 2013). AA (C20:4n-6), DGLA (C20:3n-6), EPA (C20:5n-3) ve DHA (C22:6n-3) standartları Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA) ve döteryum etiketli AA-d8 internal standardı (5,6,8,9,11,12,14,15-AA-d8) Santa Cruz

Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)'den temin edilmiştir. AA, DGLA, EPA, DHA ve AA-d8 standart solüsyonları analitik-grade metanol (Merck, Darmstadt, Germany) içinde çözülerek hazırlanmıştır. Optimize edilmiş çoklu reaksiyon izleme metodu (MRM), tandem kütle spektrometresi (MS/MS) ile kombine ultra hızlı sıvı kromatografisi (UFLC) kullanılarak geliştirilmiştir. UFLC sistem (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japan), LCMS-8040 üçlü kuadropol kütle spektrometresi (Shimadzu Corporation, Japan) ile kombine edilmiştir. Inertsil HPLC kolon (ODS-4, 2.1 x100 mm, 3µm; GL Sciences Inc. Tokyo, Japan) kullanılarak oluşturulan kromatografik ayrılma 40°C'de sürdürülmüştür. DHA, EPA, AA, DGLA gradient elüsyonu (akış hızı 0.45 ml/dakika) ile ayrılmaktadır. Mobil faz olarak kullanılan solvent A 10 mM amonyum asetat (Sigma-Aldrich.St. Louis MO, USA) ve solvent B asetonyitril (Sigma-Aldrich. St. Louis MO, USA)'den oluşmaktadır. Gradient programı solvent B, % 70 (0 dakika), % 90 (3 dakika), % 100 (3.01-4 dakika) ve % 70 (4.01-8 dakika) olarak uygulanmıştır. Negatif elektrosprey iyonizasyon (ESI) içindeki özgün bileşimler için MRM geçiş ve cevapları otomatik olarak optimize edilmiştir. AA, DHA, EPA, DGLA ve AA-d8 için negatif ESI-MS mod öncül ve ürün m/z değerleri aşağıdaki gibidir;

DGLA (C20:3n6), precursor m/z: 304.80, product m/z: 59.00 and 260.70

AA (C20:4n6), precursor m/z: 303.10, product m/z: 59.00 and 258.90

EPA (C20:5n3), precursor m/z: 301.10, product m/z: 59.10 and 256.70

DHA (C22:6n3), precursor m/z: 327.10, product m/z: 59.10 and 283.20

AA-d8, precursor m/z: 311.10, product m/ z: 59.10, 97.90 and 267.10

AA, DHA, EPA, DGLA 100 ng/ml-30 µg/ml lineer kalibrasyon aralığında optimize edilmiştir ve örnek analiz süresi 8 dakika olarak uygulanmıştır.

3.14. Yağ Asidi Kütle Spektrometrik Analizleri İçin Hücre Örneklerinin Hazırlanması

HEK-293 hücreleri önceki çalışmada belirtildiği gibi (Aslan ve ark., 2020) ($4-5 \times 10^6$) 1X PBS tamponunda sonike edildi ve 10.000 g'de 15 dakika 4°C 'de santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi ve analizler gerçekleştirilene kadar -80°C 'de saklandı. LC-MS/MS analizi için örnek hazırlamak üzere, 12 ml kapaklı cam tüplere 200 µl AA-d8 internal standart ve 200 µl hücre süpernatantı ilave edildi. Üzerine 1 ml asetonitril / % 37 Hidroklorik asit (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) karışımından ilave edilerek şişeler kapatıldı. (4:1 v/v asetonitril/hidroklorik asit). Örnekler ısıtıcı blok (VLM, Bielefeld, Germany) üzerinde 90°C 'de 2 saat boyunca inkübe edildi. Hidroliz edilen örnekler oda sıcaklığına soğutuldu ve 2 ml hekzan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ilave edilerek yağ asitleri ekstrakte edildi. 20 saniye vorteks işleminin ardından oda ısısında 5 dakika bekletildi ve 3000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek üst fazın % 75'i alındı. Bu örnekler oda ısısında yüksekliği ayarlanabilen gaz dağıtım ünitesi (VLM, Bielefeld, Germany) ile sabit azot akışı altında buharlaştırıldı. Uçurma sonrası kurumuş kalıntılar 200 µl metanol/distile su karışımında (180:20, v/v) çözüldü ve 0.2 µm politetrafloroetilen enjeksiyon filtreleri (Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, USA) ile filtreden geçirildi. Hazırlanan örnekler HPLC örnek şişelerine (Vertical Chromatography, Nonhaburi, Thailand.) koyularak LC-MS/MS analizleri yapıldı.

3.15. Protein Ölçümleri

HEK-293 hücre lizatlarında protein konsantrasyonları 595 nm'de modifiye Bradford yöntemiyle ölçüldü. Yöntemde standart olarak bovin serum albümin (BSA) ile Coomassie Plus reaktifi içeren ticari kit kullanıldı (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonu BSA standart grafiği yardımıyla hesaplandı.

3.16. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SigmaStat istatistiksel yazılımı, versiyon 3.5 (Sigma, St. Louis, MO, USA) ve GraphPad Prism yazılımı, Windows işletim sistemi için versiyon 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) kullanılarak yapıldı. Her bir ölçüm için istatistiksel analizler şekil ve tablo açıklamalarında belirtilmiştir.

SigmaStat ve GraphPad istatistik yazılımı ile grupları karşılaştırmak için öncelikle normalite testleri yapıldı. Testin geçmesi, verilerin normal dağılıma sahip bir popülasyondan alındığını ve beklenen modelle eşleştiğini göstermektedir. Örneklerden alınan veriler normal dağılıma sahip değilse, normalite testi başarısız oldu. Bu durumda parametrik olmayan bir test yapıldı. Deney grupları tek yönlü ANOVA ya da Kruskal-Wallis testleri ile karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldüğünde, tam olarak hangi grupların anlamlı olarak farklı olduğunu tespit etmek için post-hoc testleri olarak da bilinen çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı Analizi ve TUDCA'nın Koruyucu Etkinliğinin Değerlendirilmesi

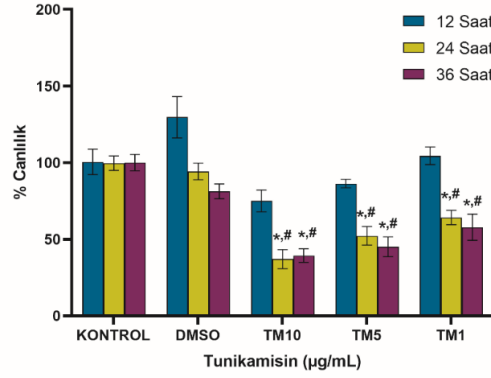
Tunikamisin ile indüklenen HEK-293 hücrelerinde doz bağımlı 36 saatlik hücre canlılığı analizi **Şekil 4.1.A**'da gösterilmiştir. Kontrol ve DMSO gruplarına kıyasla 12 saatlik 10, 5 ve 1 µg/ml TM uygulaması sitotoksosite göstermedi. Hücrelerin 24 ve 36 saat 10, 5 ve 1 µg/ml TM ile inkübasyonu, aynı zaman dilimlerinde kontrol ve DMSO gruplarına kıyasla hücre canlılığını anlamlı ölçüde azalttı. Benzer şekilde 24 ve 36 saatlik 10, 5 ve 1 µg/ml TM uygulaması, aynı doz konsantrasyonlarında 12 saatlik TM uygulamasına göre hücre canlılığını anlamlı olarak azalttı. TUDCA dozlarının (0,156-5 mM) hücre canlılığı analizi **Şekil 1.B**'de gösterilmiştir. Uygulanan TUDCA dozlarının 12 ve 36 saatlik zaman dilimlerinde hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü. 24 saat boyunca yüksek konsantrasyonlarda TUDCA (1,25-5 mM) ile muamele edilen hücreler, kontrole kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir azalma gösterdi.

Tablo 4.1, 24 saat boyunca TUDCA (0,156-5 mM) ve TM (1-10 µg/ml) birlikte uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisini göstermektedir. TM ve TUDCA'nın birlikte muamelesi, tek başına TM uygulamasına kıyasla hücre canlılığını arttırmadı. **Tablo 4.2**, TUDCA (0,156-5 mM), 24 saat TM (1-10 µg/ml) uygulamasından 12 saat önce uygulandığında elde edilen hücre canlılığı verilerini göstermektedir. Hücrelerin önce 12 saat boyunca TUDCA ile muamelesi, tek başına TM uygulamasına kıyasla hücre canlılığını arttırmadı.

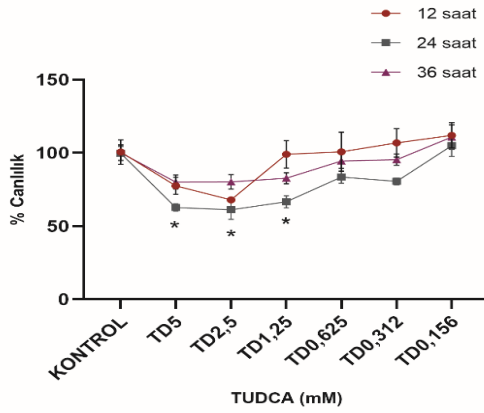
Şekil 4.1.C, 4.1.D ve 4.1.E, TM (1-10 µg/ml) uygulamasından 12 saat sonra TUDCA (0,156-5 mM) verildiğinde, toplam 24 saatlik bir TM inkübasyon süresinde MTT hücre canlılığı analizi sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlar, 24 saatlik inkübasyon süresinde 5 µg/ml TM uygulaması ile ER stresinin indüklenmesinden 12 saat sonra düşük doz TUDCA (0,156 mM) verildiğinde hücrelerde koruyucu bir etki görüldüğünü doğrulamaktadır. **Şekil 4.1.F**, TM ve TUDCA uygulamasının HEK-293 hücreleri üzerindeki morfolojik değişikliklerini göstermektedir. 24 saat boyunca 1 µl/ml DMSO veya 12 saat ,156 mM TUDCA ile muamele edilen hücreler, önemli morfolojik

değişiklikler göstermezken, 24 saat 5 µg/ml TM ile muamele edilen hücreler küçülme, agregasyon, yüzeyden ayrılma ve yuvarlaklaşma gibi değişimler gösterdi. TM grubunda hücre popülasyonunda da bir azalma belirgin olarak gözlemlendi. 12 saat, 5 µg/ml TM uygulamasından sonra 12 saat, 0,156 mM TUDCA uygulamasının TM ile ilişkili morfolojik bozulmaları azalttığı görüldü.

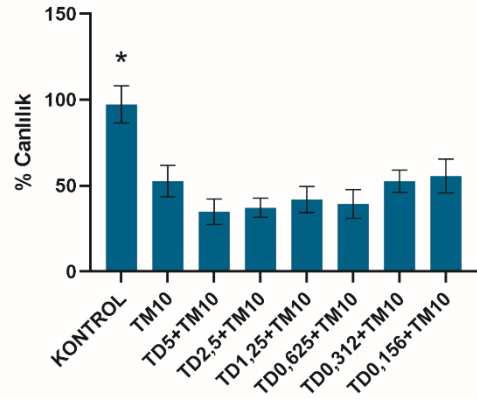
A)



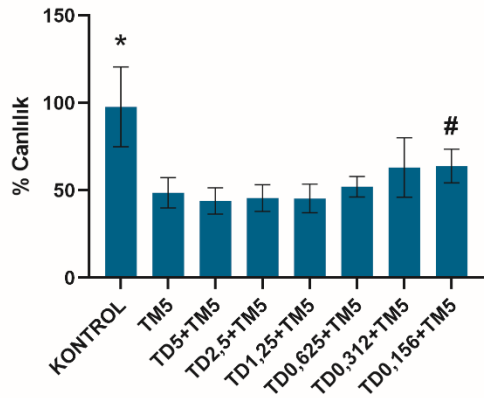
B)



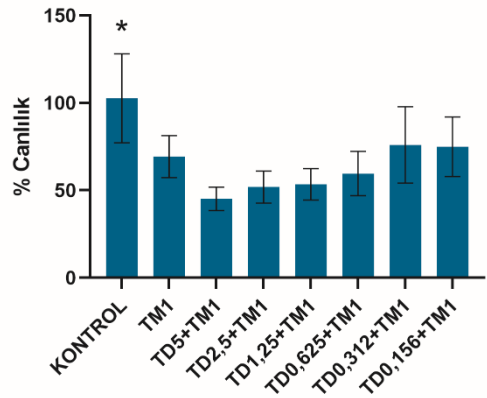
C)



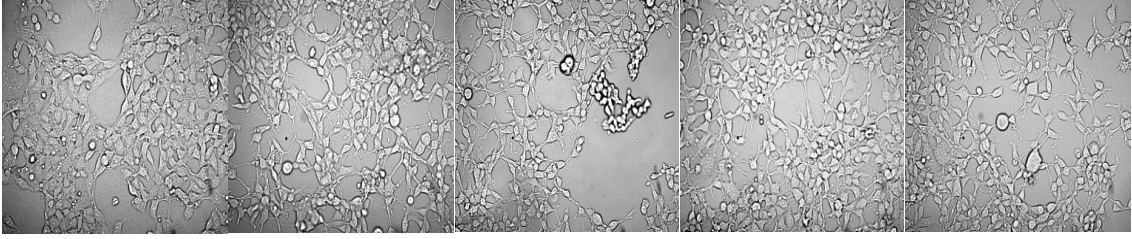
D)



E)



F) KONTROL DMSO TM TUDCA TM+TUDCA



Şekil 4.1. HEK-293 hücrelerinde MTT analizi ile hücre canlılığının değerlendirilmesi. **A)** 12-36 saatlik hücre canlılığı analizi. DMSO, dimetil sülfoksit (1µ/ml) ile muamele edilmiş hücreler, TM10, TM5 ve TM1, 10 µg/ml, 5 µg/ml ve 1 µg/ml tunikamisin ile muamele edilmiş hücreler. Veriler 7-8 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0,05, kontrol ve DMSO grupları ile aynı zaman dilimleri karşılaştırıldığında. #, p<0,05, aynı doz aralığında 12 saat ile karşılaştırıldığında. Tunikamisin'in hiçbir dozu 12 saatlik inkübasyonda toksisite oluşturmadı. **B)** TUDCA'nın 12-36 saatlik zaman sürecinde hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı etkisi. Veriler 7-8 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz çift yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0,05, kontrol ile 24 saat zaman diliminde karşılaştırıldığında. 12 saat ve 36 saat gruplarında TUDCA dozlarının aynı saat dilimlerinde kontrole göre karşılaştırıldıklarında toksisite görülmemiştir. **C)** 24 saat, 10 µg/ml TM toksisitesinde 12 saatlik TUDCA (TD) uygulamasının koruyucu etkinliği gözlemlenmedi. 10 µg/ml TM uygulamasından 12 saat sonra 5-0,156 mM TD uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 24 saat. Veriler 11-12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunnett's T3 çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, p<0,05, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **D)** 24 saat, 5 µg/ml TM toksisitesinde 12 saatlik 0,156 mM TD uygulamasının koruyucu etkinliği gözlemlendi. 5 µg/ml TM uygulamasından 12 saat sonra 5-0,156 mM TD uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 24 saat. Veriler 11-12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunnett's T3 çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, p<0,05, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, p<0,05, TM5 grubu ile karşılaştırıldığında. **E)** 24 saat, 1 µg/ml TM toksisitesinde 12 saatlik TD uygulamasının koruyucu etkinliği gözlemlenmedi. 1 µg/ml TM uygulamasından 12 saat sonra 5-0,156 mM TD uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 24 saat. Veriler 11-12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunnett's T3 çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, p<0,05, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. **F)** Tunikamisin ve TUDCA uygulanan HEK-293 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü (20X büyütme). Hücreler 24 saat DMSO (1µl/ml) uygulaması sonucu bir değişim göstermezken, 24 saat 5 µg/ml TM uygulaması sonucunda küçülme, kümelenme, yüzeyden ayrılma ve yuvarlaklaşma gibi morfolojik değişimler gösterdiler. TM grubunda hücre popülasyonunda da bir azalma kaydedildi. 12 saat 0,156 mM TUDCA uygulamasının, TM'ye bağlı morfolojik bozulmaları azalttığı gözlemlendi.

Tablo 4.1. TM ve TUDCA'nın 24 Saat Boyunca Birlikte Uygulanması Sonrası Hücre Canlılığı. Hücreler 24 saat TUDCA (TD; 0,156-5 mM) ve TM (1-10 µg/ml) ile birlikte muamele edildi. Veriler 11-12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunnett's T3 çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0,05, tüm grupları ile karşılaştırıldığında.

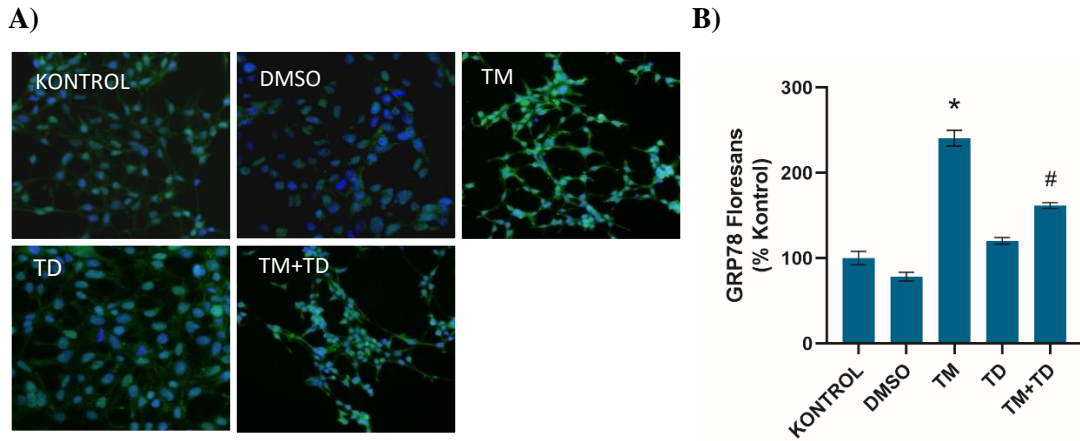
GRUPLAR	TM (1 µg/ml)	TM (5 µg/ml)	TM (10 µg/ml)
KONTROL	100.3 ± 19.80 *	100.0 ± 13.30 *	99.82 ± 18.19 *
TM	42.63 ± 10.31	49.74 ± 11.31	60.92 ± 17.05
TD 5 mM + TM	24.50 ± 2.94	22.61 ± 4.34	18.16 ± 4.09
TD 2,5 mM + TM	23.61 ± 7.35	23.64 ± 5.90	19.21 ± 5.25
TD 1,25 mM + TM	19.13 ± 4.51	19.82 ± 6.75	19.74 ± 4.72
TD 0,625 mM + TM	21.98 ± 8.02	19.09 ± 9.69	20.86 ± 8.51
TD 0,312 mM + TM	32.68 ± 12.98	28.22 ± 5.38	41.96 ± 15.26
TD 0,156 mM + TM	52.80 ± 11.97	46.79 ± 11.45	35.59 ± 10.95

Tablo 4.2. 24 Saatlik TM Muamelesinden 12 Saat Önce TUDCA Uygulanması Sonucu Hücre Canlılığı. 24 saatlik TM (1-10 µg/ml) muamelesinden 12 saat önce TUDCA (TD; 0,156-5 mM) uygulandı. Veriler 11-12 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunnett's T3 çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0,05, tüm grupları ile karşılaştırıldığında.

GRUPLAR	TM (1 µg/ml)	TM (5 µg/ml)	TM (10 µg/ml)
KONTROL	102.9 ± 22.30 *	99.61 ± 22.44 *	99.53±16.90 *
TM	63.16 ± 15.97	44.55 ± 12.21	33.35±5.75
TD 5 mM + TM	48.08 ± 8.48	27.23 ± 7.79	18.58±4.17
TD 2,5 mM + TM	41.83 ± 9.96	23.24 ± 5.91	16.34±5.09
TD 1,25 mM + TM	33.55 ± 9.79	28.24 ± 6.46	24.42±5.19
TD 0,625 mM + TM	37.84 ± 13.13	32.58 ± 9.37	30.98±9.63
TD 0,312 mM + TM	52.05 ± 15.65	44.25 ± 16.80	31.08±9.60
TD 0,156 mM + TM	59.28 ± 17.75	46.88 ± 10.36	39.09±11.97

4.2. ER Stresinin İndüklenmesi

ER stresi gelişen hücrelerde glukozla düzenlenen protein-78 kd seviyeleri artmaktadır, bu nedenle ER stresinin indüklendiğini göstermek için HEK-293 hücrelerinde GRP78 immüno Floresans boyaması yapıldı. **Şekil 4.2.A ve 4.2.B**, sırasıyla GRP78 immün boyaması ve kantitasyonunu göstermektedir. Diğer gruplara kıyasla TM ile muamele edilmiş hücrelerde GRP78 seviyelerinin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. ER stresinin başlamasından 12 saat sonra TUDCA uygulaması, TM + TUDCA ile muamele edilen hücrelerde GRP78 protein düzeylerini anlamlı olarak düşürdü.



Şekil 4.2. HEK-293 hücrelerinde GRP78 immüno Floresans düzeyleri. DMSO, 24 saat 1 µl/ml dimetil sülfoksit ile muamele edilen hücreler; TM, 24 saat 5 µg/ml tunikamisin ile muamele edilmiş hücreler; TD, 12 saat 0,156 mM TUDCA ile muamele edilmiş hücreler; TM+TD, 24 saat 5 µg/ml tunikamisin toksisitesinde 12 saatlik 0,156 mM TUDCA uygulaması. TM uygulamasından 12 saat sonra 0,156 mM TD uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 24 saat. **A)** HEK-293 hücrelerinde GRP78 temsili immüno Floresan boyama görüntüleri. **B)** GRP78 floresan boyamasının ImageJ programı ile kantitasyonu. Veriler 15 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunnett's T3 çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, p<0,001, tüm gruplar ile karşılaştırıldığında. #, p<0,001, kontrol, DMSO ve TD grupları ile karşılaştırıldığında.

4.3. Sfingolipid Düzeyleri

HEK-293 hücrelerinde ölçülen endojen sfingolipid düzeyleri **Tablo 4.3**'te verilmiştir. Gruplar arasında sfingomiyelin düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmedi. Benzer şekilde, gruplar arasında C16, C20 ve C22 seramid seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı. C18 ve C24 seramid seviyeleri diğer gruplara kıyasla TM ile muamele edilen hücrelerde anlamlı olarak arttı. Sfingosin-1-fosfat seviyeleri, kontrole göre karşılaştırıldığında TM uygulanan hücrelerde anlamlı olarak azaldı. ER stresinin başlamasından 12 saat sonra TUDCA uygulaması, TM + TUDCA ile muamele edilen

hücrelerde C18 ve C24 seramid seviyelerini anlamlı olarak düşürdü ve S1P seviyelerini anlamlı olarak arttırdı.

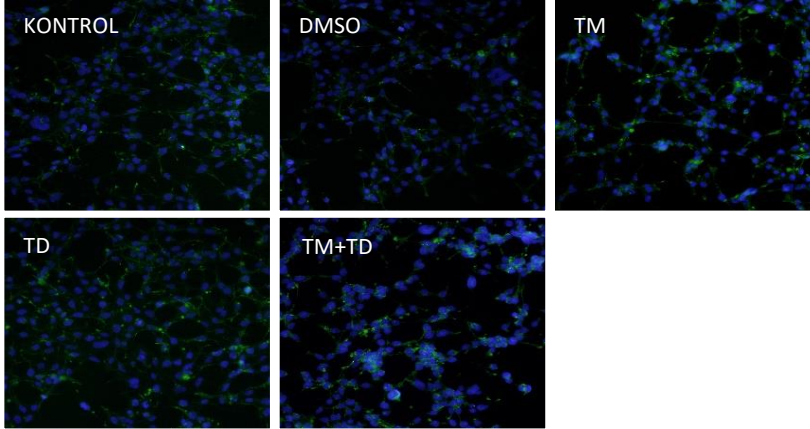
Tablo 4.3. HEK-293 Hücrelerinde Sfingolipid Düzeyleri. Tüm değerler ortalama \pm SD'dir. SM, sfingomiyelin; S1P, sfingosin-1-fosfat; DMSO, 24 saat 1 μ g/ml dimetil sülfoksit uygulanan hücreler; TM, 24 saat 5 μ g/ml tunikamisin uygulanan hücreler; TD, 12 saat 0,156 mM TUDCA uygulanan hücreler; TM+TD, 24 saat 5 μ g/ml tunikamisin toksisitesinde 12 saatlik 0,156 mM TUDCA uygulaması. TM uygulamasından 12 saat sonra 0.156 mM TD uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 24 saat. İstatistiksel analiz Tek Yönlü Varyans Analizi veya Kruskal-Wallis sıralamalı tek-yönlü varyans analizi ile yapıldı ve tüm ikili çoklu karşılaştırma prosedürleri Tukey testi ile gerçekleştirildi. *, $p < 0,001$, kontrol, DMSO, TD ve TM + TD'ye karşı. ** $p < 0,05$, kontrol grubuna karşı.

Sfingolipid (ng/mg protein)	KONTROL (n=8)	DMSO (n=8)	TM (n=8)	TD (n=8)	TM+TD (n=8)
16:0 SM (d18:1/16:0)	1038,82 \pm 59,49	948,98 \pm 96,67	962,59 \pm 192,72	1069,71 \pm 165,35	1033,01 \pm 71,09
18:0 SM (d18:1/18:0)	306,69 \pm 27,31	312,16 \pm 30,36	301,41 \pm 22,85	311,65 \pm 33,75	296,59 \pm 26,16
24:0 SM (d18:1/24:0)	339,12 \pm 55,49	360,78 \pm 19,52	364,16 \pm 16,93	381,11 \pm 26,91	353,19 \pm 15,50
C16 Seramid (d18:1/16:0)	182,90 \pm 20,90	176,60 \pm 20,54	185,41 \pm 19,76	183,44 \pm 24,79	186,66 \pm 8,43
C18 Seramid (d18:1/18:0)	119,42 \pm 8,29	113,06 \pm 14,52	161,33 \pm 9,65*	117,69 \pm 14,49	104,66 \pm 7,33
C20 Seramid (d18:1/20:0)	41,28 \pm 1,42	38,26 \pm 4,98	39,63 \pm 1,92	40,19 \pm 1,89	41,87 \pm 6,90
C22 Seramid (d18:1/22:0)	105,55 \pm 7,45	111,11 \pm 2,40	115,06 \pm 9,81	108,28 \pm 10,92	109,48 \pm 4,88
C24 Seramid (d18:1/24:0)	367,18 \pm 71,27	378,16 \pm 15,95	600,08 \pm 15,30*	359,77 \pm 20,50	377,26 \pm 6,56
S1P	4,84 \pm 1,72	4,21 \pm 0,60	2,77 \pm 0,68**	4,02 \pm 0,76	3,97 \pm 1,30

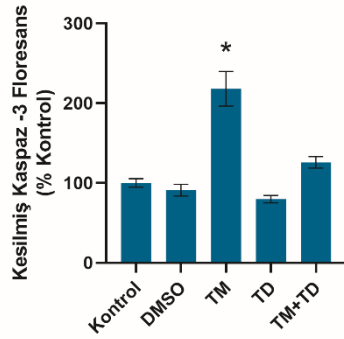
4.4. Kaspaz-3 Aktivitesi

Şekil 4.3.A ve 4.3.B, sırasıyla kesilmiş kaspaz-3 immün boyaması ve kantitasyonunu göstermektedir. HEK-293 hücrelerinin 24 saat boyunca TM ile inkübasyonu, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında kesilmiş kaspaz-3 seviyelerini anlamlı olarak arttırdı. Diğer gruplara kıyasla TM ile muamele edilmiş hücrelerde anlamlı bir şekilde artan kaspaz-3 aktivitesi, immünfloresan boyamayı doğruladı (Şekil 4.3.C). ER stresinin indüklenmesinden sonra hücrelerin düşük doz TUDCA ile tedavisi, kaspaz-3 aktivitesini ve kesilmiş kaspaz-3 düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır.

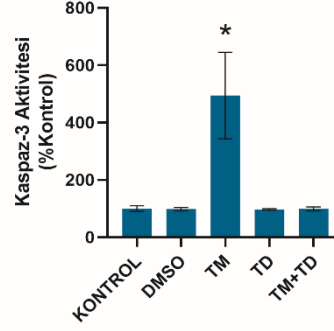
A)



B)



C)



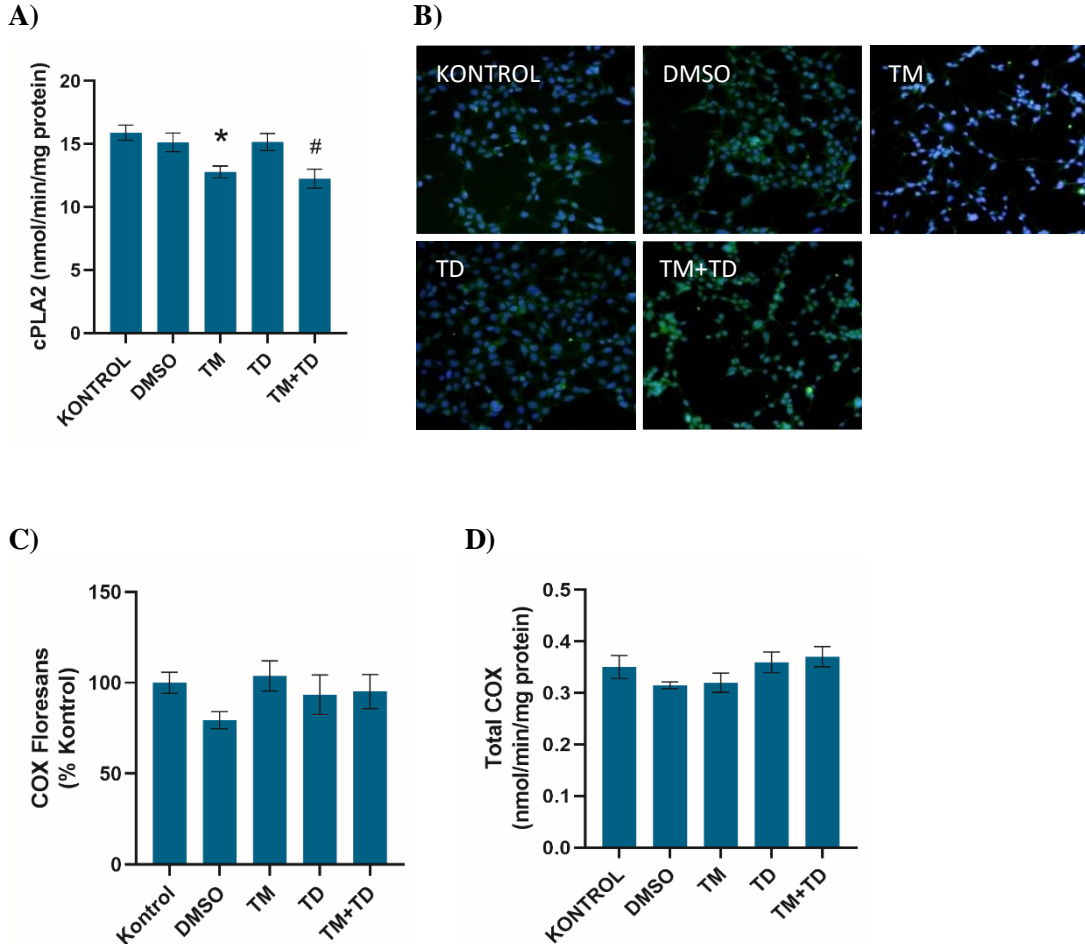
Şekil 4.3. HEK-293 hücrelerinde kaspaz-3 immüno Floresans ve aktivite düzeyleri. DMSO, 24 saat 1 µl/ml dimetil sülfoksit ile muamele edilen hücreler; TM, 24 saat 5 µg/ml tunikamisın ile muamele edilmiş hücreler; TD, 12 saat 0,156 mM TUDCA ile muamele edilmiş hücreler; TM+TD, 24 saat 5 µg/ml tunikamisın toksisitesinde 12 saatlik 0,156 mM TUDCA uygulaması. TM uygulamasından 12 saat sonra 0,156 mM TD uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 24 saat. **A)** HEK-293 hücrelerinde kesilmiş kaspaz-3 temsili immüno Floresan boyama görüntüleri. **B)** Kesilmiş kaspaz-3 floresan boyamasının ImageJ programı ile kantitasyonu. Veriler 15 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0,001, tüm gruplar karşılaştırıldığında. **C)** Kaspaz-3 aktivitesi. Veriler 6 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. *, p<0,001, tüm gruplar karşılaştırıldığında.

4.5. Sitozolik Fosfolipaz A₂, Siklooksijenaz ve Prostaglandin E₂ Seviyeleri

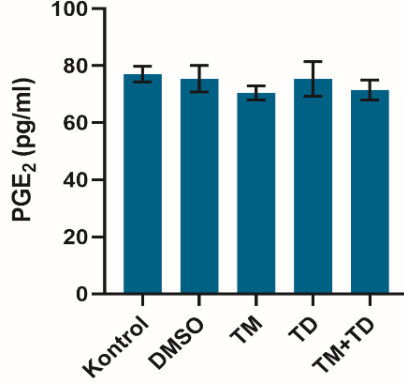
HEK-293 hücrelerinin 24 saat boyunca 5 µg/ml TM ile muamelesi, kontrol, DMSO ve TUDCA gruplarına kıyasla cPLA₂ aktivitesini (ortalama ± SD) anlamlı olarak azalttı. ER stresinin indüklenmesinden sonra hücrelere düşük doz TUDCA uygulaması, TM grubuna kıyasla cPLA₂ aktivitesi üzerinde anlamlı bir etki göstermedi. Kontrol, DMSO, TM, TUDCA ve TM + TUDCA ile muamele edilen hücrelerde ölçülen enzim aktivitesi

sırasıyla 15.91 ± 0.60 ; 15.13 ± 0.74 ; 12.79 ± 0.46 ; 15.17 ± 0.67 ve 12.75 ± 0.75 nmol/min/mg protein olarak belirlendi (Şekil 4.4.A).

Siklooksijenaz-1 immünfloresan boyaması HEK-293 hücrelerinde gerçekleştirildi ve COX enzim aktivitesi ölçüldü (Şekil 4.4.B, 4.4.C ve 4.4.D). İmmünfloresan görüntüleme ve COX-1'in kantitasyonu, farklı gruplar arasında anlamlı bir fark göstermedi (sırasıyla Şekil 4.4.B ve 4.4.C). Benzer şekilde, gruplar arasında COX aktivitesi açısından anlamlı bir fark gözlenmedi. Kontrol, DMSO, TM, TUDCA ve TM + TUDCA ile muamele edilen hücrelerde ölçülen enzim aktivitesi sırasıyla 0.35 ± 0.02 ; 0.32 ± 0.01 ; 0.32 ± 0.02 ; ve 0.37 ± 0.01 nmol/min/mg protein olarak belirlendi (Şekil 4.4.D). Diğer bir yandan PGE₂ seviyeleri (ortalama \pm SD) de gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermedi (Şekil 4.4.E). Kontrol, DMSO, TM, TUDCA ve TM + TUDCA ile muamele edilen hücrelerde ölçülen PGE₂ seviyeleri sırasıyla $77,04 \pm 2,79$; $75,41 \pm 4,62$; $70,46 \pm 2,39$; $75,37 \pm 6,04$ ve $71,48 \pm 3,46$ pg/ml olarak belirlendi.



E)



Şekil 4.4. HEK-293 hücrelerinde cPLA₂, COX ve PGE₂ aktiviteleri ve COX immüno Floresans düzeyleri. DMSO, 24 saat 1 µl/ml dimetil sülfoksit ile muamele edilen hücreler; TM, 24 saat 5 µg/ml tunikamisin ile muamele edilmiş hücreler; TD, 12 saat 0,156 mM TUDCA ile muamele edilmiş hücreler; TM+TD, 24 saat 5 µg/ml tunikamisin toksisitesinde 12 saatlik 0,156 mM TUDCA uygulaması. TM uygulamasından 12 saat sonra 0,156 mM TD uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 24 saat. **A)** Sitosolik fosfolipaz A2 (cPLA₂) aktivitesi. Veriler 7-8 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. *, p<0,001, kontrol, DMSO ve TD grupları ile karşılaştırıldığında. **B)** HEK-293 hücrelerinde COX temsili immüno Floresan boyama görüntüleri. **C)** Siklooksijenaz (COX) floresan boyamasının ImageJ programı ile kantitasyonu. Veriler 15 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz Kruskal-Wallis analizi ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. Gruplar arasında anlamlı farklılık görülmemiştir. **D)** Total COX aktivitesi. Veriler 4 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Gruplar arasında anlamlı farklılık görülmemiştir. **E)** Hücre kültürü besiyerinde prostaglandin E₂ (PGE₂) seviyeleri. Veriler 5 ayrı deneyi temsil etmektedir ve değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ile yapılmıştır ve gruplar arasındaki farklılık Dunnett's T3 çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır. Gruplar arasında anlamlı farklılık görülmemiştir.

4.6. Poliansature Yağ Asidi Seviyeleri

HEK-293 hücrelerinde ölçülen endojen poliansature yağ asidi düzeyleri **Tablo 4.4**'te verilmiştir. Tüm ölçülen PUFA'lar kontrol, DMSO ve TUDCA gruplarına kıyasla TM ve TM + TUDCA gruplarında anlamlı olarak arttı.

Tablo 4.4. HEK-293 Hücrelerinde Poliansatüre Yağ Asiti Düzeyleri. Değerler μg yağ asiti/ 5×10^6 hücre olarak verilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak rapor edilmiştir. DGLA, dihomo-gama-linolenik asit; AA, araşidonik asit; EPA, eikosapentaenoik asit; DHA, dokosaheksaenoik asit. DMSO, 24 saat $1 \mu\text{g/ml}$ dimetil sülfoksit uygulanan hücreler; TM, 24 saat $5 \mu\text{g/ml}$ tunikamisin uygulanan hücreler; TD, 12 saat $0,156 \text{ mM}$ TUDCA uygulanan hücreler; TM+TD, 24 saat $5 \mu\text{g/ml}$ tunikamisin toksisitesinde 12 saatlik $0,156 \text{ mM}$ TUDCA uygulaması. TM uygulamasından 12 saat sonra $0,156 \text{ mM}$ TD uygulandı. Toplam inkübasyon süresi 24 saat. İstatistiksel analiz Tek Yönlü Varyans Analizi veya Kruskal-Wallis sıralamalı tek-yönlü varyans analizi ile yapıldı ve tüm ikili çoklu karşılaştırma prosedürleri Tukey testi ile gerçekleştirildi. *, $p < 0,05$, kontrol, DMSO ve TD'ye karşı.

Grup ($n=8$)	DGLA (C20:3n6)	AA (C20:4n6)	EPA (C20:5n3)	DHA (C22:6n3)
KONTROL	$9,04 \pm 2,81$	$5,54 \pm 1,53$	$0,93 \pm 0,04$	$4,56 \pm 0,76$
DMSO	$8,55 \pm 3,59$	$5,01 \pm 1,70$	$0,85 \pm 0,07$	$3,96 \pm 0,64$
TM	$13,73 \pm 2,46^*$	$15,02 \pm 2,32^*$	$2,76 \pm 0,37^*$	$9,48 \pm 1,34^*$
TD	$9,34 \pm 3,20$	$4,82 \pm 1,47$	$0,79 \pm 0,24$	$3,79 \pm 0,45$
TM+TD	$15,24 \pm 2,77^*$	$13,96 \pm 2,27^*$	$2,14 \pm 0,34^*$	$9,04 \pm 1,26^*$

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, insan böbrek epitelyal hücrelerde TM uygulamasının artmış seramid üretimine sebep olduğunu ve bu seviyelerin bir ER stres inhibitörü olan TUDCA ile düzenlenebileceğini dikkate değer bir gözlemlerle sunmaktadır. Veriler ayrıca TUDCA aracılığıyla gerçekleşen ER stres inhibisyonuna yanıt olarak kaspaz-3 aktivitesinin azaldığını göstermektedir. Tunikamsin ile indüklenmiş cPLA₂ inhibisyonu ve bunun sonucu olarak PUFA birikiminin renal hücrelerde hücrel toksisiteye yol açabildiği bu çalışma ile gösterilmiştir.

Böbrek hücrelerinin 5 µg/ml TM ile muamelesi, daha önce bildirildiği gibi hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmaktadır (Chiappisi ve ark., 2017). Veriler TM uygulamasının HEK-293 hücre kültürlerine spesifik olarak zarar verdiğini göstermektedir. Sonuçlar, hem *in-vivo*, hem de *in-vitro* deneysel modellerde TM'nin renal toksisitesini gösteren önceki çalışmalar ile uyumludur (Carlisle ve ark., 2014; Hammad ve ark., 2017). Tunikamsin, protein glikolizasyonunu bozarak ER stresini tetikleyici etki göstermektedir (Price ve Tsvetanova, 2007). Çalışmada oluşturulan deneysel modeldeki hücre toksisitesinin, ER stresi ile ilişkili hücre ölümü sinyal mekanizmalarının bir sonucu olabileceği düşünülmektedir çünkü ER stress inhibitörü olan TUDCA uygulamasının hücre canlılığını anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir (**Şekil 4.1**). TUDCA, katlanmamış protein yanıtını (UPR) sınırlayıcı etki göstererek ER stresi ile ilişkili hastalıkların tedavisinde bir şaperon görevi görmektedir (Berger ve Haller, 2011). TUDCA aktive transkripsiyon faktörlerinin GRP78 promotörüne bağlanmasını baskılayarak UPR'nin üç ana yolağındaki başlangıç sinyalleşme adımlarının indüksiyonunu durdurmaktadır (Kusaczuk, 2019). Ek olarak, TUDCA'nın çeşitli hastalıklar için geliştirilen birçok *in-vivo* ve *in-vitro* modellerinde oksidatif stresi azalttığı, apoptozu inhibe ettiği ve inflamasyon seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir (Vang ve ark., 2014).

HEK-293 hücrelerinin ER stresini indükleyen TM muamelesi, GRP78 protein seviyelerinde anlamlı bir artışa neden oldu (**Şekil 4.2**). Artan GRP78 protein seviyeleri, böbrek dokusunda ER stresinin varlığını göstermek için iyi bilenen bir belirteç haline

gelmiştir (Zhong ve ark., 2020). GRP78, ER lümeni içerisinde şaperon görevi görmektedir ve bir kısmı ER membranında PKR benzeri ER kinaz (PERK) ile bağlı olarak bulunur. Katlanmamış proteinlerin artan seviyeleri, GRP78'in PERK'ten ayrılarak katlanmamış proteinlere bağlanmasına neden olur ve bu durum ER içerisindeki homeostazın korunmasını zorlaştırır. GRP78'in PERK'ten ayrılması, PERK'in fosforilasyonuna olanak sağlar (Zhu ve Lee, 2015). Çalışmada TM+TUDCA uygulanan hücrelerde, ER stresinin inhibisyonu ile GRP78 protein seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı bulundu, bu da ER stresinin HEK-293 hücrelerinde TUDCA uygulaması ile hafifletildiğini göstermektedir.

Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, TM ile muamele edilen HEK-293 hücrelerinde C18 ve C24 CER'lerin hücresel seviyelerinde dikkate değer bir artış kaydedildi (**Tablo 4.3.**). Sonuçlarımız, renal ER stresinin bir rodent modelinde ve TM ile indüklenmiş ER stresine maruz kalan insan retinal pigment epitel hücrelerinde seramid birikimini gösteren son çalışmaları doğrulamaktadır (Afşar ve ark., 2020; Aslan, Elpek, ve ark., 2021). Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma TM ile muamele edilen HEK-293 hücrelerinde seramid içeren uzun zincirli yağ asidi düzeylerinin arttığını gösteren ilk çalışmadır. Yapılan bir çalışmada, seramidin sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca^{2+} -ATPaz'ı (SERCA) inhibe ederek ER'de Ca^{2+} seviyelerinin tükenmesine neden olduğu ortaya konmuştur (Liu ve ark., 2014). Seramidin bu etkisi, tipik bir ER stres indükleyicisi olan thapsigargin ile karşılaştırılabilir. Thapsigargin, SERCA'yı seçimli olarak inhibe ederek ER lümeninden Ca^{2+} tükenmesine ve ER stresinin aktivasyonuna neden olmaktadır (Doan ve ark., 2015). Sitoplazma ve mitokondriyal matrikste Ca^{2+} konsantrasyonunun giderek yükselmesi, seramidle indüklenen apoptozda önemli bir faktördür (Pinton ve ark., 2001). TUDCA uygulaması, yalnızca TM muamelesine kıyasla, TM ile muamele edilen hücrelerde uzun zincirli CER seviyelerinde anlamlı bir düşüş sağlamıştır. TUDCA uygulamasından sonra C18 ve C24 CER seviyelerinde gözlenen azalma, TUDCA'nın ER stresini azalttığı yeni bir mekanizma sunabilir. Seramid düzeylerindeki artışa ek olarak, S1P seviyelerinin de TM ile muamele edilen grupta kontrole göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi. Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma TM ile muamele edilen HEK-293 hücrelerinde S1P seviyelerindeki anlamlı azalmayı raporlayan ilk çalışmadır. Seramide benzer şekilde, sfingosin-1-fosfat da böbrekte hem yapısal hem de hücre sinyalleşme molekülü olarak işlev görmektedir

(Merscher ve Fornoni, 2014). Böbrek epitel hücreleri, proliferasyonu sürdürmek ve hücreleri çeşitli hasarlardan korumak için seramide karşıt bir şekilde etki gösteren S1P sentezler (Mitrofanova ve ark., 2020). Sfingosin-1-fosfat, S1P fosfataz ile sfingosine defosforile olur veya S1P liyaz tarafından geri dönüşümsüz olarak yıkılarak etanolamin-1-fosfat ve C16 yağ asidi aldehiti oluşumuna yol açar. İlgi çekici bir biçimde, farelerde S1P liyazın böbrekte proteinüri oluşumunda rol oynadığı bildirilirken (Schümann ve ark., 2015), insanlarda S1P liyaz için gen kodlamasındaki mutasyonlar nefrotik sendrom ile bağlantılıdır (Prasad ve ark., 2017). Çalışma sonuçları, böbrek epitel hücrelerinde S1P'nin koruyucu rolünü desteklemektedir ve ayrıca TUDCA uygulaması yoluyla ER stresinin inhibisyonunun S1P düzeylerini arttırdığını göstermektedir. Son zamanlarda biyolojik olarak aktif sfingolipid sentezinin anlaşılmasındaki önemli gelişmeler, özellikle seramid ve S1P aracılı yollarda, bu moleküllerin hücre sağ kalımındaki temel işlevlerinin kabul edilmesi ile sonuçlanmıştır. Sfingolipid metabolizmasının temel bir molekül olan seramid, antiproliferatif ve apoptotik yanıtların aktivasyonuna neden olurken, S1P, hücre proliferasyonu reaksiyonlarını tetikler (Ueda, 2015). Gerçekleştirilen hücre modelinde bulunan artmış C18-C24 CER seviyeleri ve azalmış S1P bulgusu, seramid ile indüklenen kaspaz-3 aktivasyonunu seramid/S1P dengesinin belirlediğini düşündürmektedir.

Kaspaz-3 aktivitesi, TM ile muamele edilmiş HEK-293 hücrelerinde artmıştır (**Şekil 4.3**). Kaspazlar, iki ana yolak üzerinden işlev göstererek apoptozda rol oynayan başlıca enzimlerdir. Ekstrinsik yolak, Fas ligandının ve tümör nekroz faktörü- α 'nın (TNF- α) kaspaz-8 veya kaspaz-10 aktivasyonunu başlatan membran reseptörlerine bağlanmasını gerektirir. İntrinsik yolak, stresle indüklenmiş mitokondriyal sitokrom c salınımı ile aktive edilir (D'Arcy, 2019). Sitokrom c, kaspaz-9'u aktive eden apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ve prokaspaz-9'a bağlanır. Her iki yolak da kaspaz-3 aktivasyonu ile birleşerek kabarcık oluşumu ve nükleer degradasyon gibi morfolojik değişimlere neden olurlar (D'Arcy, 2019). C/EBP-homolog protein (CHOP) gibi ER stresi altında üretilen transkripsiyon faktörleri, B-hücre lenfoma/lösemi-2 (Bcl-2) ekspresyonunu azaltarak ve sitokrom c salınımını başlatarak ER stresi kaynaklı apoptozda rol oynamaktadır (Oyadomari ve Mori, 2004). Ayrıca, CHOP yetersizliği, ER stresinin neden olduğu hücre ölümüne karşı direnç oluşturmaktadır (Marciniak ve ark., 2004).

Sekretuar (sPLA₂), sitozolik (cPLA₂) ve kalsiyumdan bağımsız PLA₂ (iPLA₂), sn-2 pozisyonundaki fosfolipid bağlarını hidrolize eden ve araşidonik asitin serbest kalmasını sağlayan başlıca fosfolipaz A₂ enzimleridir. HEK-293 hücrelerinin TM ile inkübasyonu, kontrol, DMSO ve TUDCA gruplarına kıyasla cPLA₂ aktivitesini anlamlı olarak azaltmıştır (**Şekil 4.4**). TUDCA uygulamasının TM'ye maruz kalan hücrelerde cPLA₂ aktivitesi üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü. Yapılan bir çalışmada seramid cPLA₂'nin CaLB domainine bağlanarak enzimi aktive ettiği ve bu aktivasyonun membran kenetlenmesini ve araşidonik asit salınımını mümkün kıldığı bildirilmiştir (Huwiler ve ark., 2001). HEK-293 hücrelerinde tunikamisin kaynaklı ER stresi, seramid oluşumunu arttırmıştır fakat seramid ile indüklenen cPLA₂ aktivasyonuna yol açmamıştır. Yapılan hücre modelinde gözlemlenen cPLA₂ aktivitesindeki azalmanın cPLA₂'nin azalan N-glikozilasyonundan kaynaklandığı düşünüldü. Tunikamisin, HEK-293 hücrelerinde N-glikozilasyonu azaltmaktadır ve bu etki, protein ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerden bağımsızdır (Yang ve ark., 2017). PLA₂'nin N-glikozilasyonu, HEK-293 hücrelerinde var olan bu enzimin (Hefner ve ark., 2000; Pavicevic ve ark., 2008) katalitik aktivitesi için gereklidir (Hiraoka ve ark., 2013).

Seramid, ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 mitojenle-aktive protein kinaz (MAPK) aktivasyonuna neden olarak COX-2 transkripsiyonunu arttırdığı bilinmektedir (Subbaramaiah ve ark., 1998). Azalmış cPLA₂ aktivitesiyle uyumlu olarak, TM muamelesini takiben total COX aktivitesinde, COX-1 protein düzeylerinde ve PGE₂ seviyelerinde anlamlı bir değişiklik görülmedi (**Şekil 4.4**). Serbest araşidonik asidin azalan bulunabilirliği nedeniyle COX aktivitesinde ve PGE₂ sentezinde anlamlı bir değişimin görülmemiş olması muhtemeldir.

Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma TM ile muamele edilen HEK-293 hücrelerinde endojen PUFA seviyelerini ölçen ilk çalışmadır. HEK-293 hücrelerinin tunikamisin ile inkübasyonu, omega-3 ve omega-6 PUFA seviyelerini anlamlı olarak arttırmıştır (**Tablo 4.4**). Böbrek hücresi PUFA seviyelerindeki bu artış, TM'in cPLA₂ inhibisyonuna neden olması sonucu PUFA birikimine yol açtığını ve bu nedenle PUFA havuzlarının oluştuğunu göstermektedir. Sonuçlar, diklofenak ile cPLA₂ inhibisyonunun böbrek epitel

hücrelerinde PUFA seviyelerini anlamlı olarak artırdığını gösteren yakın tarihli bir çalışmayı desteklemektedir (Aslan ve ark., 2020). HEK-293 hücrelerinde TM muamelesinin ardından artan PUFA seviyelerinin, mitokondriyal membran potansiyeline (MMP) zarar vererek hücresel hasarı artırması muhtemeldir (Lu ve ark., 2010). Mitokondriyal membran hasarının bir ölçütü olarak değerlendirilen mitokondriyal membran potansiyeli, yüksek PUFA konsantrasyonlarına maruz kalan hücrelerde bozulmaktadır (Lu ve ark., 2010). PUFA'lar ayrıca mitokondriyal malfonksiyon ile bağlantılı olabilecek reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu da arttırmaktadır (Das, 2018).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, TM muamelesi, insan HEK-293 hücrelerinde seramid ve GRP78 protein seviyelerini arttırırken S1P konsantrasyonlarını azaltmıştır, bunun sonucu olarak bu hücrelerde kaspaz-3 aktivasyonu artmıştır. ER stresinin TUDCA tarafından inhibisyonu ile, seramid/S1P seviyeleri düşüş göstermiş, kaspaz-3 aktivitesinde azalma gerçekleşmiş ve GRP78 ekspresyon seviyelerinde anlamlı olarak bir düşüş sağlamıştır. Verilerimiz ER stresi ve seramid oluşumunun inhibisyonunun, ER stresiyle ilişkili böbrek hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde farmasötik bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Afşar, E., Kırımlıoğlu, E., Çeker, T., Yılmaz, Ç., Demir, N., & Aslan, M. Effect of er stress on sphingolipid levels and apoptotic pathways in retinal pigment epithelial cells. *Redox Biol.* 2020; 30: 101430.
- Ariyasu, D., Yoshida, H., & Hasegawa, Y. Endoplasmic reticulum (er) stress and endocrine disorders. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (2).
- Aslan, M. Polyunsaturated fatty acid and sphingolipid measurements by tandem mass spectrometry. *Mini-Reviews in Organic Chemistry.* 2021; 18 (1): 3-10.
- Aslan, M., Afsar, E., Kırımlioglu, E., Ceker, T., & Yilmaz, C. Antiproliferative effects of thymoquinone in mcf-7 breast and hepg2 liver cancer cells: Possible role of ceramide and er stress. *Nutr Cancer.* 2021; 73 (3): 460-472.
- Aslan, M., Elpek, Ö., Akkaya, B., Balaban, H. T., & Afşar, E. Organ function, sphingolipid levels and inflammation in tunicamycin induced endoplasmic reticulum stress in male rats. *Hum Exp Toxicol.* 2021; 40 (2): 259-273.
- Aslan, M., Kırımlıoğlu, E., Afşar, E., Çeker, T., & Yılmaz, Ç. Increased pufa levels in kidney epithelial cells in the course of diclofenac toxicity. *Toxicol In Vitro.* 2020; 66: 104836.
- Aslan, M., Özcan, F., Aslan, I., & Yücel, G. Lc-ms/ms analysis of plasma polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetic patients after insulin analog initiation therapy. *Lipids Health Dis.* 2013; 12: 169.
- Berger, E., & Haller, D. Structure-function analysis of the tertiary bile acid tudca for the resolution of endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 409 (4): 610-615.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. Dynamic interaction of bip and er stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000; 2 (6): 326-332.
- Bikman, B. T., & Summers, S. A. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J Clin Invest.* 2011; 121 (11): 4222-4230.
- Bishop, M. L., Fody, E. P., & Schoeff, L. E. *Clinical chemistry: Principles, techniques, and correlations.* (7 ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013, p: 754.
- Blausen, B. Medical gallery of blausen medical. *WikiJournal of Medicine.* 2014; 1 (2).

Blom, T., Somerharju, P., & Ikonen, E. Synthesis and biosynthetic trafficking of membrane lipids. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3 (8): a004713.

Burr, G. O., Burr, M. M. Nutrition classics from *The Journal of Biological Chemistry*. *Nutr Rev.* 1973; 31(8):248-249

Carlisle, R. E., Brimble, E., Werner, K. E., Cruz, G. L., Ask, K., Ingram, A. J., & Dickhout, J. G. 4-phenylbutyrate inhibits tunicamycin-induced acute kidney injury via chop/gadd153 repression. *PLoS One.* 2014; 9 (1): e84663.

Casas, C. Grp78 at the centre of the stage in cancer and neuroprotection. *Front Neurosci.* 2017; 11: 177.

Chakrabarti, A., Chen, A. W., & Varner, J. D. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng.* 2011; 108 (12): 2777-2793.

Chen, Y., & Brandizzi, F. Ire1: Er stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol.* 2013; 23 (11): 547-555.

Chiappisi, E., Ringseis, R., Eder, K., & Gessner, D. K. Effect of endoplasmic reticulum stress on metabolic and stress signaling and kidney-specific functions in madin-darby bovine kidney cells. *J Dairy Sci.* 2017; 100 (8): 6689-6706.

Cybulsky, A. V., Takano, T., Papillon, J., Khadir, A., Liu, J., & Peng, H. Complement c5b-9 membrane attack complex increases expression of endoplasmic reticulum stress proteins in glomerular epithelial cells. *J Biol Chem.* 2002; 277 (44): 41342-41351.

D'Arcy, M. S. Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019; 43 (6): 582-592.

Das, U. N. Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids and some of their metabolites function as endogenous antimicrobial molecules: A review. *J Adv Res.* 2018; 11: 57-66.

Doan, N. T., Paulsen, E. S., Sehgal, P., Moller, J. V., Nissen, P., Denmeade, S. R., Christensen, S. B. Targeting thapsigargin towards tumors. *Steroids.* 2015; 97: 2-7.

Düzgün, A., Alaçam, H., & Okuyucu, A. Endoplazmik retikulum stresi ve katlanmamış protein cevabı. *JECM.* 2012: 95-100.

El Alwani, M., Wu, B. X., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. *Pharmacol Ther.* 2006; 112 (1): 171-183.

Elsherbiny, M. E., Emara, M., & Godbout, R. Interaction of brain fatty acid-binding protein with the polyunsaturated fatty acid environment as a potential determinant of poor prognosis in malignant glioma. *Prog Lipid Res.* 2013;52(4):562-70.

Fan, P., Tyagi, A. K., Agboke, F. A., Mathur, R., Pokharel, N., & Jordan, V. C. Modulation of nuclear factor-kappa b activation by the endoplasmic reticulum stress sensor perk to mediate estrogen-induced apoptosis in breast cancer cells. *Cell Death Discov.* 2018; 4: 15.

Filippo, M. M. The crucial roles played by hnf1 during kidney development. Université René Descartes, 2012, Paris V

Finco, D. R. (1997). Kidney function. In J. Kaneko, J. W. Harvey, & M. L. Bruss (Eds.), *Clinical biochemistry of domestic animals* (5 ed., pp. 441-484): Academic Press.

Gold, R., Kappos, L., Arnold, D. L., Bar-Or, A., Giovannoni, G., Selmaj, K., Investigators, D. S. Placebo-controlled phase 3 study of oral bg-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2012; 367 (12): 1098-1107.

Gombedza, F. C., Shin, S., Kanaras, Y. L., & Bandyopadhyay, B. C. Abrogation of store-operated ca²⁺ entry protects against crystal-induced er stress in human proximal tubular cells. *Cell Death Discov.* 2019; 5 (1): 124.

Gomez-Munoz, A. Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1758 (12): 2049-2056.

Gomez-Munoz, A., Gangoiti, P., Arana, L., Ouro, A., Rivera, I. G., Ordonez, M., & Trueba, M. New insights on the role of ceramide 1-phosphate in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1831 (6): 1060-1066.

Görlach, A., Klappa, P., & Kietzmann, T. The endoplasmic reticulum: Folding, calcium homeostasis, signaling and redox control. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8 (9-10): 1391-1418.

Gürdöl, F. *Tıbbi biyokimya* (4 ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri 2019

Guyton, A. C., & Hall, J. E. *Textbook of medical physiology* (11 ed.). Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005,

Hammad, A. S., Ravindran, S., Khalil, A., & Munusamy, S. Structure-activity relationship of piperine and its synthetic amide analogs for therapeutic potential to prevent experimentally induced er stress in vitro. *Cell Stress Chaperones.* 2017; 22 (3): 417-428.

Hanada, K. Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010; 86 (4): 426-437.

Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9 (2): 139-150.

Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* 1999; 397: 271-274.

Hebert, D. N., & Molinari, M. In and out of the er: Protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev.* 2007; 87 (4): 1377-1408.

Hefner, Y., Borsch-Haubold, A. G., Murakami, M., Wilde, J. I., Pasquet, S., Schieltz, D., Gelb, M. H. Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase a2 by mnk1-related protein kinases. *J Biol Chem.* 2000; 275 (48): 37542-37551.

Hetz, C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under er stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13 (2): 89-102.

Hiraoka, M., Okamoto, K., Ohguro, H., & Abe, A. Role of n-glycosylation of human lysosomal phospholipase a2 for the formation of catalytically active enzyme. *J Lipid Res.* 2013; 54 (11): 3098-3105.

Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 2010; 140 (6): 900-917.

Huwiler, A., Johansen, B., Skarstad, A., & Pfeilschifter, J. Ceramide binds to the calb domain of cytosolic phospholipase a2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release. *FASEB J.* 2001; 15 (1): 7-9.

Inagi, R. Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury. *Nephron Exp Nephrol.* 2009; 112 (1): e1-9.

Inagi, R., Ishimoto, Y., & Nangaku, M. Proteostasis in endoplasmic reticulum-new mechanisms in kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2014; 10 (7): 369-378.

Inagi, R., Kumagai, T., Nishi, H., Kawakami, T., Miyata, T., Fujita, T., & Nangaku, M. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19 (5): 915-922.

Iwasaki, W., Kume, M., Kudo, K., Uchinami, H., Kikuchi, I., Nakagawa, Y., Yoshioka, M. & Yamamoto, Y. Changes in the fatty acid composition of the liver with the administration of N-3 polyunsaturated fatty acids and the effects on warm ischemia/reperfusion injury in the rat liver. *Shock.* 2010;33(3):306-14.

Jennings, R., Premanadan, C., Cianciolo, R., Wilkie, D., Wong, A., Kendzierski, J., & Lin, M. *Veterinary histology.* 2020

Jump, D. B. Fatty acid regulation of gene transcription. *Fatty acid regulation of gene transcription. Crit Rev Clin Lab Sci.* 2004;41(1):41-78.

Kaufman, R. J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: Coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 1999; 13 (10): 1211-1233.

Kaufman, R. J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *Journal of Clinical Investigation.* 2002; 110 (10): 1389-1398.

Kimura, K., Jin, H., Ogawa, M., & Aoe, T. Dysfunction of the er chaperone bip accelerates the renal tubular injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 366 (4): 1048-1053.

Kusaczuk, M. Tauroursodeoxycholate-bile acid with chaperoning activity: Molecular and cellular effects and therapeutic perspectives. *Cells.* 2019; 8 (12).

Kuznetsov, G., Bush, K. T., Zhang, P. L., & Nigam, S. K. Perturbations in maturation of secretory proteins and their association with endoplasmic reticulum chaperones in a cell culture model for epithelial ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93 (16): 8584–8589.

Lai, E., Teodoro, T., & Volchuk, A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda).* 2007; 22: 193-201.

Lei, X., Zhang, S., Bohrer, A., Bao, S., Song, H., & Ramanadham, S. The group via calcium-independent phospholipase a2 participates in er stress-induced ins-1 insulinoma cell apoptosis by promoting ceramide generation via hydrolysis of sphingomyelins by neutral sphingomyelinase. *Biochemistry.* 2007; 46 (35): 10170-10185.

Lin, Y., Jiang, M., Chen, W., Zhao, T., & Wei, Y. Cancer and er stress: Mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response. *Biomed Pharmacother.* 2019; 118: 109249.

Liu, Z., Xia, Y., Li, B., Xu, H., Wang, C., Liu, Y., Li, L. Induction of er stress-mediated apoptosis by ceramide via disruption of er ca(2+) homeostasis in human adenoid cystic carcinoma cells. *Cell Biosci.* 2014; 4: 71.

Lorz, C., Justo, P., Sanz, A., Subira, D., Egido, J., & Ortiz, A. Paracetamol-induced renal tubular injury: A role for er stress. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15 (2): 380-389.

Lu, X., Yu, H., Ma, Q., Shen, S., & Das, U. N. Linoleic acid suppresses colorectal cancer cell growth by inducing oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Lipids Health Dis.* 2010; 9: 106.

- Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Ron, D. Chop induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 2004; 18 (24): 3066-3077.
- Mei, Y., Thompson, M. D., Cohen, R. A., & Tong, X. Endoplasmic reticulum stress and related pathological processes. *J Pharmacol Biomed Anal.* 2013; 1 (2): 1000107.
- Merscher, S., & Fornoni, A. Podocyte pathology and nephropathy - sphingolipids in glomerular diseases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014; 5: 127.
- Mitrofanova, A., Drexler, Y., Merscher, S., & Fornoni, A. Role of sphingolipid signaling in glomerular diseases: Focus on dkd and fsgs. *J Cell Signal.* 2020; 1 (3): 56–69.
- Momoi, T. Caspases involved in er stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat.* 2004; 28 (1-2): 101-105.
- Morita, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69:165-75.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayers, P. A., & Rodwell V. W. *Harper's Illustrated Biochemistry* (26th ed.). New York: McGraw-Hill Companies 2003
- Naidoo, N. Er and aging-protein folding and the er stress response. *Ageing Res Rev.* 2009; 8 (3): 150-159.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). 2017
- Ogen-Shtern, N., Ben David, T., & Lederkremer, G. Z. Protein aggregation and er stress. *Brain Res.* 2016; 1648 (Pt B): 658-666.
- Ogretmen, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2018; 18 (1): 33-50.
- Oyadomari, S., & Mori, M. Roles of chop/gadd153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004; 11 (4): 381-389.
- Özer, H., Aslan, İ., Oruc, M. T., Çöpelci, Y., Afşar, E., Kaya, S., & Aslan, M. Early postoperative changes of sphingomyelins and ceramides after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Lipids Health Dis.* 2018; 17 (1): 269.
- Pavicevic, Z., Leslie, C. C., & Malik, K. U. Cpla2 phosphorylation at serine-515 and serine-505 is required for arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells. *J Lipid Res.* 2008; 49 (4): 724-737.

- Peyrou, M., Hanna, P. E., & Cribb, A. E. Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys. *Toxicol Sci.* 2007; 99 (1): 346-353.
- Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Di Virgilio, F., Pozzan, T., & Rizzuto, R. The Ca^{2+} concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: Significance for the molecular mechanism of bcl-2 action. *EMBO J.* 2001; 20 (11): 2690–2701.
- Prasad, R., Hadjidemetriou, I., Maharaj, A., Meimaridou, E., Buonocore, F., Saleem, M., Metherell, L. A. Sphingosine-1-phosphate lyase mutations cause primary adrenal insufficiency and steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Clin Invest.* 2017; 127 (3): 942-953.
- Price, N. P., & Tsvetanova, B. Biosynthesis of the tunicamycins: A review. *J Antibiot (Tokyo).* 2007; 60 (8): 485-491.
- Pyne, S., Adams, D. R., & Pyne, N. J. Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinases in health and disease: Recent advances. *Prog Lipid Res.* 2016; 62: 93-106.
- Rasheva, V. I., & Domingos, P. M. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis.* 2009; 14 (8): 996-1007.
- Ren, G., Takano, T., Papillon, J., & Cybulsky, A. V. Cytosolic phospholipase A(2)-alpha enhances induction of endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(4):468-81.
- Resler, A. J., Makar, K. W., Heath, L., Whitton, J., Potter, J. D., Poole, E.M., Habermann, N., Scherer, D., Duggan, D., Wang, H., Lindor, N. M., Passarelli, M. N., Baron, J. A., Newcomb, P. A., Le Marchand, L., & Ulrich, C.M. Genetic variation in prostaglandin synthesis and related pathways, NSAID use and colorectal cancer risk in the Colon Cancer Family Registry. *Carcinogenesis.* 2014;35(9):2121-2126
- Ron, D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest.* 2002; 110 (10): 1383-1388.
- Ron, D., & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8 (7): 519-529.
- Rutkowski, D. T., & Hegde, R. S. Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol.* 2010; 189 (5): 783-794.
- Schümann, J., Grevot, A., Ledieu, D., Wolf, A., Schubart, A., Piaia, A., Walker, U. J. Reduced activity of sphingosine-1-phosphate lyase induces podocyte-related glomerular proteinuria, skin irritation, and platelet activation. *Toxicol Pathol.* 2015; 43 (5): 694-703.

- Sieber, J., Lindenmeyer, M. T., Kampe, K., Campbell, K. N., Cohen, C. D., Hopfer, H., Jehle, A. W. Regulation of podocyte survival and endoplasmic reticulum stress by fatty acids. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010; 299 (4): F821-829.
- Sivakamasundari, V., Bolisetty, M., Sivajothi, S., Bessonett, S., Ruan, D., & Robson, P. Comprehensive cell type specific transcriptomics of the human kidney. *bioRxiv*. 2017.
- Subbaramaiah, K., Chung, W. J., & Dannenberg, A. J. Ceramide regulates the transcription of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of extracellular signal-regulated kinase/c-jun n-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*. 1998; 273 (49): 32943-32949.
- Szegezdi, E., Fitzgerald, U., & Samali, A. Caspase-12 and er-stress-mediated apoptosis: The story so far. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 1010: 186-194.
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*. 2006; 7 (9): 880-885.
- Tani, M., Ito, M., & Igarashi, Y. Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cell Signal*. 2007; 19 (2): 229-237.
- Taniguchi, M., & Yoshida, H. Endoplasmic reticulum stress in kidney function and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015; 24 (4): 345-350.
- Tidhar, R., & Futerman, A. H. The complexity of sphingolipid biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833 (11): 2511-2518.
- Ueda, N. Ceramide-induced apoptosis in renal tubular cells: A role of mitochondria and sphingosine-1-phosphate. *Int J Mol Sci*. 2015; 16 (3): 5076-5124.
- Ueda, N. Sphingolipids in genetic and acquired forms of chronic kidney diseases. *Curr Med Chem*. 2017; 24 (12): 1238-1275.
- Urra, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., & Hetz, C. When er stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833 (12): 3507-3517.
- Vang, S., Longley, K., Steer, C. J., & Low, W. C. The unexpected uses of urso- and tauroursodeoxycholic acid in the treatment of non-liver diseases. *Glob Adv Health Med*. 2014; 3 (3): 58-69.
- Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev*. 2010;68(5):280-289.
- Wallace, M. A. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN J*. 1998; 68 (5): 803-806.

- Wu, B. X., Clarke, C. J., & Hannun, Y. A. Mammalian neutral sphingomyelinases: Regulation and roles in cell signaling responses. *Neuromolecular Med.* 2010; 12 (4): 320-330.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., & Reed, J. C. Endoplasmic reticulum stress: Cell life and death decisions. *J Clin Invest.* 2005; 115 (10): 2656-2664.
- Yang, X., Wang, Z., Guo, L., Zhu, Z., & Zhang, Y. Proteome-wide analysis of n-glycosylation stoichiometry using swath technology. *J Proteome Res.* 2017; 16 (10): 3830-3840.
- Yoshida, H. Er stress and diseases. *FEBS J.* 2007; 274 (3): 630-658.
- Zhang, K., & Kaufman, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature.* 2008; 454 (7203): 455-462.
- Zhong, Y., Wang, B., Hu, S., Wang, T., Zhang, Y., Wang, J., Zhang, H. The role of endoplasmic reticulum stress in renal damage caused by acute mercury chloride poisoning. *J Toxicol Sci.* 2020; 45 (9): 589–598.
- Zhu, G., & Lee, A. S. Role of the unfolded protein response, grp78 and grp94 in organ homeostasis. *J Cell Physiol.* 2015; 230 (7): 1413-1420.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Ron, D. Chop is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 1998; 12 (7): 982–995.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hanife Tuğçe	Uyruğu	T.C.
Soyadı	ÇEKER	e-posta	

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Denizli Lisesi (Anadolu Statüsü)	2012
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyokimya	2017
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	-

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Stajyer	Pamukkale Üniversitesi Merkez Laboratuvarı	2016-2017
Öğrenci Araştırmacı	Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı	2016-2017
Asistan	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	2018-

Yabancı Diller	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	80

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
HEK293 Hücrelerinde Endoplazmik Retikulum Stresinin Sfingolipit Düzeyleri, İnflamatuar ve Apoptotik Yolak Üzerindeki Etkileri, Proje No: TYL-2019-5107	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi	2019-2021
İnsan Böbrek Tübüler Hücre Kültüründe Diklofenak Toksisitesinin Etki Mekanizmasının Araştırılması, Proje No: 118Z874	TÜBİTAK	2018-2019
Hipertansiyon Modelinde Asperglaucide Uygulamasının Endotelyum Fonksiyonuna Etkileri, Proje No: 219S713	TÜBİTAK	2020-2022
Diklofenak Sodyumun Kolorektal Kanser Hücrelerinde Adezyon Molekülleri ve Apoptozise Etkisi, Proje No: TYL-2020-5435	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi	2020-2021
Tip 2 Diyabetik Fazla Kilolu Obez Hastalarda Trigliserid Yüksekliğinin Serum Sfingolipidlerine ve HDL Subfraksiyonlarına Etkisi, Proje No: TTU-2021-5605	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi	2021-2023

Burslar-Ödüller:

TÜBİTAK Proje Bursiyeri, İnsan Böbrek Tübüleri Hücre Kültüründe Diklofenak Toksikitesinin Etki Mekanizmasının Araştırılması, Proje No: 118Z874

TÜBİTAK Proje Bursiyeri, Hipertansiyon Modelinde Asperglauçide Uygulamasının Endotelium Fonksiyonuna Etkileri, Proje No: 219S713

Yayımlar ve Bildiriler:

SCI, SSCI, AHCI Indexlerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

Mutay Aslan, Ebru Afşar, Esmâ Kırmıoğlu, **Tuğçe Çeker** & Çağatay Yılmaz (2020): Antiproliferative Effects of Thymoquinone in MCF-7 Breast and HepG2 Liver Cancer Cells: Possible Role of Ceramide and ER Stress, Nutrition and Cancer, DOI: 10.1080/01635581.2020.1751216

Ebru Afşar, Esmâ Kırmıoğlu, **Tuğçe Çeker**, Çağatay Yılmaz, Necdet Demir, Mutay Aslan (2020): Effect of ER stress on sphingolipid levels and apoptotic pathways in retinal pigment epithelial cells, Redox Biology, DOI: 10.1016/j.redox.2020.101430

Mutay Aslan, Esmâ Kırmıoğlu, Ebru Afşar, **Tuğçe Çeker**, Çağatay Yılmaz (2020): Increased PUFA levels in kidney epithelial cells in the course of diclofenac toxicity, Toxicology in Vitro, DOI: 10.1016/j.tiv.2020.104836

Diğer Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Ebru Kocadağ Kocazorbazi Meliha Kanatsızoğlu, **Hanife Tuğçe Çeker**, Esra Menfaatli (2020): Enzymatic Hydrolysis of Stingray (*Dasyatis pastinaca*) Muscle and Evaluation of Antioxidant and Copper Chelating Activities of the Hydrolysates, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, DOI: 10.35193/bseufbd.665435

Hakemli Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar:

Ebru Afşar, Esmâ Kırmıoğlu, **Tuğçe Çeker**, Çağatay Yılmaz, Necdet Demir, Mutay Aslan (2020): Effect of ER stress on sphingolipid levels and apoptotic pathways in retinal pigment epithelial cells, XXXI. National Congress of the Turkish Biochemical Society 2020, Sözlü Sunum

Çağatay Yılmaz, Ebru Afşar, Esmâ Kırmıoğlu, **Tuğçe Çeker** & Mutay Aslan (2020): Antiproliferative Effects of Thymoquinone in MCF-7 Breast and HepG2 Liver Cancer Cells: Possible Role of Ceramide and ER Stress, XXXI. National Congress of the Turkish Biochemical Society 2020, Sözlü Sunum