



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAFETERYA DİYETİ VE SCD PROBİYOTİK TAKVİYESİNİN SIÇAN
KARACİĞERİ GLUTATYON SİSTEM ENZİMLERİ VE METABOLİTLERİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurdan ABA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Ağustos-2023
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAFETERYA DİYETİ VE SCD PROBİYOTİK TAKVİYESİNİN SIÇAN
KARACİĞERİ GLUTATYON SİSTEM ENZİMLERİ VE METABOLİTLERİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nurdan ABA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Enver Fehim KOÇPINAR
İkinci danışman: Dr. Öğr. Üyesi Taha CEYLANI

Ağustos-2023
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL ve ONAYI

Nurdan ABA tarafından hazırlanan “**Kafeterya Diyeti ve SCD Probiyotik Takviyesinin Sıçan Karaciğeri Glutasyon Sistem Enzimleri ve Metabolitleri Üzerine Etkisinin Araştırılması**” adlı yüksek lisans tez çalışması 12/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Doç. Dr. Hamid CEYLAN
Atatürk Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

.....

Üye

Doç. Dr. Üyesi Ahmet SAVCI
Muş Alparslan Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Fuat YETİŞSİN
Muş Alparslan Üniversitesi,
Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu
Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Necattin Cihat İÇYER
Muş Alparslan Üniversitesi,
Mühendislik-Mimarlık Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

.....

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Enver Fehim KOÇPINAR
Muş Alparslan Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu,
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

.....

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu ____/____/____ tarih ve ____/____ nolu kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Sedat BOZARI
FBE Müdürü

Bu tez çalışmasında kullanılan karaciğer dokuları Bingöl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanan 29.06.2021 tarihli ve 03/01 karar sayılı etik kurul raporu kapsamında kullanılmıştır. **Dr. Öğr. Üyesi Taha CEYLANI** bu tez çalışmasının ikinci danışmanıdır.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Nurdan ABA
Tarih: 12/07/2023

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KAFETERYA DİYETİ VE SCD PROBİYOTİK TAKVİYESİNİN SIÇAN KARACİĞERİ GLUTATYON SİSTEM ENZİMLERİ VE METABOLİTLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nurdan ABA

Muş Alparslan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Enver Fehim KOÇPINAR
İkinci danışman: Dr. Öğr. Üyesi Taha CEYLANİ

Kilo artışı, dünyada hızla yayılan ve obezite, diyabet ve kanserinde dâhil olduğu pek çok hastalığın primer patolojisini içeren önemli bir durumdur. Obezitenin primer olgularını içeren kilo artışının metabolik seviyede neden olduğu değişimleri aydınlatmak büyük öneme sahiptir. Probiyotikler bağırsak düzenlemesi amacıyla reçete edilen en yaygın tedavi şeklidirler ve probiyotiklerin bağışıklık sisteminin güçlenmesini de kapsayan bilinen yararlı etkileri çoğunlukla içerdikleri veya ürettikleri ikincil metabolitlere dayandırılır. Yanlış beslenme kilo artışının en önemli nedenlerinden biridir. Günümüzde tüketilen işlenmiş, kızarmış ve fastfood olarak bilinen besinleri içine alan beslenme şeklinin kilo artışı ve obezitenin en büyük nedenleri arasında gösterilir. Kafeterya diyeti (CAF) olarak bilinen beslenme türü deney hayvanlarına uygulanan hızlı kilo artışı ve obezitenin tetiklenmesine neden olan batı diyet kültürünün iyi bir modelidir. Obezite, kanserinde dâhil olduğu birtakım hastalıklar aracılığıyla antioksidanlar ile ilişkilidir. Dolayısıyla kafeterya diyetinin metabolizma üzerindeki etkilerinin aydınlatılması önemlidir. Antioksidanlar hücrel reaktif oksijen türlerini (ROS) düzenleyerek hücrel redoks dengesinin sağlıklı şekilde düzenlenmesinde etkilidirler. Glutasyon döngüsü, glutasyon peroksidad (GPx) ve glutasyon redüktaz (GR) antioksidan enzimlerini, redükte glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG) metabolitlerini içeren redoks dengesinin düzenlenmesi için elzemdir. Bu iki metabolit, enzimlerin aktivitesi ile sürekli olarak birbirine dönüşür. Bu sayede kurulan redoks dengesi sayesinde hem sinyal iletim mekanizmaları ilerler hem de hücre sağlığı oksidasyon kaynaklı hastalıklara karşı korunur. Ayrıca Glutasyon S-transferaz enzimi GSH'ı kullanarak zenobiyotiklerin giderilmesi ve radikal düzenlenmesinde etkili olduğundan glutasyon döngüsünü doğrudan etkileyen önemli enzimlerden biridir. Bu çalışmada kontrol ve deney grupları Wistar sıçan karaciğerlerinde glutasyon sistemi enzim ve metabolitlerinin nasıl düzenlendiği araştırıldı. Bu amaçla normal kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti ile beslenen sıçan karaciğer dokularında, kemirgen diyeti ve kafeterya diyetine ek olarak ticari ismi SCD Probiotics olan 11 farklı probiyotik bakteri içeriğine sahip besin takviyesi verilen sıçan karaciğer dokularında ve son olarak kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics takviye gıda ile beslenen sıçan karaciğer dokularında glutasyon sisteminin qPCR ile mRNA seviyesinde ve kinetik enzim aktivite ölçümleri ile protein seviyesinden nasıl düzenlendiği araştırıldı. Sonuç olarak hem gen seviyesinde hem de protein seviyesinde kafeterya diyetinin glutasyon metabolizması üzerinde önemli olumsuz etkilerinin olduğu ancak SCD Probiotics takviyesi ile glutasyon metabolizmasının büyük oranda yeniden düzenlenebildiği tespit edildi.

2023, 79 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Enzim aktivitesi, Glutasyon sistemi, Kafeterya diyeti, mRNA ekspresyonu, SCD Probiotics

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CAFETERIA DIET AND SCD PROBIOTICS SUPPLEMENTATION ON RAT LIVER GLUTATHIONE SYSTEM ENZYMES AND METABOLITES

Nurdan ABA

**Muş Alparslan University
Natural and Applied Science
Department of Biology**

**Advisor: Assist. Prof. Enver Fehim KOÇPINAR
Co-Supervisor: Assist. Prof. Taha CEYLANI**

Weight gain is an important condition spreading rapidly in the world and includes the primary pathologies of many diseases including obesity, diabetes, and cancer. In addition, weight gain includes the primary phenomena of obesity, and illumination of these phenomena at the metabolic level is of great importance. Probiotics are the most common form of treatment prescribed for the health of the gastrointestinal tract and their beneficial effects, such as boosting the immune system, are attributed to the secondary metabolites they contain or produce. Malnutrition is one of the most important causes of weight gain. The diet that includes processed, fried, and fast foods consumed today is among the biggest causes of weight gain and obesity. The type of diet known as the cafeteria diet (CAF) is a good model of the western diet culture, which causes rapid weight gain and obesity in experimental animals. Obesity is associated with antioxidants through several diseases, including cancer. Therefore, it is important to clarify the effects of the cafeteria diet on metabolism. Antioxidants regulate cellular reactive oxygen species (ROS) and ensure a healthy redox balance in the cell. The glutathione cycle is under the influence of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and Glutathione S-transferase antioxidant enzymes, and the metabolites reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). The health of this cycle is essential for the regulation of the redox balance in a cell. These two metabolites are constantly converted into each other by the activity of enzymes. Thanks to the redox balance established by this way, signal transduction mechanisms progress correctly and thus cell health is protected against oxidation-induced diseases. Glutathione S-transferase enzyme is one of the important enzymes that directly affects the glutathione cycle using the GSH to remove the xenobiotics and radical regulation. In this study, a group of Wistar rats were fed with normal rodent diet and cafeteria diet. The other group was fed with cafeteria diet and SCD Probiotics supplement. One of the groups was fed normal rodent diet and SCD Probiotics supplement. In conclusion, how the glutathione system enzymes and metabolites were regulated at the mRNA level by qPCR and at the protein level by kinetic enzyme activity measurements were investigated. As a result, it was determined that cafeteria diet has significant negative effects on glutathione metabolism at both gene level and protein level, but these effects can be reversed at acceptable rates with SCD Probiotics supplementation.

2023, 79 Pages

Keywords: Antioxidant, Cafeteria diet, Enzyme activity, Glutathione system, mRNA expression, SCD Probiotics

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, hazırlamış olduğum yüksek lisans tez çalışmamın planlanması, araştırılması, test ve analizlerinin yapılması ve nihai olarak hazırlanmasında bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren çok değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Enver Fehim KOÇPINAR'a, hayvan bakımı ve karaciğer dokularının toplanması aşamasında kıymetli zamanlarını veren Muş Alparslan Üniversitesi öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi sayın Harun ÖNLÜ'ye ve özellikle çalışmamızı gerçekleştirebilmemiz için bizlere karaciğer dokularını sağlayan ve gerektiğinde bilgi ve tavsiyeleri ile destek veren Muş Alparslan Üniversitesi öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi sayın Taha CEYLANİ hocalarıma yürekten teşekkür ederim.

Bu tez kapsamında gerçekleştirdiğimiz gen ekspresyon çalışmalarında laboratuvar olanaklarını bize sunan Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Harun BUDAK'a ve çalışma sırasında bizlere yardımcı olan Dr. Şeydanur ÇAKIR ve Arş. Gör. Emine TORAMAN'a teşekkür ederim. Ayrıca tez kapsamında yaptığımız protein seviyesindeki çalışmalarda bizlere yardımcı olan Muş Alparslan Üniversitesi Teknoloji Araştırma Projelendirme Koordinasyon Birimi Merkezi Araştırma Laboratuvarından sorumlu personelimize teşekkür ederim.

Son olarak hayatım boyunca hep yanımda olan, her koşulda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, koşulsuz sevgilerini daima hissettiren sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nurdan ABA
MUŞ-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kafeterya (CAF) Diyeti.....	1
1.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	3
1.2.1. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	5
1.2.2. Süperoksit radikali (O ₂ ⁻).....	5
1.2.3. Hidroksil radikali (OH ⁻).....	6
1.2.4. Singlet oksijen (O ₂ ^{↑↓}).....	6
1.3. Antioksidan ve Organizma	7
1.4. Fonksiyonel Antioksidanlar ve Glutasyon Sistemi	9
1.4.1. Glutasyon S-transferaz (GST)	9
1.4.2. Glutasyon peroksidaz (GPx).....	10
1.4.3. Glutasyon redüktaz (GR).....	11
1. 5. Antioksidan ve ROS İlişkisi	12
1.6. ROS ve Glutasyon Sistemi	14
1.6.1. Redükte glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG)	17
1.7. Probiyotikler ve Organizma.....	19
1. 8. Probiyotikler ve CAF Diyeti İlişkisi	21
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Kullanılan Kimyasallar	26
3.2. Tez Kapsamında Kullanılan Materyal ve Cihazlar.....	27
3.3. Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	28
3.4. Hayvan Deneylerinin Dizaynı ve Doku Alımı	29
3.5. TotalRNA İzolasyonu	32

3.6. Genlere ait cDNA'ların hazırlanması	33
3.7. Primerlerin tasarlanması	35
3.7.1. Primer tasarlamak için gen sekansına ulaşılması	35
3.7.2. Real-Time PCR uygulaması	41
3.7.3. Sybergreen Real-time PCR sonuçlarının hesaplanması	43
3.8. Protein aktivite çalışmaları	43
3.8.1. Bradford (Coommassie Blue) protein tayini	44
3.8.2. Bradford protein tayininin uygulanışı	44
3.8.3. Glutasyon peroksidaz (GPx) enzimi aktivite ölçümü	46
3.8.4. Glutasyon S-Transferaz (GST) enzimi aktivite ölçümü	48
3.8.5. Glutasyon Redüktaz (GR) enzimi aktivite ölçümü	49
3.9. Antioksidan İlişkili Bazı Metabolitlerin Ölçümü	49
3.9.1. GSH ve GSSG ölçümü	49
3.9.2. Malondialdehid (MDA) ölçümü	52
3.10. İstatistiki değerlendirme	54
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA	55
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	67

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

O_2^-	:Süperoksit
$O_2^{\uparrow\downarrow}$	:Singlet (tekil) oksijen
O_2^{2-}	:Peroksit
OH^-	:Hidroksil radikali
H_2O_2	:Hidrojen peroksit
$HOCl$	:Hipokloröz Asit
$-SH$	:Reaktif Sülfidril
$RCOO$	:Organik peroksit radikali
RO	:Alkoksil radikali
$ROOH$	:Organik peroksitler

Kısaltmalar

AA	:Askorbik asit
BHA	:Bütillenmiş Hindroksianisol
BHT	:Bütillenmiş Hidroksitoluen
BSA	:Bovin Serum Albumin
CAT	:Katalaz
CFU	:Koloni oluşturan ünite
EDTA	:Etilendiamin Tetraasetik Asit
FAD	:Flavin Adenin Dinükleotit
GIS	:Gastrointestinal Sistem
GPx	:Glutasyon peroksidaz enzimi
Gpx	:Glutasyon peroksidaz geni
GR	:Glutasyon redüktaz enzimi
Gr	:Glutasyon redüktaz geni
GSH	:Redükte glutasyon
GSSG	:Okside glutasyon
GST	:Glutasyon S-transferaz enzimi
Gst	:Glutasyon S-transferaz geni
MDA	:Malondialdehit
MPO	:Miyeloperoksidaz
NADPH	:Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NCBI	:National Center for Biotechnology Information
PLGSH-Px	:Fosfolipid Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
SCD Probiotics	:11 farklı bakteri suşu içeren besin (Ticari isim)
SOD	:Süperoksit Dismutaz
TBHQ	:Tersiyer butil hidrokinon
TBA	:Tiyobarbutirik asit
UV	:Ultraviyole
HDL	:Yüksek yoğunluklu lipoprotein
LDL	:Düşük yoğunluklu lipoprotein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Oksijenin indirgenerek ROS oluşturma mekanizması.....	4
Şekil 1.2 Hidrojen peroksit oluşumu.....	5
Şekil 1.3 Süperoksit radikalının hidrojen peroksit'e dönüşümü	6
Şekil 1.4 Hidroksil radikali oluşumu	6
Şekil 1.5 Glutasyon peroksidaz (GPx)'ın hidroperoksitleri indirgemesi.....	11
Şekil 1.6 GR enziminin GSSG molekülünü indirgemesi.....	12
Şekil 1.7 Antioksidanlar ve Oksidatif denge.....	13
Şekil 1.8 GSH'ın disülfit bağı ile GSSG'ye dönüşümü.....	17
Şekil 1.9 Glutasyon metabolizması enzimleri ve metabolitleri.....	18
Şekil 3.1 Hayvan deneyleri yerel etik kurul raporu	32
Şekil 3.2 cDNA sentezinde kullanılan termal protokol	35
Şekil 3.3 Primerleri tasarlamak için kullanılan NCBI database	35
Şekil 3.4 Aradığımız geni yazacağımız NCBI sayfası.....	36
Şekil 3.5 Organizma seçim sayfası	36
Şekil 3.6 İlgili genin özelliklerinin belirtildiği NCBI sayfası.....	37
Şekil 3.7 İlgilenilen genin gen ve protein sekansı NCBI veritabanı.....	37
Şekil 3.8 İlgili organizma genine ait FASTA sayfası	38
Şekil 3.9 Çalışılan gen sekansının homolojisinin kontrol edildiği database.....	39
Şekil 3.10 Gen sekansının homoloji kontrolü yapıldığı blastlama ekranı	39
Şekil 3.11 Primerlerin optimum özelliklerinin girildiği NCBI database	40
Şekil 3.12 qPCR tekniğinde takip edilen termal döngü	42
Şekil 3.13 Coomassie brilliant blue molekül yapısı.....	45
Şekil 3.14 BSA standart grafiği	46
Şekil 3.15 GSSG indirgenmesi sonucu oluşan GSH'ın DTNB ile konjugasyonu.....	51
Şekil 3.16 GSH ve GSSG hesaplamalarında kullanılan GSSG standart grafiği.....	51
Şekil 3.17 TBA'nın MDA ile reaksiyonu	52
Şekil 3.18 MDA standart grafiği.....	53
Şekil 4.1 Malondialdehid (MDA) sonuçları ve istatistiksel değerlendirmesi. Kontrol; ad libitum normal kemirgen diyeti verilen grup, CAF; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti verilen grup, CAF+Prob; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti	

ve SCD Probiotics takviye diyeti verilen grup ve Prob; ad libitum normal kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics takviyesi verilen gruptur.	56
Şekil 4.2 Glutasyon sonuçları ve istatistiki değerlendirilmesi.....	57
Şekil 4.3 Glutasyon peroksidaz (GPx) sonuçları ve istatistiki değerlendirmesi.....	59
Şekil 4.4 Glutasyon redüktaz (GR) sonuçları ve istatistiki değerlendirmesi.....	60
Şekil 4.5 Glutasyon S-transferaz (GST) sonuçları ve istatistiki değerlendirmesi	62



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Antioksidanların sınıflandırılması.....	7
Çizelge 3.1	Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler	26
Çizelge 3.2	Tez çalışmasında yararlanılan ekipmanlar, sarflar ve cihazlar	27
Çizelge 3.3	Tez çalışması sırasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	28
Çizelge 3.4	Kontrol ve deney grupları beslenme uygulamaları ve içerikleri.....	30
Çizelge 3.5	CAF diyeti bileşenleri	31
Çizelge 3.6	Pure Link RNA Mini Kit ile RNA izolasyon protokolü	33
Çizelge 3.7	Primerin tasarımı için optimum değer aralıkları.....	40
Çizelge 3.8	qPCR yönteminde kullanılan primerler ve erişim numaraları	41
Çizelge 3.9	qPCR’da kullanılan bileşenlerin miktarları ve konsantrasyonları	42
Çizelge 3.10	Bradford protein tayinini uygulamasında örnek tablo	45
Çizelge 3.11	Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinde kullanılan çözeltiler	47
Çizelge 3.12	GPx aktivite ölçümü pipetleme protokolü	47
Çizelge 3.13	GST aktivite ölçümü pipetleme protokolü.....	48
Çizelge 3.14	GR aktivite ölçümü pipetleme protokolü.....	49
Çizelge 3.15	Redükte glutasyon (GSH) ölçümü pipetleme protokolü	50
Çizelge 3.16	Yükseltgenmiş glutasyon ölçümü pipetleme protokolü	50
Çizelge 3.17	MDA ölçümü pipetleme protokolü	53
Çizelge 5.1	Glutasyon yolu bileşenlerinde gözlenen mRNA ve aktivite değişimleri	64

1. GİRİŞ

Metabolizmamız günlük yaşantımızı ve canlılığımızı sürdürmek için elzem ve belirli bir düzenle koordine olmuş reaksiyonlar bütünüdür. Metabolizma sürecine dâhil olan enerji üretim reaksiyonları oksijeni kullanır ve kullanılan oksijen molekülünün indirgenmesi sırasında Reaktif oksijen türleri (ROS) ve yüksek reaktiviteye sahip serbest radikal olarak bilinen bir takım kimyasal türler meydana gelebilir. Oluşan bu kimyasal türler hücreye ve dolayısıyla organizmaya zarar verme potansiyeline sahiptir (Karabulut ve Gülay, 2016b).

Serbest radikallerin vücutta artışı çeşitli hastalıkların oluşum sürecine etki eder. Antioksidanlar ROS konsantrasyonunu belirli düzeyde tutmaya yardımcı basit veya kompleks moleküllerdir. Sağlıklı organizmalarda antioksidan moleküllerin konsantrasyonu ROS'u kontrol altında tutabilecek seviyelerdedir. Hücrel serbest radikaller reaktivitesine bağlı olarak antioksidanlar tarafından tamamen ortadan kaldırılarak önlenabilir veya sinyal iletim mekanizmaları açısından elzem olabilecek serbest radikallerin konsantrasyonları antioksidanlar ve antioksidan sistemler tarafından düzenlenebilir. Glutasyon peroksidaz (GPx), Glutasyon redüktaz (GR) ve Glutasyon S-transferaz (GST) enzimlerinden müteşekkil olan glutasyon sistemi bu mekanizmanın en iyi örneklerinden biridir. Vücutta bulunan mevcut antioksidan moleküller ve beslenme ile dışarıdan alınabilen antioksidanlar, antioksidan savunma mekanizmasına katkı sağlar. Yapılan çalışmalar sonucunda probiyotiklerin doğal antioksidan oldukları ve antioksidan sistemi destekledikleri belirtilmiştir. Probiyotikler dışarıdan alınan en önemli besinler arasında gösterilir ve antioksidan etkileri ile vücutta oluşabilecek oksidasyon reaksiyonlarını düzenledikleri bilinir (Başer, 2002a).

1.1. Kafeterya (CAF) Diyeti

CAF diyeti genellikle yağ ve karbonhidrat oranı %40'ın üzerinde, protein değeri %20'nin altında, posa olarak bilinen lif ve mikro besin değeri açısından fakir ve az miktarda vitamin ve mineral içeren beslenme tipi olarak bilinir (Rosenheck, 2008; Scoaris ve ark., 2010; Büyükdere, 2018). CAF diyeti yüksek şekerli veya yüksek yağlı ya da her ikisini bir arada bulunduran "Batı diyeti" olarak nitelendirilen yüksek kalorili besinlerden oluşur. Bu besinler oldukça lezzetli, enerji yoğunluğu yüksek ve sindirilmesi kolay ürünlerdir. Küreselleşen dünyada tüketimi hızla artış gösteren sağlıksız bu diyet tipi aşırı işlenmiş, paket gıda şeklinde tüketilen atıştırmalık türleride

kapsar. Cips, ikolata, salam, bisküvi, şekerlemeler, marshmallow vb. ürünler örnek olarak verilebilir (Rothwell ve Stock, 1982; Pini ve ark., 2017; Leigh ve ark., 2019).

Araştırmalara göre CAF diyeti ile beslenen kemirgenlerin; daha yüksek enerjili oldukları, besin alımlarının yüksek olduğu, yüksek oranda obez oldukları, glikoz, insülin değerlerinde değişim meydana geldiği belirtilmiştir (Özçalışkan İlkey ve Ozcaliskan Ilkay, 2020).

1970'lerde Obezite ile ilgili araştırmalar yapan bilim insanları CAF diyetini kullanarak deneysel model oluştırmaya başlamışlardır (Sclafani ve Springer, 1976). Abur cubur tarzı sağlıksız besinlerden oluşan CAF diyeti insanlarda obezitenin oluşumunda merkezi bir rol oynamaktadır (Rogers ve Blundell, 1984). Kemirgenlerde obeziteyi tetikleme üzerine yapılan çalışmalara göre CAF diyeti obezitenin tetiklenmesinde en etkili uygulamalardan biridir (Reuter, 2007). Obezite, tüketicinin besin alımı ile organizmada meydana gelen enerjinin, harcanan enerjiden yüksek olması sonucu vücuttaki yağ kitlelerinin, mevcut yağsız kitlelere oranla daha fazla miktarda bulunması ile oluşum gösteren kronik bir hastalık türüdür. Küreselleşen dünyada aşırı kilolu ve obez bireylerin sayısı ciddi bir artış göstermekte ve obezite kronik bir hastalık haline dönüşmektedir (Altunkaynak ve Özbek, 2006).

Kontrollü şartlar altında CAF diyeti ile beslenen kemirgenlerde fiziksel davranışlar, metabolik ve moleküler aktiviteler araştırmacılar tarafından incelenmiş ve önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. CAF diyeti deney hayvanlarında genellikle kontrol yemi ile birlikte kullanılır ve CAF diyeti için ultra işlenmiş gıdalar tercih edilmiştir (Warden ve Fisler, 2008). Araştırmacıların alışmaları sonucunda elde edilen verilere göre sıçanların CAF diyetini, standart diyetlere oranla daha fazla tercih ettikleri belirtilmiştir (Cook ve ark., 2017).

CAF diyetinin kullanıldığı obezite çalışmalarında kullanılan besinlerin şeker ve yağ miktarınca zengin yüksek kalorili, olmasının dışında hedonik özellik gösteren ürünlerden seçilmesine özen gösterilir. Seçilen ürünler batı diyeti tarzında atıştırmalıklar olup hiperfajiyi tetikler (Leigh ve ark., 2019; Karakaş ve Saka, 2021). CAF diyetinin aşırı tüketimi beyinde hem duygusal bölümü hem ödöl bölgesini uyarır böylece beynin yiyecek alma bölgesine de uyarı iletilir ve yeme isteğinde artış meydana gelir (Leigh ve Morris, 2018).

CAF diyeti insanlarda olduğu gibi kemirgenlerde de hiperfajiyi arttırmaktadır. Hiperfajinin yükselmesi vücuttaki yağ oranının artmasıyla aşırı kilo artışına, glikoz ve

insülin intoleransına sebebiyet verir (Reuter, 2007; Sampey ve ark., 2011; Mucellini ve ark., 2014; Hall ve ark., 2019). CAF diyeti ile beslenen deney hayvanlarında yaşlı ve genç sıçanların genelinde yağ ve enerji miktarında artış gözlemlenmiş ancak yaşlı sıçanlarda genç sıçanlara göre daha fazla kilo artışı meydana geldiği belirtilmiştir (Rothwell ve Stock, 1982).

1.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

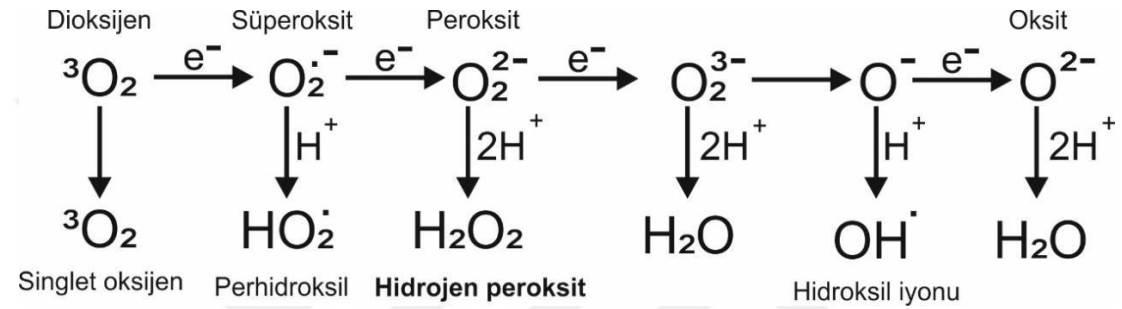
Moleküler oksijen, yaşantısını aerobik koşullarda gerçekleştiren canlılar için elzem bir molekül olmakla birlikte tehdit potansiyeli taşıyabilmektedir (Kavas, 1994). Canlılardaki toksik etkinin temel nedenlerinden birisi dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron bulunduran serbest oksijen radikalleridir (Poljsak ve ark., 2013). Serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunda sadece hücrede meydana gelen metabolik olaylar değil aynı zamanda kullanılan ilaçlar, atmosferin kirliliği, yüksek atmosfer basıncı, ultraviyole (UV) ışınları, sigara, uyuşturucu etkiye sahip kimyasallar, zirai ilaçlar, alkol, aşırı fiziksel aktivite, zorlu iş ve yaşam standartları gibi pek çok çevresel faktörlerde etkilidir (Sen ve ark., 2010).

Toksik etki sebebi olan bu bileşenler serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin hücresel konsantrasyonlarının artışına neden olur. Bu duruma oksidatif stres denilmektedir. Oksidatif stres durumunu açığa çıkaracak bileşenlerin konsantrasyonları ise aşağıda verilen çeşitli sonuçları doğurur (Akpoyraz ve Durak, 1995; Moldovan ve Moldovan, 2004; López-Alarcón ve Denicola, 2013).

- Nükleik asitlerde (DNA/RNA) tek ve çift bağlarda kırılmalar meydana getirebilir.
- Baz içermeyen bölgelerin oluşumuna neden olabilir.
- Lipitlerde; çapraz bağlanmalara, yağ hücrelerinin ve kolesterol oksidasyonuna neden olabilir.
- Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalara sebebiyet verebilir.
- Proteinlerin çift bağlarına saldırarak mekanik yollarını bozabilir veya proteinlerde çapraz bağlanmalar meydana getirebilir.
- Peptid bağlarının kopmasına neden olarak protein denatürasyonuna ve dolayısıyla fonksiyonel proteinler olarak bilinen enzimlerin inhibe olmasına neden olabilir.
- Polisakkaritlerin depolimerizasyonuna neden olabilir.
- Hücre morfolojisini bozarak ilişkili bazı mekanizmalarda değişimlere neden olabilir.

- DNA'da yıkımlar meydana getirerek sinyal yollarını tahrip edebilir, mutasyon oluşturabilir veya çeşitli kimyasal modifikasyonlar meydana getirebilir.
- Hücrelerin ölümüne sebep olur.

Hücrel konsantrasyonunun aşırı birikimi ile oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerine örnek olarak Şekil 1.1'de gösterilen Hidrojen peroksit (H_2O_2), Peroksit (O_2^{2-}), Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$), Singlet (tekil) oksijen ($O_2^1\downarrow$), Organik peroksit radikali ($RCOO\cdot$), Alkoksil radikali ($RO\cdot$), Hipokloröz asit ($HOCl$) ve Hidroksil radikali ($OH\cdot$) verilebilir (Kohen ve Nyska, 2002; Lobo ve ark., 2010).



Şekil 1.1 Oksijenin indirgenerek ROS oluşturma mekanizması (Civelek, 2018)

Süperoksit dismutaz (SOD); ROS ve süperoksit anyon radikallerine karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. SOD enzimatik reaksiyon sonucunda $O_2^{\cdot -}$ 'ni daha az reaktif olan O_2 yükseltgenmesi ve H_2O_2 'e indirgenmesi tepkimelerini katalizlemektedir (Luis ve ark., 2018). SOD'un tüm formları $O_2^{\cdot -}$ 'ni dismutasyon tepkimelerini katalizlemektedir (Buettner ve ark., 2006). SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 'in detoksifikasyonu CAT enzimi ile gerçekleştirilerek H_2O ve O_2 'e katalizleyen tetramerik yapıdaki enzimdir (Limón-Pacheco ve Gonsébat, 2009). Katalaz (CAT) enzimi pek çok enzime nazaran turnover sayısının daha yüksek olduğu bilinir. Bu sayede CAT enzimi saniyede milyonlarca H_2O_2 'i parçalayabilmektedir (Radi ve ark., 1991; Ighodaro ve Akinloye, 2018).

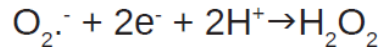
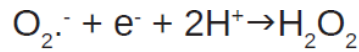
Organizmalarda ROS oluşumu endojen ve eksojen kaynaklar tarafından meydana gelir. Mitokondri, Peroksizomlar, Lipoksijenazlar, NADPH, Oksidazlar ve Sitokrom-p450 endojen olarak ROS'ların üretimine katkıda bulunurken UV ışınlar, iyonize radyasyon, sigara, hava kirliliği ve inflamatuvar sitokinler ise eksojen olarak ROS'ların üretimine katkıda bulunur (Karabulut ve Gülay, 2016b; Aslankoç ve ark., 2019).

Serbest radikaller gen seviyesinde DNA ve RNA'da baz modifikasyonlarına ve çeşitli mutasyonlara neden olabildiği gibi büyük çapta zincir kırılmalarına da neden olabilir. Ayrıca nükleik asitler dışında, serbest radikaller hücre membranında lipid peroksidasyonuna neden olarak membranın geçirgenliğini arttırabilir ve bütünlüğünü bozabilir. Buna ek olarak proteinlerin peptid zincirlerini kırarak protein denatürasyonuna ve fonksiyonel proteinler olan enzimlerin aktivitelerinin azalmasına da yol açabilir (Akpoyraz ve Durak, 1995).

Pek çok makromolekülün hasarlanmasına yol açan ROS'un pek çok kronik hastalığın oluşumunda etkili olabildiği gibi, kanser ve down sendromu gibi büyük oranda genetik faktörlere dayalı olan hastalıklar, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, ateroskleroza da kapsayan kardiyovasküler hastalıklar ve astım, alerjik rinit gibi birçok inflamatuvar hastalıkların patofizyolojisinde rol aldığı veya bu hastalıklar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Meagher ve Rader, 2001; Gandhi ve Abramov, 2012; Pisoschi ve Pop, 2015).

1.2.1. Hidrojen peroksit (H₂O₂)

H₂O₂, O₂^{·-}'in dismutasyonu sonucu oluşmaktadır (Şekil 1.2). H₂O₂, (O₂^{·-})'in yörüngesindeki elektronlardan birini alması veya O₂'nin yörüngesindeki elektronlardan ikisini alması ile meydana gelen peroksit molekülünün iki proton ile birleşmesi sonucunda meydana gelmektedir (Kohen ve Nyska, 2002).



Şekil 1.2 Hidrojen peroksit oluşumu

H₂O₂ kendi başına serbest bir radikal olmamasına karşın serbest radikal biyosentezinde önemli bir role sahiptir (Kohen ve Nyska, 2002).

1.2.2. Süperoksit radikali (O₂^{·-})

Biyolojik sistemlerin önemli radikallerinden birisi olan O₂^{·-}, moleküler oksijene bir elektron transferi sonrasında oluşan bir kimyasal türdür. O₂^{·-}, oksijenli solunum sırasında oksijenin indirgenme yolağının ilk adımında meydana gelen ve pek çok

moleküle hasar verme potansiyeline sahip bir radikal olsa da belirli miktarı diğer

R

O

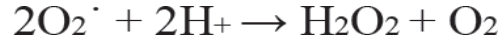
S

,

l

a

r



Şekil 1.3 Süperoksit radikalının hidrojen peroksit dönüşümü

Duman, kontrolsüz ilaç kullanımı ve stres gibi çeşitli ekzojen faktörlerin etkileri sonucu metabolik reaksiyonlar aracılı olarak meydana gelebilir. Pentoz fosfat yolu, ETS, ksenobiyotikler, fagositik moleküllerin çeşitli aktiviteleri ve çeşitli biyokimyasal yıkımlar gibi bazı endojen faktörler aracılı olarak oluşum gösterebilir (Ghosh ve Myers, 1998).

1.2.3. Hidroksil radikali ($\text{OH}^{\cdot}$)

h

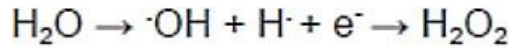
ü

$\text{OH}^{\cdot}$ yüksek reaktivitesi ile ROS moleküllerinin en aktif olanıdır. Dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron bulunan $\text{OH}^{\cdot}$, elektron alma ilgisi sayesinde pek çok molekül ile reaksiyon verebilir (Şekil 1.4). Bu etkisi sebebiyle lipid peroksidasyonuna neden olabilir (Weitberg, 1990; Koç ve ark., 2007).

s

e

l



h

o

m

e

o

s

t

a

z

i

i

Ç

i

1.2.4. Singlet oksijen ($\text{O}_2\uparrow\downarrow$)

$\text{O}_2\uparrow\downarrow$, moleküler oksijenin yüksek enerjili bir formudur ve doğada O_2 halinde bulunan moleküler oksijene enerji aktarılması sonucu eşleşmeyen elektronlarından bir tanesinin başka bir orbitale kendi spininin tersi yönünde yerleşmesi sonucu meydana gelmektedir. $\text{O}_2\uparrow\downarrow$ 'in ortaklanmamış elektronu bulunmaz. Bu nedenle radikal sınıfına alınmayan ancak mutajenik bir ROS türüdür (Barber ve Harris, 1994).

1.3. Antioksidan ve Organizma

Yükseltgenme önleyici olarak da bilinen antioksidanlar genel anlamda oksidasyon reaksiyonlarını elimine edebilen moleküller olarak bilinir (Karabulut ve Gülay, 2016a). Antioksidanların yağların oksidasyonunu yavaşlattıkları ve reaktivitesi yüksek radikallerin oluşumlarının önüne geçtiği bilinir (Yıldız ve Turan, 2021). Bu kapsamda protein ve lipid molekülleri bakımından zengin ve bunların yapı ve organizasyon bakımından koordineli şekilde çalışarak organizmayı oluşturdukları göz önüne alınacak olursa organizma açısından büyük öneme sahip olduğu açık şekilde anlaşılır. Bununla ilgili olarak antioksidanların hasar verme potansiyeline sahip olan serbest radikaller gibi moleküllere elektron aktarma veya onlarla bağ kurma vasıtasıyla potansiyel hasarın önüne geçtikleri ve böylece hem hücre yıkımı hem de kanserleşme sürecini engelledikleri bilinir (Koçpınar, 2015).

Antioksidan kavramı genellikle ROS veya serbest radikal kavramları ile birlikte anılırlar. Organizmalarda serbest radikal üretimi doğal bir süreç olarak devam eder. Bu moleküller belirli konsantrasyonun üzerine çıktığında sağlıklı hücrelere çeşitli hasarlar verebilir. Antioksidanlar, organizmada serbest radikalleri düzenleyerek hasara neden olabilecek reaksiyon oluşumlarını engellerler ve böylece oluşabilecek muhtemel zararın önüne geçmiş olurlar. Ortamdaki aktif oksijen türlerinin kontrolsüz oluşumunu baskılar veya yoğunluğunu azaltır. Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırır. ROS'ları ortamdan uzaklaştırır ya da etkilerini azaltır (Gutteridge, 1995; Dünder ve ark., 1999).

Çizelge 1.1'de görüldüğü gibi endojen antioksidanlar ve ekzojen antioksidanlar olarak antioksidanlar iki gruba ayrılır (Akkuş, 1995; Sen ve ark., 2010).

Çizelge 1.1 Antioksidanların sınıflandırılması

ENDOJEN OLARAK ÜRETİLEN ANTIÖKSİDANLAR	EKZOJEN OLARAK ALINABİLEN ANTIÖKSİDANLAR
Enzimatik Antioksidanlar	Vitamin Ekzojen Antioksidanlar
Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon Peroksidaz (GPx), Glutasyon-S-Transferaz (GST), Glutasyon Redüktaz (GR), Sitokrom oksidaz	Askorbik asit (C vitamini), α - tokoferol (E vitamini), β -Karoten (A vitamini), Folik asit (B9 vitamini)
Nonenzimatik Antioksidanlar	İlaç Olarak Kullanılan Ekzojen Antioksidanlar
Glutasyon, Ürik asit, Karotenoidler, Retinol, Glikoz, Ubikinon, Bilirubin, Melatonin, Seruloplazmin, Transferrin, Ferritin, Albümin, Haptoglobülinler, Laktoferrin	Sitokinler, Trolox-C, Demir şelatörleri, Albümin, Mannitol

Vücutta doğal olarak oluşum gösterebilen antioksidanlara CAT, GPx, GR, SOD örnek verilebilir. Bunlar DNA aracılı olarak kodlanan fonksiyonel enzimlerdir. Vücutta bulunan antioksidan etkili küçük moleküllere askorbik asit, glutatyon, ürik asit, metal bağlayıcılar örnek olarak verilebilir. Bunlar ise ya doğrudan ya da bir enzim aracılığı ile ROS düzenleyici olarak görev alabilirler.

Antioksidanlar hücrede doğal şekilde oluşabilmelerinin yanı sıra dışarıdan besinler ile de alınabilmektedirler (Lobo ve ark., 2010). Dışarıdan alınan antioksidanlar doğal olanlar ve sentetik olanlar olmak üzere sınıflandırılabilir. Besin kaynağı olarak kullanılan sentetik antioksidanlara Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA), Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT), Tersiyer bütıl hidrokinon (TBHQ), Propilgallat, Kuersetin örnek olarak verilebilir.

1940'lı yıllarda sentetik olarak bilinen BHA ve gallik asit esterlerinin oksidasyonu önlediklerinin anlaşılmasıyla gıda katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanmıştır (Yavaşer, 2011). Antioksidan moleküller pek çok mikroorganizmada, pek çok bitki ve türevlerinde mevcuttur (Kullisaar ve ark., 2002; Diken, 2009; Ayvaz, 2021). Bitkiler, serbest radikallerin meydana getirebilecekleri oksidatif hasara karşı savunmada zengin antioksidan moleküller içeren kaynaklardır. Diyetle bitkisel kaynaklardan aldığımız antioksidanlara fitokimyasal antioksidanlar denir. Özellikle bitkisel besin diyeti ile aldığımız doğal antioksidanlara ise Polifenoller, Tokoferoller, Karotenoidler, Likopen, β -Karoten, Lutein, Fenoller, Fenolik asitler, Flavonoidlar, Antosiyaninler, Proantosiyanidinler, Kateşinler (Flavanoller), Katesinler örnek olarak verilebilir (Yavaşer, 2011; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015). Özellikle taze sebze ve meyveler, yağlı tohumlu bitkiler, tahıllar, kuru baklagiller, kabuklu çerezler antioksidan bileşen içeriği yönünden zengin besinlerdir. Sarımsak, soğan, çay (*Camellia sinensis*), kepekli ekmek, yulaf, buğday, bal, üzüm, şarap, zeytinyağı, yer fıstığı, susam, biberiye, elma, kestane, kayısı ve pek çok taze besinin günlük olarak uygun dozlarda kullanımıyla vücut için gerekli olan antioksidan ihtiyacı karşılanabilmektedir. Vücumuzu serbest radikal moleküllerine karşı güçlendirebilmenin en etkili yollardan biri antioksidan içeriği yüksek gıdaları uygun dozlarda tüketerek immün sistemimizi desteklemektir (Sies ve Cadenas, 1985; Velioglu ve ark., 1998; Ou ve ark., 2002; Lee ve ark., 2004; Kahlon ve Smith, 2004).

1.4. Fonksiyonel Antioksidanlar ve Glutasyon Sistemi

Fonksiyonel proteinler genel olarak enzimler veya hormonlar olarak bilinir. Bunlar vücudun doku veya hücre kısımlarında spesifik işlevlerden sorumlu, özellikle metabolik bazı reaksiyonların doğru ilerlemesine katkı yaparak hücre ve organizma sağlığının devam etmesi için elzem moleküllerdir. Metabolik yollarda hücrel ROS konsantrasyonlarının düzenlenmesine katkı yapan fonksiyonel proteinlere genel olarak antioksidan proteinler veya antioksidan enzimler denir. Glutasyon sistemi, antioksidan enzim sistemine dâhil, koordineli olarak çalışan GR, GPx enzimlerini ve GSH, GSSG metabolitlerini kapsar. GST bu döngü ile doğrudan ilgili olan fonksiyonel bir enzimdir. Bu nedenle GPx, GR ve GST enzimleri bu döngüye birinci dereceden katkı yaparak düzgün ilerlemesinden sorumlu olan antioksidan enzimlerdir (Demirtaş ve ark., 2012).

1.4.1. Glutasyon S-transferaz (GST)

GST insanlar, bitkiler ve bakteriler gibi pek çok canlıda görev alan multifonksiyonel antioksidan özellikte enzimlerdir. Enzimler özellik ve fonksiyon bakımından uluslararası bir sınıflandırılmaya tabi tutulmuştur. Enzim komisyonu (EC) sınıflandırılmasına göre GST enzimi E.C.2.5.1.18 şeklinde sınıflandırılmıştır. GST'ler ayrıca kendi içinde Sitoplazmik olanlar, Mitokondriyal olanlar ve Mikrozomal olanlar olarak gruplandırılır. Bu gruplar kendi içlerinde birbirine benzer yapıya sahip olan α , π , σ , θ , ω , μ , ζ gibi isimler alır (Hayes ve Strange, 2000).

GST'ler faz II detoksifikasyon mekanizmasında görev alan bir enzimdir (Sheehan ve ark., 2001). GST enzimi GSH moleküllerini kosubstrat olarak kullanarak, eksojen ve endojen etkinin sonucunda üretilen hücrel toksisiteye neden olan metabolitlerin detoksifikasyonunda yer alır (Raza, 2011). Ayrıca GST'ler dokuları oksidatif stres sonucu hasar meydana getirebilecek moleküllere karşı koruma altına alır. Hücreleri sitotoksik ve genotoksik etki oluşturmada rol alan ROS moleküllerden arındırır. Hücre membranını lipid peroksidasyonundan korur (Oğuztüzün ve ark., 2011; Pandey ve ark., 2015). Pek çok ksenobiyotik çeşidinin zehirsizleştirilmesinde etkilidir (Gyamfi ve ark., 2004). GST'ler nükleofilik katılma tepkimelerinde de rol alır (Labbé ve ark., 2011).

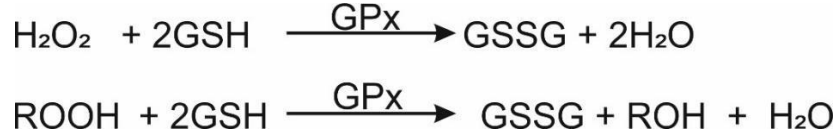
1.4.2. Glutasyon peroksidaz (GPx)

GPx proteini enzim sınıfında olan fonksiyonel bir proteindir ve ilk kez 1957 yılında memeli eritrositlerinde Mills tarafından tespit edilmiştir (Mills, 1957). Ardından molekül ağırlığının 85000 Dalton olduğu saptanmıştır. Akciğerde ve endotel hücrelerde en yüksek etkiyi göstermektedir (Fırat, 1997; Yanbeyi, 1999). GPx'in biyosentezinde selenyum atomuna gereksinim duyulmaktadır ve selenyumu kofaktör olarak kullanan GPx selenoprotein grubunda yer alan hücre içi enzimdir (Knapen ve ark., 1999).

Selenyum atomu translasyon aşamasında selenosistein aminoasidi halinde enzim sistemine dâhil olurlar. Hücreleri oksidatif strese karşı korumada etkili bir role sahip olan GPx'e aynı zamanda içeriğindeki selenosisteinden ötürü selenosistein peroksidaz da denilmektedir (Epp ve ark., 1983). 3, 14, 5, 19, 6, 6, 1 ve 5. kromozomlarda yer alan toplamda sekiz tip GPx bulunmaktadır (Morón ve Castilla-Cortázar, 2012). GPx enzimi tetramerik bir yapıda olup her dört alt biriminde bir selenyum atomu içermektedir (Karabulut ve Gülay, 2016b). Memeli türlerinde GPx'in GPx-1, GPx-2, GPx-3 ve GPx-4 olmak üzere dört izozimi mevcuttur. Tüm hücrelerde eksprese olabilen ve hücrelerde en fazla bulunan GPx-1 tipik hücre içi GPx rolündedir. GPx-1 karaciğer, böbrek ve eritrositlerde eksprese olur ve tipik GPx aktivitesinde etkili rol almaktadır. GPx-2 Gastrointestinal sistemde (GIS) yüksek oranda bulunurken, GPx-3 böbreklerde ve glikoprotein şeklinde ekstra selüler sıvılarda etkili rol alır. Genel olarak tetramerik yapıda oluşum göstermelerine rağmen GPx-4 monomerik bir oluşum göstermektedir. Fosfolipit hidroperoksitlerin parçalanmasında GPx-4 enzimi etkiye sahip tek enzimdir. Peroksizomlarda sperm olgunlaşmasında etkiliyken mitokondriyal izoformda apoptozik cevap oluşturmada aracı role sahiptir. GPx-5 ve GPx-6 selenyum atomundan bağımsız olarak aktivitelerini gerçekleştirdikleri için diğer GPx enzimlerinden farklılık göstermektedirler (Ho ve ark., 1997; Ighodaro ve Akinloye, 2018).

GPx enzimi hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasında etkilidir. Selenyum içeren ve antioksidan bir enzim rolünde olan GPx mitokondride bazen de sitozolde redüksiyon tepkimelerinde elektron vericisi olarak aktivite göstermektedir. GPx, GSH'nda yardımıyla serbest radikalleri ve H_2O_2 , organik peroksitler (ROOH) gibi ROS'ları su ve alkol moleküllerine indirgeyerek detoksifikasyonda görev almaktadır. Buna bir örnek olarak Fosfolipid Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz (PLGSH-Px) hücre membranında da fosfolipid hidroperoksitlerini alkole indirger.

Glutasyon döngüsünün ilerlemesi açısından da elzem olan GPx, katalitik aktivitesi sayesinde ortamdaki GSH'ı yükseltgeyerek GSSG'ye dönüştürür ve bu esnada ortamdaki peroksitleri su ve alkole dönüştürür. Reaksiyon esnasında aynı zamanda GPx, H₂O₂ ve ROOH gibi molekülleri gidererek bu moleküllerin detoksifikasyonunda rol oynar (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Fattman ve ark., 2003; Memişoğulları, 2005; Nollet ve Toldrá, 2012). Bu reaksiyon Şekil 1.5'te gösterilmiştir.



Şekil 1.5 Glutasyon peroksidaz (GPx)'in hidroperoksitleri indirgemesi

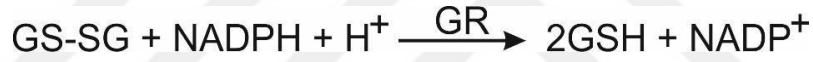
GPx enzimi endotel hücrelerde akciğerde ve karaciğerde en çok etkiye sahip enzimlerdendir (Mungan, 1996). GPx, aktivitesi ile gerçekleştirdiği indirgenme reaksiyonları sayesinde asıl olarak hücre ve dolayısıyla dokuyu oksidatif stres aracılı olarak oluşması muhtemel olan lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlamaktır. Eritrositleri oksidasyondan koruyarak hemoglobin yapılarının sağlığını korumak ve hemolizlerini engellemekte GPx'in peroksit indirgeme aktivitesinin geri planındaki önemli sonuçlardan biridir (Halliwell ve Gutteridge, 1990; Cnubben ve ark., 2001; Karataş ve ark., 2006; Murray ve ark., 2009). Ayrıca hücrede E vitamini eksikliğinde membranda meydana gelecek peroksidasyona karşı savunulmasında ve ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmesinde de etkili rol alır (Sarıkaya ve Doğan, 2020). Öncelikli olarak GPx-1 olmak üzere GPx'ler, kanserinde dahil olduğu apoptosis ilişkili hastalıklar ve kardiyovasküler bazı hastalıkların oluşumunun engellenmesinde önemli etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Rayman, 2005).

1.4.3. Glutasyon redüktaz (GR)

GR enzimi enzim komisyonu (EC) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre E.C.1.8.1.7 şeklinde sınıflandırılmıştır. GR enziminin tanımlanması ilk defa 1951'de yapılmıştır (Şentürk ve ark., 2008). Yapısında iki FAD molekülü bulunduran flavoproteindir. GR enzimi H₂O₂'in hücresel konsantrasyonunun yükseldiği durumlarda oluşan, bu konsantrasyonu düzenlemek için GSH havuzu oluşturmada görev alan flavoproteindir. Ortamdaki H₂O₂'nin eliminasyonu ve fizyolojik açıdan yüksek

konsantrasyonunun faydalı olduğu bilinen GSH konsantrasyonunun artışını gerçekleştirmesi yönüyle önemli bir antioksidan enzim olarak varsayılır (Dalal ve Khanna - Chopra, 2001; Young ve Woodside, 2001; Nordberg ve Arnér, 2001).

GR enziminin eksikliği ROS moleküllerinin artışına sebep olur. Bu nedenle GR enzimi NADPH'a bağımlı olarak GSSG'yi GSH'a katalizler. Hücre içerisindeki serbest radikallerin uzaklaştırılabilmesi için NADPH hidrojen donörü olarak kullanılıp NADP'ye yükseltgenir. Bu sırada GR enzimi GSSG molekülünün tekrar GSH formuna dönüşümünü gerçekleştirir (Şekil 1.6). Sonuç olarak GR'nin bu önemli enzimatik katalizi sayesinde GSH/GSSG oranı uygun seviyede tutulur ve GSH/GSSG oranı diyabet, kanser, Alzheimer ve birçok hastalıkla ilişkilidir (Rayman, 2005; Şentürk ve ark., 2008). Bahsedilen bu önemli dönüşüm sayesinde hücre içi redoks homeostazisi sağlanmış olur ve ROS'ların meydana getirebileceği hücre içi tahribatlar önlenmiş olur (Kurokawa ve ark., 1996; Krauth - Siegel ve ark., 2005; Zhao ve ark., 2009).

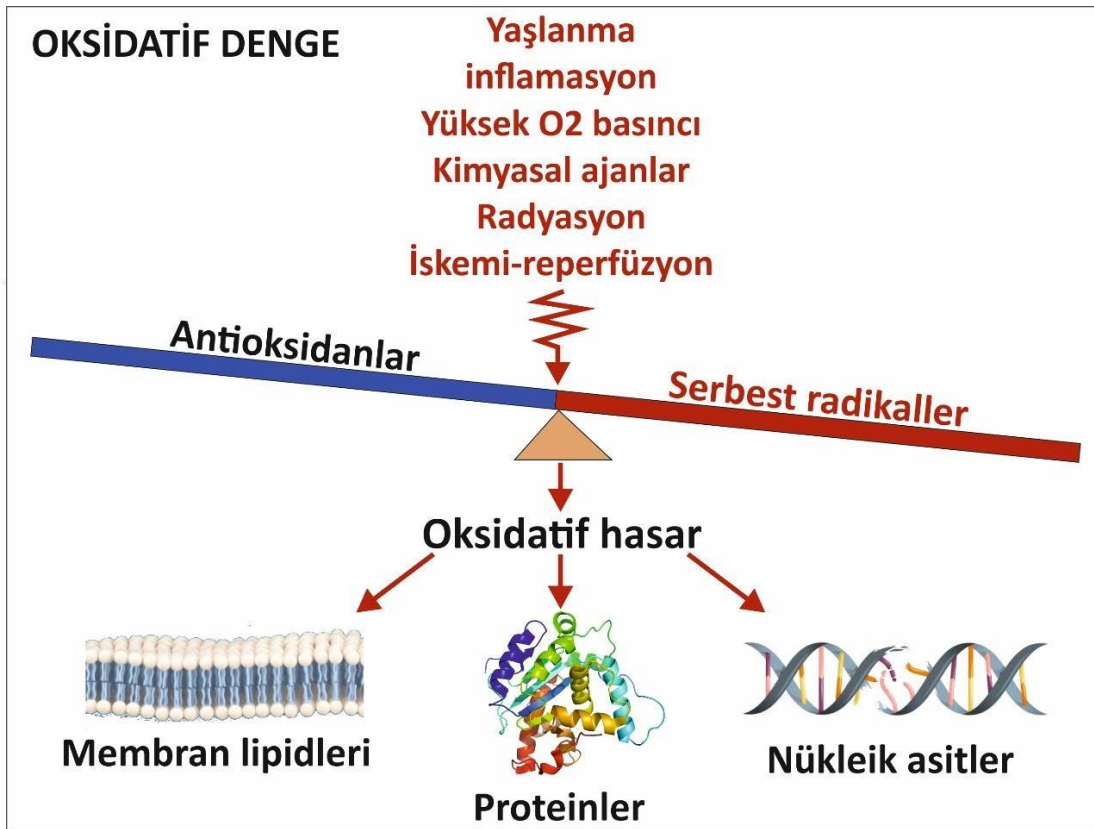


Şekil 1.6 GR enziminin GSSG molekülünü indirgemesi

1. 5. Antioksidan ve ROS İlişkisi

Sağlıklı hücrelerde hücreSEL ROS ve antioksidan konsantrasyonu arasında yüksek hassasiyete sahip bir oran vardır. Hücrenin nörodejeneratif veya kanser gibi çeşitli hastalıklara yakalanma riskini elinde bulunduran bu oranın, hücre kaderi üzerinde büyük etkisinin olduğu bilinir (Koçpınar, 2015). Bu nedenle hem hücre dışı hem de hücre içinde DNA temelli olarak üretilen fonksiyonel antioksidanların konsantrasyonları ve düzenlenmesi yüksek derecede önem arz eder. Nitekim bu düzendeki bozulma hücreSEL ROS konsantrasyonlarını değiştirdiği bilinir (Sies ve Cadenas, 1985). Bu nedenle ROS düzenlenmesinde etkili olan antioksidanların konsantrasyonu hücre sağlığı açısından çok elzemdir. Çünkü antioksidan konsantrasyonunun gereğinden çok yüksek oluşu da ortamdaki ROS'un fazla düşmesine neden olma riski taşıdığından bazı sinyal iletim mekanizmalarının gerekenden daha yavaş ilerlemesine neden olduğu ve dolayısıyla dokusal apoptozis oranının değişmesine yol açtığı ile ilgili bazı sonuçlara ulaşılmıştır (Koçpınar, 2015). Buna ek olarak antioksidanlar detoksifikasyon mekanizması sayesinde ROS fazlalığını gidererek hem

hücrel toksisiteyi engelleme hem de ROS aracılı olarak oluşması muhtemel oksidatif stresin önüne geçer. Kısacası koordineli olarak çalışan antioksidanlar ROS'u tamamen bitirmek için değil aksine hücrel ROS konsantrasyonunun belirli bir düzeyde tutulması amacıyla DNA aracılı olarak üretilen, metabolik yollar aracılığıyla düzenlenen kompleks enzim sistemleridir.



Şekil 1.7 Antioksidanlar ve Oksidatif denge (Özcan ve ark., 2015)

Vücutta antioksidan ve ROS'lar arasındaki denge ROS yönüne kayarsa organizmada metabolik pek çok hasar meydana gelir ve birçok hastalığın oluşmasında basamak oluşturur (Şekil 1.7). ROS'lar; Kanser, kalp hastalıkları, Alzheimer, Diyabet, ALS, Huntington, Parkinson ve immün sistem rahatsızlıkları gibi pek çok hastalığın patofizyolojisinde rol alır. Bu hastalıkların yanı sıra yaşlanmaya ve katarakt, ateroskleroz gibi yaşlanmaya bağlı çeşitli hastalıkların oluşumuna da sebep olduğu vurgulanmaktadır (Percival, 1997; Moldovan ve Moldovan, 2004; Pisoschi ve Pop, 2015). Ayrıca antioksidanların, serbest radikaller ile çeşitli tepkimelere girerek tümör oluşumunu baskıladığı bilinir (Başer, 2002b).

İnsan sağlığının devamı için öncelikli olarak olumsuz etki yaratan faktörlerin elimine edilmesi ve meydana gelebilecek hastalıkların oluşumunun önceden engellenmesi gerekmektedir. Nitekim insan vücudunda hem eksojen hem de endojen kaynaklı etkiler ile meydana gelen ROS'ların düzenlenmesine yönelik tepkimeler sürecinde mitokondride yüksek oranda antioksidana ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için önemli etkiye sahip antioksidan içerikli doğal besinlerin tüketilmesine önem verilmelidir (Kavas, 1994; Aksoy, 2002; Kanat ve Akdemir, 2014b; Pisoschi ve Pop, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016a; Temel ve ark., 2017).

Antioksidanlar serbest radikallerin oluşturabilecekleri muhtemel hasarı ortadan kaldırmak için antioksidanlardan serbest radikallere elektron transferi gerçekleşir ve genellikle fonksiyonel enzim serisinden oluşan antioksidan savunma sistemi serbest radikalleri süpürür ve hücrel tahribatı önler. Antioksidanlar; serbest radikallerin oluşumunu engelleyebilirler veya oluşan serbest radikalleri etkisiz hale getirebilirler. Antioksidanlar serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engelleyebilmek için; reaksiyonu başlatacak reaktif oksijen türlerini uzaklaştırabilir, katalitik metal iyonlarının ortamdaki elemine edebilir, ortamdaki oksijeni uzaklaştırabilir veya ortamdaki oksijen oranını düşürebilir. Antioksidanlar oluşan serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirebilmek için dört farklı yol izlemektedir; onarıcı etki ile serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onararak ortadan kaldırabilir, zincir kırıcı etkisi sayesinde serbest oksijen radikallerinin zincirlerinde kırıklar meydana getirerek oluşturacakları etkilere engel olabilir, bastırıcı etkisi ile serbest oksijen radikalleriyle tepkimeye girip inaktif hale dönüştürebilir, toplama etkisi ile serbest oksijen türevli radikalleri yakalayabilir veya onları reaktivitesi düşük moleküller haline dönüştürebilir (Sies ve Cadenas, 1985; Giray Kurt, 2007; Lobo ve ark., 2010).

1.6. ROS ve Glutasyon Sistemi

GSH güçlü bir antioksidan molekülüdür (Kanat ve Akdemir, 2014a). Glutasyon molekülü Glutamat, Sistein ve Glisin aminoasitlerinin bir araya gelmesiyle meydana gelen tripeptittir. Tripeptit yapıda olan GSH bir tiyol grubu, bir amin grubu ve iki karboksil grubundan meydana gelir (Kanat ve Akdemir, 2014a). GSH molekülü ilk olarak 1888'de maya hücrelerinde keşfedilmiştir. 1921 yılında Hopkins GSH molekülünü saf bir şekilde elde edip karakterizasyonunu yapmıştır (Acan ve Tezcan, 1989). Bu molekül yapısı sayesinde sulu solüsyonlarda ve polar çözücülerde yüksek

çözünürlüğe sahiptir (Kanat ve Akdemir, 2014a). GSH molekülleri en fazla karaciğerde olmak üzere tüm organlarda ve memeli dokularında mevcuttur. GSH, hücre altı partlarında sitozolde, mitokondride ve diğer organellerde yer alır. Ancak genellikle sitozolde daha yüksek oranda bulunur (Mårtensson ve ark., 1990).

GSH'ın yapısında yer alantiyoller çeşitli metabolik fonksiyonlar ve biyolojik aktivitelerden sorumludurlar. Tiyoller bileşiklerin streten korunmasında etkili olan en önemli faktörlerden birisidir. Tiyoller düzenleyici görevindedirler (Kanat ve Akdemir, 2014a; Poole, 2015; Raya ve Bandyopadhyay, 2018). GSH'ın yapısında yer alansisteindeki sülfidril grubu disülfid bağlarını indirgeyerek bir elektron verici gibi davranır ve GSH'a indirgeyici bir özellik sağlar. Bu sayede serbest radikallerin elemine edilmesini de sağlamaktadır (Kanat ve Akdemir, 2014a). Glutamik asit ve sistein arasında γ -glutamil bağı vardır. Bu bağ amid bağlarını hidrolize eder ve bileşiğin proteazlar tarafından parçalanmasını engellemek suretiyle GSH molekülünün parçalanmasını zorlaştırır ve tripeptid yapısının korunmasında yardımcı olur (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005; Duman ve Kurt, 2017).

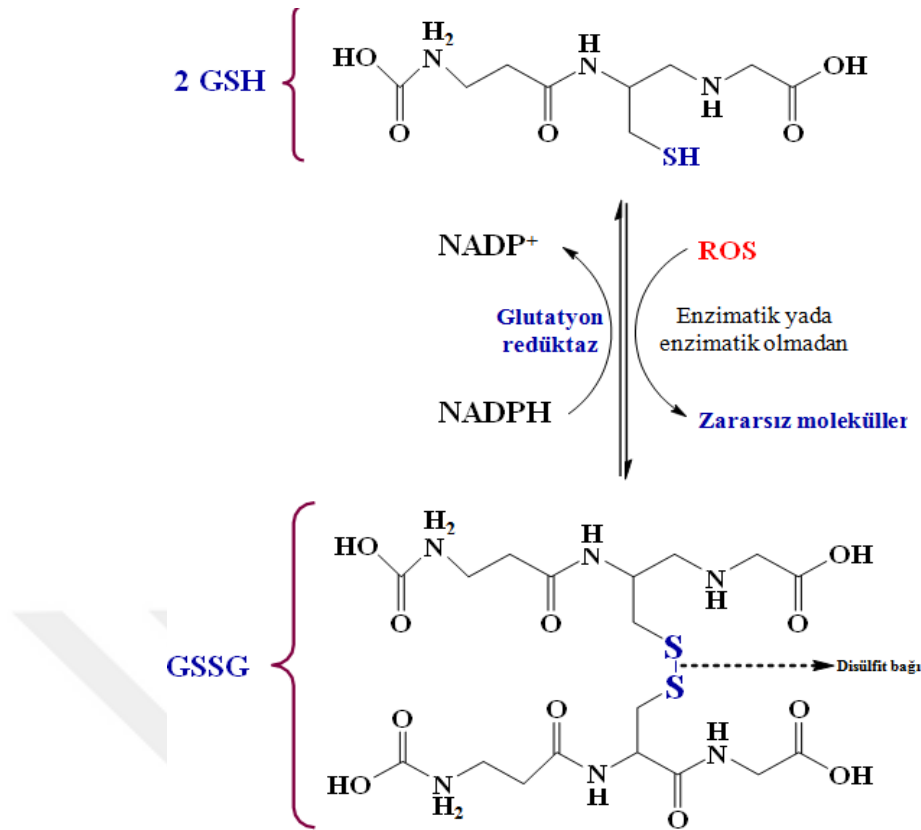
GSH'ın başlıca etkileri şunlardır;

- Apoptoziste ve gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde birincil antioksidan etkiye sahiptir (Manukyan ve ark., 2008).
- Ksenobiyotiklerin zehirsizleştirilmelerinde rol alır (Tak, 2018).
- Detoksifiye edici etkiye sahip olup ROS gibi toksik maddeleri uzaklaştırır (Aköz ve ark., 2000).
- Serbest radikal süpürücü ve hücre savunmasında antioksidan aktivite sahip olan önemli rolü vardır (Karafakıoğlu, 2010).
- Aminoasit transportunda, DNA ve protein sentezlerinde görev alır (Aksoy, 2002).
- Proteinlerin yapılarında bulunan sülfidril gruplarının indirgenmiş şekilde bulunmalarını sağlar. Bu etki ile proteinlerin konformasyonlarını değiştirebilme yeteneği vardır (Taylan ve Resmi, 2010).
- Eikosonoidlerin sentezinde görev alır (Fidan ve ark., 2019).
- Enzim aktivitesini kontrol eder (Meister ve Anderson, 1983).
- Çeşitli kanser türlerinin oluşumunu ve yayılmasını engeller (Aköz ve ark., 2000; Tozkoparan ve Aytaç, 2007; Kıran, 2009).
- Vücudu koruyarak immün sistemin güçlenmesinde etkili olur ve bağışıklığı destekler (Fidelus ve Tsan, 1987; Wu ve ark., 1994).

- İnsülin duyarlılığını arttırıp şeker hastalığını ve insülin direncini geriletir. Disülfit bağlarını koparır (Deveci ve ark., 2005).
- Eksikliğinde; karaciğer hastalıkları (Altomare ve ark., 1988), akciğer hastalıkları (Rahman ve MacNee, 2000), Alzheimer (Pocernich ve ark., 2001), Parkinson(Jha ve ark., 2000), Ateroskleroz (Stamler ve Slivka, 1996) gibi pek çok hastalığın oluşumu tetiklenebilir.
- Yaşlanmayı engeller ve hücrelerin canlılığının sürdürülebilmesi açısından önemli etkiye sahiptir (Imanishi ve ark., 1985).

GSH hayvanlarda, bitkilerde ve bazı prokaryotlarda sayısız hücresel işleme katılmaktadır. GSH molekülü *Escherichia coli* öncelikli olmak üzere pek çok gram negatif bakteride ve birkaç gram pozitif bakteride tespit edilmiştir (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005). Endojenik veya ekzojenik pek çok stres faktörüyle karşılaşan bakterilerde hücre mekanizmasında ve fonksiyonlarında olumsuz birçok etki meydana gelmiştir (Storz ve Hengge-Aronis, 2011). Bakterilerde GSH molekülü hücreyi özellikle oksidatif strese ve pek çok ekzojenik ve endojenik stres faktörüne karşı korumakta önemli bir role sahiptir (Masip ve ark., 2006). Farklı stres koşullarında (Düşük pH, Osmotik Stres, Klor Bileşikler, Hidrojen Peroksit, Isı Şoku) GSH'ın rolü incelendiğinde bakterilerin kendilerini koruyabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirdikleri gözlenmiştir (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005). Bakteriler karşılaştıkları pek çok stres faktörüne karşı farklı yanıt oluştururlar. Bakteriler strese cevap olarak ya ölebilirler ya da daha büyük oranda direnç geliştirebilirler. Strese adapte olan canlılar yanıt olarak; stresin olduğu yeri onararak yaşamına devam edebilir, stres faktörlerini uzaklaştıracak sekonder metabolitler gibi moleküller üretebilir, stres ajanlarına karşı direnç oluşturabilir, spor formuna dönüşüm gösterebilir, kültüre alınamayacak halde canlılığını sürdürebilir (Dikici, 2009).

GSH'ında dâhil olduğu antioksidan savunma sistemi hücresel ROS'u kaldırarak hücresel hasarın önüne geçer. GSH molekülü hücredeki ROS'u süpürür (Şekil 1.8).



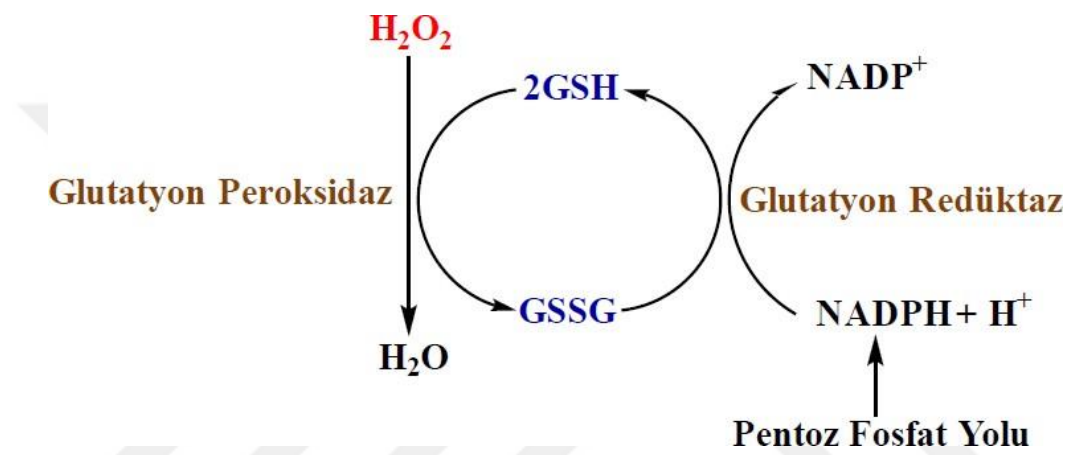
Şekil 1.8 GSH'ın disülfid bağı ile GSSG'ye dönüşümü (Koçpınar, 2015).

GSH molekülü bu eliminasyon işlemini moleküler yapısında bulunan tiyol grubu aracılığıyla gerçekleştirir. ROS'un elemine edebilmek için GSH molekülü GSSG formuna geçiş yapar. Ancak GSH'ın GSSG'ye oranı hücrel oksidatif stres riskinin seviyesini dolayısıyla oksidatif strese aracılı hastalıkların oluşumları açısından önem arz eder. Bu nedenle hücre hayatının sağlıklı şekilde sürdürülebilmesi için bu oranın korunması önemlidir. Düşük GSH/GSSG oranı bize hücrelerin oksidatif stres altında olduğunu göstermektedir. Farklı tepkimeler için gerektiğinde GSSG molekülü GSH' a dönüşebilir. Glutasyon döngü sisteminde bulunan GPx, GR ve doğrudan ilişkili GST enzimlerinin koordineli çalışması sayesinde belirli düzeyde tutulan GSH molekülü serbest radikallerin oluşturdukları zararlara karşı koruma işlemini sürdürür (Chai ve ark., 1994; Schafer ve Buettner, 2001; Sen ve ark., 2010; Schäfer ve Werner, 2011).

1.6.1. Redükte glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG)

Glutasyon dokularda indirgenmiş GSH ve yükseltgenmiş GSSG olarak birbirlerine dönüşebilen formlarda bulunur. Yapısında selenyum içerdiği bilinen GPx enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla intraselüler Glutasyon, H_2O_2 veya ROOH ile

reaksiyona girip bu moleküllerin detoksifikasyonunu gerçekleştirirken kendisi ise başka bir GSH ile disülfid köprüsü oluşturarak GSSG formuna geçer ($\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$). Hücre içerisindeki serbest radikallerin uzaklaştırılabilmesi için Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH) Hidrojen donörü olarak kullanılarak GR enzimi aracılığıyla GSSG formundan tekrar GSH formuna geri dönüşümü gerçekleştirilir (Arrick ve Nathan, 1984; Nollet ve Toldrá, 2012; Karabulut ve Gülay, 2016a; Çöteli ve ark., 2017). Bu dönüşümün tamamı Şekil 1.9'da gösterilmiştir (Valle ve ark., 2010).



Şekil 1.9 Glutasyon metabolizması enzimleri ve metabolitleri (Valle ve ark., 2010)

Pentoz fosfat yolunun glutasyon döngüsü için NADPH kaynağı olduğu iyi bilinir ($\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$) (Murray ve ark., 2009). GR enziminin hücre içerisinde amacı GSH havuzu oluşturmaktır. Flavin Adenin Dinükleotid (FAD) içeren flavoprotein yapıdaki GR enzimi, NADPH'ı NADP^+ 'ya yükseltgeyerek GSSG'nin GSH'a indirgenmesini sağlar. Hücrel H_2O_2 konsantrasyonunun gerekenden fazla yükselmesi durumlarında bu yol un devamı olarak GPx enzimi H_2O_2 'in H_2O 'ya dönüşümünü sağlar. Böylece ortamda korunması gereken redoks dengesi sürdürülmüş olur (Özkan ve Fışkın, 2004; Giray Kurt, 2007; Sen ve ark., 2010).

GR enziminin en önemli hedeflerinden biri de GSH/GSSG oranını koruyabilmektir. GSH/GSSG oranı ortalama 100 civarında olması hücrenin sağlıklı olduğunun işaretidir. Oksidatif stres halindeki hücrelerde bu değer azalarak 10 kata kadar düşebilir. Yani GSH/GSSG oranındaki görülen azalma oksidatif stresin varlığının bir işareti olarak kabul edilmektedir (Owen ve Butterfield, 2010).

1.7. Probiyotikler ve Organizma

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü probiyotikleri "yeterli miktarda uygulandığında konakçıya sağlık yararları sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlamaktadır (Hemarajata ve Versalovic, 2013). Esasen probiyotiklerin varlığı insanlık tarihi kadar eskidir. Ancak probiyotik terimini çalışmalarıyla ortaya koyan ilk kişi immünolojinin babası olarak bilinen Elie Metchnikoff'dur. Metchnikoff, Bulgar köylülerinin belirgin şekilde sağlıklı ve uzun ömürlü olduklarını gözlemlemiştir. Yaptığı incelemeler sonucunda sütü laktik asit bakterileriyle mayalayarak elde ettikleri yoğurdu fazla tüketmelerine bağlı olarak sağlıklı ve uzun ömürlü olduklarını anlamıştır (Hill ve ark., 2014; Yurdakök, 2015). Probiyotik mikroorganizmaların en önemlilerini laktobasiller, bifidobakterler ve enterokoklardır (Dunne, 2001; Maragkoudakis ve ark., 2006).

İnsanlar ve hayvanlar için probiyotik kaynağı olarak kullanılmakta olan *Bacillus spp* sporları; UV radyasyon, çeşitli enzim ve çözücüler, yüksek sıcaklık, besin yetersizliği gibi pek çok ekstrem koşula karşı dayanıklıdır (Chapman ve ark., 2011; Cutting, 2011; AlGburi ve ark., 2016). Probiyotik bakterilerin kullanılabilir olmaları için; patojenik olmamalı, insan kaynaklı olmalı, antimikrobiyal etkiye sahip olmalı, ürünlerde ve klinikte güvenle kullanılabilmesi, canlı mikroorganizma oranı yüksek olmalı, raf ömrü uzun olabilmeli, ilave edildiği ürünün tadını bozmamalı, GIS'de aktivitesini devam ettirebilmeli, asidik ortama ve safra tuzlarına dirençli olmalı, bağışıklığı güçlendirebilmeli, barsak epitel dokularına sağlam yapışabilmelidir (Özden, 2006).

Tüketiciye fonksiyonel olarak ve klinik yönden fayda sağlamakta olan probiyotik bakımından zengin olan besinlere örnek olarak; probiyotik yoğurt, peynir, dondurma, süt tozu, boza, kefir, kıymız, ayran, tereyağı, turşu gibi pek çok besin örnek olarak gösterilebilmektedir (Anal ve Singh, 2007; Leite ve ark., 2013; Foolad ve ark., 2013). Tüketilen probiyotiklerin biyoyararlılığı, içerdikleri antioksidan oranı besinin maruz kalmış olduğu, ısı, ışık, nem, iklim özelliği gibi yetiştirilme şartlarına, besinin cinsine, gıdanın üretilme, hazırlanış, saklanma tarzına, hasat edildiği döneme, hasat edilme şekline, bireylerin tüketme tazına göre değişim gösterebilmektedir (Moure ve ark., 2001).

Probiyotiklerin pek çok yararlı etkileri bulunmaktadır. Bu yararlar genel olarak şu şekilde sıralanabilir;

- Laktoz intoleransı üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır (Özdemir, 2015).
- Serum kolesterol seviyesini düşürmede etkilidir ve kan basıncını azaltır (Duygu ve Ertürkmen, 2017).
- Bağırsak florasını ve bağışıklık sistemini modüle ederek ROS'ların üretimini baskılar. Bağırsakta ve mide mukozasında patojen bakterilerin oluşumunu engeller. Karaciğerde ve bağırsakta inflamatuvar sitokin etkisini düşürür (Gu ve ark., 2019).
- Antibiyotik kullanımı sonucunda olumsuz etkilenen bağırsak florasının düzenlenmesine yardımcı olur ve bağırsak mikrobiyotasındaki zararlı bakterileri kontrol altına alarak sindirim sistemimizin sağlıklı bir şekilde işlevini yerine getirebilmesini sağlar.
- Antibiyotiğe karşı direnç geliştirebilen bakterilere karşı antibiyotik etki amacıyla kullanılabilir. Böylece daha doğal tedavi işlemi gerçekleştirilmiş olur (Plummer ve ark., 2005; Can ve ark., 2007; Tripathi ve Giri, 2014).
- Alerji oluşumunu engelleme ve ötelemde etki gösterir (Drisko ve ark., 2003).
- Probiyotikler kanser oluşumunun engellenmesinde etkilidirler. Probiyotikler kanser oluşumuna neden olan enzimleri ve diğer kanserojen etkenleri uzaklaştırırlar. İmmün sistemi güçlendirir. Özellikle bağırsak kanserini önlemede etkilidir (Özden, 2006; Shida ve Nomoto, 2013).
- Antimikrobiyal etki mekanizmasıyla patojen bakterilerin artışını engeller (Farnaud ve Evans, 2003).
- Osteoporozun oluşumunun engellenmesinde pozitif etki yapar. Hiper kolesterol oluşumunu engelleyen niteliğe sahiptir. Kabızlık, ishal, idrar yolu iltihaplanması tedavisinde rol alır (Venturi ve ark., 1999; Lourens-Hattingh ve Viljoen, 2001; Rafter, 2002; Mattila-Sandholm ve ark., 2002).
- Cilt güzelliğini olumlu yönde etkiler, cilt parlaklığını artırır, yaraların erken iyileşmesinde etki oranı yüksektir (Ersoy ve ark., 2018).
- Probiyotik ve prebiyotiklerin kullanımı sonucu bağırsak florasının düzenlenmesiyle obezite ve obezite sonucunda açığa çıkan yan etkiler tedavi edilebilir, kilo artışı engellenebilir. Enerji ile ilgili protein ekspresyonlarına pozitif şekilde etki etmektedir (Arslan, 2014).

1. 8. Probiyotikler ve CAF Diyeti İlişkisi

Oksidatif stres sonucunda vücutta meydana gelen ROS molekülleri; DNA'da mutasyonlar oluşturur, membrana ve lipit tabakasında çeşitli hasarlar meydana getirir. ROS'ların vücutta etkilerinin azaltılmasında GR, GPx, SOD, CAT gibi çeşitli fonksiyonel özelliğe sahip antioksidanlar rol alır (Akpoyraz ve Durak, 1995). Antioksidanlar hücrede doğal şekilde oluşabilmelerinin yanı sıra dışarıdan da besinler ile alınabilmektedirler (Lobo ve ark., 2010). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, probiyotiklerin, bakteriyel postbiyotiklerin vb. ürünlerin doğal bir antioksidan olduklarını veya antioksidan özellikleri olumlu yönde teşvik ettiklerini bildirmektedir (Izuddin ve ark., 2020; Chang ve ark., 2021). Bazı antioksidan enzimlerin üretiminde rol alan probiyotikler ROS'ların süpürülmesinde etkilidirler. Probiyotikler NADPH oksidazın çoğalmasını baskılayarak ROS oluşumunu engeller. Laktik asit bakterileri enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarda etkili olması yönüyle de ROS'ların azalmasında etkilidir. Laktik asit bakterileri CAT enziminin üretiminde etkili olup H₂O₂'i detoksifiye etmektedir. Probiyotikler metalleri bağlama özelliğine sahiptirler (Hur ve ark., 2014; Mishra ve ark., 2015; Öztürk, 2022).

Probiyotiklerin antioksidan mekanizmaları; (Ejtahed ve ark., 2012)

- ROS'ların detoksifikasyonu
- Metal iyonlarını şelatlama
- Bazı enzimleri inhibe etme
- Askorbatoto oksidasyonunda ve inhibisyonunda rol alma

Antioksidanlar insan sağlığı üzerinde olumlu etkiler gösteren besleyici ve metabolizmadaki fonksiyonları düzenleyici role sahip maddelerdir. Bu nedenle antioksidan bakımından zengin besinlerin üretiminde artış sağlanmalıdır. Tüketicilerin konu ile ilgili bilinçlenmesi kendi yaşam kalitelerini arttırmak ve sağlıklı bir yaşam sürdürebilmeleri için yüksek derecede elzemdir (Meral ve ark., 2012). Antioksidan sistemini güçlendirebileceğimiz en önemli unsurlardan biri tükettiğimiz besinlerdir örneğin; sarımsak, soğan, çay (*Camellia sinensis*), kepekli ekmek ve bal, üzüm, şarap, elma, kiraz, kestane, domates, incir, kayısı gibi pek çok taze besinin; kekik, biberiye, zerdeçal, adaçayı, karabiber, karanfil gibi bazı baharatların günlük olarak uygun dozlarda kullanımıyla vücut için gerekli olan antioksidan ihtiyacı karşılanabilmektedir (Sies ve Cadenas, 1985; Ögüt, 2014). Özellikle fermente besinlerin içerdiği probiyotikler antioksidan etkiye sahip olan birçok faydası bulunan ürünlerdir. Bu

fermente besinlere örnek olarak yoğurt, kefir, kımız, peynir, turşu, şalgam, şıra, sucuk örnek olarak verilebilir (Çeltik ve ark., 2022).

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar sonucunda, CAF diyeti benzeri aşırı yağlı ve kolesterol oluşumunu tetikleyici diyetlerle beslenen kemirgenlere *Bacillus polyfermenticus* SCD suşu verilmesi sonucunda antioksidan seviyesinde pozitif yönlü bir etki saptanmış ve kolesterol seviyesinde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. *Bacillus polyfermenticus* SCD, kolesterol ve trigliseritin vücuttan atılımını artırarak vücuttaki seviyelerini düşürmektedir. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolde azalma gözlemlenirken yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterolde artış olduğu rapor edilmiştir. Bu da ateroskleroz riskinde önemli ölçüde düşüş sağlamıştır (Paik ve ark., 2005).

Bu çalışma kapsamında daha önce bahsedilen verilere göre obezite gelişimi için güçlü bir beslenme şekli olan CAF diyetinin öncelikli olarak lipid metabolizması olmak üzere genel metabolizmayı da pek çok yönüyle olumsuz etkileyerek diyabet gibi günümüzde yaygın olarak görülen bazı hastalıklara neden olabileceğine dair fikir ileri sürmek çoğu çalışmanın başlangıç fikri olabilir. Bu amaçla, çalışma ile CAF diyeti ve normal besin ile beslenen sıçanların glutasyon döngüsü enzim sistemi regülasyonunun nasıl olduğu gen ekspresyonu ve fonksiyonel enzim aktivitelerinin belirlenmesi ile araştırıldı. Ayrıca bu sıçanlara 11 farklı probiyotik suş içeriğine sahip SCD Probioticstakviyesi verilerek normal beslenen sıçanların glutasyon döngülerinin nasıl düzenlendiği ve SCD Probioticstakviyesinin CAF diyetinin olumsuz etkilerini giderip gidermediği gen ekspresyonu ve kinetik enzim aktivitelerinin belirlenmesi ile aydınlatılmaya çalışıldı.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

CAF diyeti ile obezite olan farelerde beyaz yağ dokusu üzerinde meydana gelen etkileri araştırmak için bir çalışmada kullanılan Wistar farelerin önce 2 hafta standart diyetle sınırsız ulaşimleri sağlanmış. Ardından farelere ayrı ayrı gruplar halinde standart diyet ve CAF diyeti dediğimiz abur cubur tarzı beslenme şekli uygulanmış. Diyet uygulamasının ardından yapılan inceleme sonucunda CAF diyeti verilen farelerde spesifik diyet verilen farelere kıyasla antioksidan kapasitenin köreldiği ve antienflamatuar genlerde azalma meydana geldiği saptanmıştır. GSH, hücreleri oksidatif stres sonucu oluşan moleküllere karşı korumada görev alan antioksidandır. Standart ve CAF diyeti verilen farelerin beyaz yağ dokularından mRNA gen ekspresyonları incelenmiştir. Bunun sonucunda CAF diyeti ile beslenen farelerde GSH metabolizmasında görev alan genlerin ciddi oranda azaldığı ve bu beslenme tarzının oksidatif stresi arttırdığı saptanmıştır. Sitokrom P450 tarafından ilaçların zehirsizleştirilmesinde rol alan ksenobiyotiklerin etkisini azalttığı da belirtilmiştir. CAF diyetine bağlı oluşan obezitenin bir insan hastalığı çeşidi olduğu saptanmıştır (Johnson ve ark., 2016).

Yapılan farklı bir çalışmada da obezitenin dünya çapında neredeyse salgın haline geldiği belirtilmiş ve Amerikalı çocukların kalorilerinin %25'ini obez yapıcı gıdalardan aldığı vurgulanmıştır. Çalışmada domuz yağı bazlı %45 yüksek yağlı diyet ile karşılaştırıldığında CAF diyetinin obezitenin ve inflammatuar sonuçları araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda erkek Wistar sıçanları 15 hafta boyunca yüksek yağlı diyet, CAF diyeti veya yem kontrol diyetleri ile beslenmiştir. CAF diyeti ile beslenen sıçanların vücut ağırlıklarının diğer gruplara göre oldukça fazla artış gösterdiği belirtilmiş, hiperinsülinemi, hiperglisemi ve glukoz intoleransının fazla yüksek olduğu tespit edilmiştir. CAF ve yüksek yağlı diyet uygulamalarının her ikisinde de karaciğerde ve deri altında yağlanma miktarında yüksek artış gözlemlenmiştir. CAF diyeti ile beslenen sıçanlarda kontrol grubuna ve yüksek yağlı beslenen gruba kıyasla daha yüksek kahverengi yağ, beyaz yağ ve karaciğerde inflamasyon saptanmıştır (Sampey ve ark., 2011).

Hamile kemirgenlere CAF diyetinin kullanıldığı bir çalışmada anne sıçanların gebelik ve emzirme süreçleri boyunca abur cubur tarzı yiyeceklerle beslenmeleri sağlanmıştır. Hamile sıçanlar protein oranı yüksek sağlıklı besinler yerine şekerli, yağlı, tuzlu olan yüksek kalorili besinleri tercih ettikleri gözlemlenmiştir. İncelemeler sonucunda

hamilelik sürecinde CAF diyeti ile beslenen annelerin yavrularında, normal ve dengeli beslenen annelerin yavrularına kıyasla yüksek hiperfaji gözlemlenmiştir. Ancak süttten kesilen yavrularda artık yüksek hiperfaji sergilenmediği gözlemlenmiştir (Bayol ve ark., 2007).

Yapılan bir çalışmada CAF diyeti uygulanarak organizmada biliş ve bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkisi araştırılmıştır. CAF diyeti uygulanmadan önce VSL probiyotik takviye edilmiştir. CAF diyeti ile beslenme sonucunda bağırsak florasındaki çeşitlilik azalmış, nöroplastisite ve serotonin reseptörü ile ilgili gen ekspresyonunu arttırdığı belirtilmiştir. Araştırma sonucunda VSL probiyotiklerin sağlıklı organizmalarda zarar gösterdiği belirtilirken CAF diyeti ile beslenen deneklerde yararlı olduğu araştırmacılar tarafından saptanmıştır (Beilharz ve ark., 2018).

CAF diyeti ile etkilenen dolaşım metabolitleri arasında lizofosfatidilkolinler en fazla bulunan metabolitler olduğu ve CAF diyeti ile beslenen sıçanlarda serum sfingolipidleri, safra asitleri, asilkarnitinler, doymamış yağ asitleri, E ve A vitamini türevleri de önemli ölçüde değiştiği belirtilmiştir. Elde edilen bulguların kalıcı sistematik inflamatuvar durumunun CAF diyeti ile indüklendiğinin belirteci olarak kabul edildiği vurgulanmaktadır. Ayrıca CAF diyeti ile beslenen sıçanların, monositkemoatraktan protein-1 serum seviyelerinin artmış olduğu ve eğitimli guruplarda C-reaktif proteinin azaldığı vurgulanmıştır. Buna ek olarak MetS'nin yararlı bir belirteci olan leptin/adiponektinoranı, CAF diyeti verilen guruplarda artmış, ancak antrenman yoğunluğu ile orantılı olarak azaldığı vurgulanmaktadır (Suárez-García ve ark., 2017).

Fiziksel aktivite, vücutta ROS oluşumunu tetikleyen etkenlerden biridir (Kahraman ve ark., 2003). Farklı alanlarda çalışmakta olan pek çok sporcunun vücutlarında ROS'ların saldırı gerçekleştirdiği ve oksidatif strese maruz kaldıkları gözlemlenmiştir. Bu gözlemler sonucunda oksidatif stresin azaltılması ve enfeksiyonel hastalıkların oluşumunun azaltılması çalışmanın temel amacıdır (Martarelli ve ark., 2011). Antrenman yapmakta olan sporculara dört hafta boyunca *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 ve *Lactobacillus paracasei* IMC 502 probiyotiklerinin oksidatif strese etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak sporcuların yoğun antrenmanları oksidatif stres oluşumuna sebebiyet verdiği ve probiyotik takviyesinin hücredeki ROS'ları nötr hale getirdiği ve plazma antioksidan seviyesini arttırdığı sonucuna varılmıştır. Probiyotiklerin canlıda doğrudan; enerjinin kullanılabilirliğini arttırdığı, bağırsak

mikrobiyotasını iyileştirdiği, besinlerin emilimini iyileştirdiği, kasta meydana gelen hasarı azalttığı, kısa zincire sahip yağ asitleri sentezini sağladığı saptanmıştır (Chen ve ark., 2016).

Obezitenin bir diyet modelinin sıçanlarda bağırsak sağlığı üzerine etkilerinin incelendiği bir araştırma yapılmıştır. Bu çalışmada kontrol grubundaki Zucker sıçanlara standart diyet uygulanırken diğer grupta yer alan Wistar sıçanlara CAF diyeti + standart diyet uygulanmıştır. Hem uygulanan diyet modeli hem de genetik obezitenin etkisiyle sıçanların vücut ağırlığında artış gözlemlenirken metabolik değişimlerinde meydana geldiği gözlemlenmiştir. CAF diyeti verilensıçanlarda ROS miktarında ve Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinde artış görülmüştür. CAF diyetinin; bağırsak iltihabını uyardığı, bağırsak homeostazında ve bağırsak geçirgenliğinde bozulmalara neden olduğu belirtilmiştir. Kontrol grubu sıçanlarda herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Gil-Cardoso ve ark., 2017).

Obezitenin böbrek hastalığının gelişimi üzerine bir araştırma yapılmış. Yapılan bu çalışmada CAF diyeti verilmiş, bu diyetin belirgin şekilde oksidan üretimini arttıran ve antioksidanları inhibe eden etkiye neden olduğu tespit edilmiştir. Plazmik ve sitoplazmik antioksidan seviyelerinde azalma olduğu açıkça gösterildi. Apoptotik yollar üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir. Obezite ile böbrek hasarı arasındaki ilişki oksidatif stres faktörlerinin etkisiyle oluşum gösterdiği belirtilmiştir. Meydana gelen tüm etkiler bergamotun polifenolik fraksiyonu ile tedavi edilerek azaltıldı (La Russa ve ark., 2019).

Yüksek enerjili (hiperlipidik) CAF diyetlerinin, glikoz oksidasyonunu sınırlandırdığı, insülin direncini indüklediği ve amino asit katabolizmasını düşürdüğü bilinmektedir. Ayrıca yüksek aminoasit alımına rağmen, amino asitlerin kullanılmadığı ve üre atılımının azaltıldığı vurgulanmaktadır. CAF diyetinin üre döngüsü ve amonyum kullanımını nasıl etkilediğinin araştırıldığı bu çalışmada 30 gün süre ile CAF diyeti ve normal diyet ile beslenmiştir. Sonuçlarda Enzim aktiviteleri, üre döngüsü ve amonyum metabolizmasının ifadeleri üzerinde dikkate değer bir sabitlik olduğu belirtilmiştir. Üre döngüsünü kontrol eden anahtar enzimler: karbamoil-P-sentaz-1, arginino-süksinatsentaz ve arginaz ifadelerinin diyetle azaldığı belirlenmiştir. Amonyum işleme enzim aktivitelerinde ve ifadelerinde gözlemlenen etkiler, karaciğer amino asit katabolizmasının paralel ancak düşük regülasyonunu gösterdi ve üre döngüsüne benzer olduğu ifade edilmiştir (Schmidt ve ark., 2018).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

KİMYASAL	ŞİRKET
Agaroz DNase-RNase-Proteasefree	Sigma
Bakır Klorür ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma
1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen (CDNB)	Sigma
Ditiyotritol (DTT)	Sigma
Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)	Sigma
Etanol	Riedel de Haen
Hidrojen Peroksit (%30'luk H_2O_2)	Sigma
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma
Potasyum Fosfat (KH_2PO_4) Monobazik	Sigma
Nikotin Amid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH)	Sigma
Nitro Blue Tetrazolium Chloride (NBT)	Carlo Erba
Okside Glutasyon (GSSG)	Sigma
Fenilmetansülfonilflorür (PMSF)	Sigma
Redükte Glutasyon (GSH)	Sigma
Serum Albumin	Carlo Erba
Sodyum Barbitalin ($\text{NaC}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$)	Sigma
Seyreltik NaOH ve HCl	Atabay
Sodyum Azid (NaN_3)	Carlo Erba
Sodyum Fosfat (Na_3PO_4)	Sigma
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma
Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	Carlo Erba
Trizma Base	Sigma

3.2. Tez Kapsamında Kullanılan Materyal ve Cihazlar

Çizelge 3.2 Tez çalışmasında yararlanılan ekipmanlar, sarflar ve cihazlar

1	1, 1,5 ve 3 mL’lik Kuvarz Küvetler	: Merck
2	1,5-2 m’lik Tüpler ve Raklar	: Eppendorf
3	15 mL’lik Falkon Tüpler ve Raklar	: Eppendorf
4	Çeker Ocak	: Space Series Fume Cupboard
5	Derin Dondurucu (-86)	: New Brunswick Premium U410
6	Derin Dondurucular (-20)	: Vestel FT 280, Siemens
7	Destile Su Üretme Cihazı	: mp MINI Pure
8	Hassas Terazı	: Denver Instrument
9	Homojenizatör	: Qiagen Tissue Lyser LT
10	Manyetik ısıtıcı	: LabLine
11	Magnetik Karıştırıcı	: Wids Wise Stir MSH-20A
12	Mikropipet Takımı	: Brand
13	Mini Santrifüj	: AOSHENG
14	Nanodrop	: Thermo Scientific Multiscan GO USA
15	Otoklav	: HMC HIRAYAMA
16	PCR	: Sensoquest, Labcycler
17	pH Metre	: MettlerToledo
18	Real-Time PCR	: Qiagen Rotor Gene 5 plex
19	Soğutmalı Santrifüjler	: Hettich Mikro 220R
20	UV Spektrofotometre	: BeckmanCoulter
21	Vorteks	: WidsWiseMix VM-10

3.3. Tez Kapsamında Yapılan Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Çizelge 3.3 Tez çalışması sırasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

1.	%0,042'lik Hidrojen Peroksit (H₂O₂) çözeltisi	7 µL %30'luk H ₂ O ₂ saf su ilave edilerek seyreltme işlemi yapıldı toplam hacim 5 mL'ye tamamlandı. +4°C'de muhafaza edildi.
2.	0,5 EU/mL Glutasyon redüktaz (GR) çözeltisi	500 EU/mL'lik 20 µL GR saf su ilave edilerek seyreltildi toplam hacmi 20 mL'ye tamamlandı. +4°C'de muhafaza edildi (taze kullanıldı).
3.	50 mM Sodyum Fosfat (NaH₂PO₄) tampon çözeltisi (0,4 mM EDTA'lı)	0,6 g NaH ₂ PO ₄ 80 mL saf su ile çözülüp pH'ı 7'ye ayarlandı. Daha sonra içinde 0,0148 g EDTA çözüldü. Ardından pH kontrolü yapılarak toplam hacmi saf su ilave ile 100 mL'ye tamamlandı. +4°C'de muhafaza edildi.
4.	0,8 mM Bakır II Klorür (CuCl₂.2H₂O) çözeltisi	0,004 g CuCl ₂ .2H ₂ O'e 100 mL saf su ilave edilerek çözülmesi sağlandı. +4°C'de muhafaza edildi.
5.	1 mg/mL BSA	1 mg/mL (1:1) oranında 0,03 g Serum Albümin'e 30 mL saf su ilave edilerek çözünmesi sağlandı. +4°C'de muhafaza edildi.
6.	1 mM DTT çözeltisi	0,59 mg DTT tartılarak daha önce hazırlanmış olan 50 mM 30 Tris-HCl tamponu ilave edilerek çözüldü. +4°C'de muhafaza edildi.
7.	1 mM PMSF çözeltisi	0,0087 g PMSF, 1 mL propanol ile çözüldü. +4°C'de muhafaza edildi. Daha önce hazırlanmış olan 50 mM Tris-HCl tamponu içinde kullanıldı.
8.	100 mM Potasyum Fosfat (KH₂PO₄) tampon çözeltisi (3,4 mM EDTA'lı)	0,068 g KH ₂ PO ₄ 'a 40 mL saf suda çözüldü. Üzerine 0,0497 g EDTA eklendi. pH 7,6'ya ayarlandı. Toplam hacmi 50 mL'ye tamamlandı. +4°C'de muhafaza edildi.
9.	6 mM 5,5'ditiyobis 2 nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi	4,7 mg DTNB 2 mL saf su içinde çözülerek hazırlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi.
10.	1 mM Sodyum Azid (NaN₃) çözeltisi	0,0081 g NaN ₃ , 50 mM'lık 250 mL Sodyum Fosfat tamponu (0,4 mM EDTA'lı) ilave edilerek çözünmesi sağlandı. +4 °C'de muhafaza edildi.
11.	2 mM NADPH çözeltisi	1,66 mg NADPH, 1 mL saf su içinde çözülerek hazırlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi.
12.	20 mM GSSG çözeltisi	0,012 g GSSG, 1 mL saf su içinde çözüldü ve +4 °C'de muhafaza edildi.
13.	200 mM GSH çözeltisi	3,07 g GSH tartılarak 50 mL saf su içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldü. Ardından +4°C'de muhafaza edildi.
14.	25 mM CDNB çözeltisi	10,2 mg CDNB 2 mL saf su içinde çözüldü ve +4 °C'de muhafaza edildi.
15.	200 mM Potasyum Fosfat (KH₂PO₄) tampon çözeltisi (50 mM EDTA'lı)	2,83 g Na ₂ CO ₃ , 40 mL saf su içinde çözüldü. İlave edilerek çözünmesi sağlandı. 0,73 g EDTA eklenip pH'ı 7 yapıldı. Toplam hacim 50 mL yapıldı ve +4 °C'de muhafaza edildi.
16.	50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi (1 mM EDTA'lı)	0,18 g Trizma Base 25 mL saf su içinde çözüldü. pH'ı 7,6 yapıldı. Hazırlanan çözeltiliye 0,0087 g EDTA eklenip çözüldükten sonra pH kontrolü yapıldı. Toplam hacim 30 mL ye tamamlandı.

17.	600 mM Potasyum Fosfat (KH_2PO_4) tampon çözeltisi	4,08 g KH_2PO_4 20 ml saf su içinde çözöldü. pH'ı 7,3'e ayarlandı. Toplam hacmi 30 mL'ye tamamlandı. +4 °C'de muhafaza edildi.
18.	Bradford (Coommassie Blue) çözeltisi	50 g Coommassie-Brillant Blue G-250, %95'lik 25 mL etanol ilavesiyle çözöldü. Hazırlanan çözeltiye %85'lik 50 mL fosforik asit çözeltisi ilave edildi. Hazırlanan çözeltinin toplam hacmi saf su ilavesiyle 300 ml'ye tamamlandı. Alüminyum folyo ile kaplanmış şekilde +4°C'de muhafaza edildi.
19.	100 U/mL'lik Glutasyon Redüktaz (GR) çözeltisi	500 U/mL'lik ticari olarak satın alınan GR'den 200 µL alınarak bir tüp içinde saf su ile 1000 µL'ye tamamlayarak elde edildi ve +4 °C'de muhafaza edildi.
20.	10 mM Sodyum Fosfat (NaH_2PO_4) tampon çözeltisi (1 mMDTT'li)	0,06 g NaH_2PO_4 , 40 mL saf su içinde çözöldü. Üzerine 0,885 mg DTT eklendi. pH'ı 7,0'a ayarlandı. Çözeltinin toplam hacmi 50 mL'ye tamamlanıp +4 °C'de muhafaza edildi.
21.	20 mM GSH çözeltisi	6 mg GSH alınarak 1 mL saf suda çözölerek hazırlandı.
22.	%1.15 KCl çözeltisi	1,15 g KCl tartılır ve %15 olacak şekilde uygun hacimde destile suda çözölür.
23.	%0.8 TBA çözeltisi	0,8 g TBA tartılır ve 100 mL destile suda çözölür.
24.	%20 asetik asit çözeltisi	Stok asetik asit destile su ile %20 olacak şekilde seyreltilerek hazırlanır.

3.4. Hayvan Deneylerinin Dizaynı ve Doku Alımı

Bu tez çalışması Wistar sıçan karaciğerleri üzerinde gerçekleştirildi. Sıçanlar Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanan etik kurul raporu ile Bingöl Üniversitesi'nden temin edildi. Sütten kesilmiş 21 günlük sıçanlar, her grupta yedişer olmak üzere rastgele şekilde 4 gruba ayrıldı. Tüm hayvanlar, standart hayvan bakım protokollerine uygun olarak barındırıldı. Hayvan deneyleri etik kurul raporu Şekil 3.1'de verilmiştir. Gruplar, Kontrol grubu (n=7), kafeterya diyeti grubu (n=7), SCD Probiotics ile desteklenmiş kafeterya grubu (n=7) ve SCD Probiotics grubu (n=7) olmak üzere 4 gruptan oluşmaktadır. Çalışmada kullanılan grup isimleri ve beslenme şekilleri Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4 Kontrol ve deney grupları beslenme uygulamaları ve içerikleri

Gurup adı	Beslenme şekli
Kontrol	Wistar erkek sıçanlar 21 günlük iken alınarak 56. güne kadar normal kemirgen diyeti ile ad libitum olarak beslendi.
CAF	Wistar erkek sıçanlar 21 günlük iken alınarak 56. güne kadar normal kemirgen diyeti ve Kafeterya diyeti (CAF) ile beslendi.
CAF+Prob	Wistar erkek sıçanlar 21 günlük iken alınarak 56. güne kadar ad libitum normal kemirgen diyeti ve kafeterya (CAF) diyetine ek olarak günde 1,5 mL (1×10^8 CFU) dozunda SCD Probiotics ile beslendi.
Prob	Wistar erkek sıçanlar 21 günlük iken alınarak 56. güne kadar normal ad libitum kemirgen diyetine ek olarak günde 1,5 mL (1×10^8 CFU) dozunda SCD Probiotics ile beslendi.

Uygulamalar, gelişim döneminin sonu kabul edilen 56. güne kadar devam etti. SCD Probiotics, günde 1,5 mL (1×10^8 CFU) dozunda gavaj yolu ile verildi (Ceylani, 2023). Çalışmada probiyotik takviyesi olarak SCD Probiotics şirketi tarafından piyasaya sürülen bir ürün (Temel Probiyotikler XI - 500 ml H.S. Kod: 2206.00.7000) kullanıldı. SCD Probiotics içeriği, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Streptococcus thermophilus* türlerini içermektedir. Hayvanların standart bir kemirgen diyeti ile beslenmelerinde herhangi bir kısıtlama yapılmadı. Normal ad libitum beslenmeye ek olarak sağlanan kafeterya diyeti içeriği ve kalori değerleri Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5 CAF diyeti bileşenleri

	Malzemeler (100g)	Toplam kcal	Toplam yağ (g)	Toplam Karbonhidrat (g)	Protein (g)	Şeker (g)
KONTROL DİYETİ	SC 7001 (Harley)	382	4	54	25	0
KAFETERYA DİYETİ	Krakerler					
	Çay Keyfi (Eti)	462	20.4	67.8	5.8	28.5
	Kurabiyeler					
	Hoşbeş (Eti)	493	24.5	63.9	7.6	28.5
	Hanımeller (Ülker)	427	18.1	62.1	3.9	25.0
	Nestlé Crunch	500	26	67	5	55
	Gevrek					
	Nesquik Mısır Gevreği (Nestle)	372	4.1	76.1	7.6	30.7
	Cipsler					
	Lays Wavy (Frito-Lay)	536	36	54	7	0
	Lays Klasik (Frito-Lay)	529	33	51	7.0	0
	Doritos (Frito-Lay)	491	24.5	60.5	7.2	2.3

Deney boyunca, hayvanların ağırlıkları, haftalık gıda tüketimleri ve kafeterya diyet içeriğinin ölçümleri kaydedildi. Kontrol ve deney gruplarında bulunan hayvanlar, uygulamanın sona ermesinin ardından bir gün sonra hafifçe eter ile sersemletildi ve feda edildi. Karaciğer dokuları çıkarıldı, kuru buz üzerinde şoklandı ve analiz zamanına kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Bu tez çalışması -80°C'de muhafaza edilen karaciğer dokuları ile yapılmıştır.



T.C
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

Toplantı Tarihi: 29.06.2021	Toplantı Sayısı: 2021/03	Karar Sayısı: 03/01
Muş Alparslan Üniversitesi TBMYO Gıda İşleme Gıda Kalite Kontrol ve Analizi Programında görevli Dr. Öğr. Üyesi Taha CEYLANI tarafından sunulan “Gelişim dönemi boyunca kafeterya diyeti uygulanan wistar ratların davranış ve bağırsak antimikrobiyal peptit gen ifadeleri üzerinde probiyotik bakterilerin etkisi” başlıklı araştırma projesi başvurusu etik yönden değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda projede Bingöl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından uygun olduğuna ve aşağıdaki hususlar göz önüne alınarak yürütülmesine oy birliği ile karar verilmiştir. 1. Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması 2. Projede çalışacak olan araştırmacılar ile ilgili değişikliklerde kurulumuzdan onay alınması 3. Çalışma belirtilen sürede tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması 4. Çalışma bitiminde sonuç raporunun gönderilmesi		
 Prof. Dr. Bâhri PATİR Başkan	 Doç. Dr. Metin GÜRÇAY Başkan Yardımcısı	
 Doç. Dr. Hakan İNCİ Üye	ARAŞTIRMACI Dr. Öğr. Üyesi Aykut ULUCAN Üye	 Vet. Hekim Perihan AÇIK BÜDAM Sorumlu Veteriner Hekimi
ARAŞTIRMACI Arş. Gör. Emre ŞAHİN BÜHADYEK Sekreteri	 Mustafa KARAAARSLAN STK	 Nihat KORLAELÇİ Sivil Üye

Şekil 3.1 Hayvan deneyleri yerel etik kurul raporu

3.5. TotalRNA İzolasyonu

Kontrol ve deney gruplarından elde edilen karaciğer dokularından öncelikli olarak cDNA kütüphanesi hazırlandı. Bu amaçla total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyonu Invitrogen şirketinden satın alınan (Pure Link RNA Mini Kit, Cat. No: 12183020) kit protokolüne göre gerçekleştirildi.

Bu protokole göre total RNA izolasyonu özet olarak Çizelge 3.6’da görüldüğü şekilde gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6 Pure Link RNA Mini Kit ile RNA izolasyon protokolü

Doku Homojenizasyonu	a. Daha önce -80 °C’de bulunan karaciğer dokuları 100 mg’dan küçük olacak şekilde tartıldı ve 2 mL’lik plastik vidalı tüplere konuldu ve üzerine uygun miktarda eşit sayıda zirkonyum parçalayıcı ilave edildi. b. Her 1 mg doku için 5 µL hacminde 2-merkaptoetanol içeren lizis tamponu ilave edildi. Daha sonra 40 Hz 3+3 dk olarak 2 periyot halinde homojenizör (INOVA TProH-6000) yardımıyla dokular parçalandı. c. 1200xg de 2 dk süreyle tüpler santrifüj edildi. d. Santrifüj sonrasında lizat kısmı temiz RNase-free tüplerin takılı olduğu homojenizere aktarıldı ve 12000xg de 2 dk süreyle santrifüj edildi ve homojenizer kaldırıldı.
RNA bağlama	a. Lizat ile aynı hacimde olacak şekilde RNase-free tüplerdeki doku lizatın üzerine %70’lik etanol aktarıldı. b. Etanol eklendikten sonra herhangi bir çökelme olma ihtimaline karşı örnek vortekslenerek muhtemel çökeltilerin dispers olması sağlanır. c. Yaklaşık 700 µL miktarında homojenat spin cartridge toplama tüpüne aktarıldı. d. Örnek 12000xg de 15 sn süreyle oda sıcaklığında santrifüj edildi. e. Kolon altına geçen toplama tüpündeki sıvı atılır ve aynı toplama tüpü yeniden takılır. f. c ve d şıklarında yapılan uygulama tekrarlanır.
RNA yıkama	a. Spin cartridge tüpleri üzerine 700 µL yıkama solüsyonu I eklenir. b. 12000xg de 15 sn oda sıcaklığında santrifüj edilir. c. Toplama kabı dökülür ve yeniden bir toplama tüpüne takılır. d. Üzerine etanol içeren 500 µL yıkama solüsyonu II eklenir. e. 12000xg de 15 sn santrifüj edilir ve kolondan geçen sıvı atılır ve aynı tüp yeniden takılır. Bu işlem bir defa daha tekrarlanır.
RNA elüsyonu ve eldesi	a. Spin cartridge toplama tüpü 12000xg de 1 dk süreyle santrifüj edilir. b. Toplama tüpü atılır ve spin cartridge yeni kurtarma tüpüne takılır. c. Spin cartridge üzerine RNase-freewater’dan 30 µL eklenir. d. Oda sıcaklığında 1 dk kadar inkübe edilir. e. Daha sonra 12000xg de 2 dk kadar santrifüj edilir. f. Spin cartridge altında toplama tüpünde total RNA elde edilmiş olur.

3.6. Genlere ait cDNA’ların hazırlanması

Wistar sıçanlardan toplanan karaciğer dokularından glutatyon döngüsü *Gpx*, *Gr* ve *Gst* genlerine ait cDNA’lar hazırlandı. cDNA kütüphanesi BioLabs şirketinden sipariş edilen Proto Script First-Strand cDNA sentez kit’i kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Bu protokolde takip edilen yol ayrıntılı olarak şu şekilde açıklanabilir.

Kit'te Bulunan Bileşenler

M-MuLV Enzyme Mix (10X)

M-MuLV Reaction Mix (2X)

Oligo d(T)23 VN* (50 µM)**

Random Primer Mix (60 µM)**

Nuclease-free H₂O

*V = A, G, C; N = A, G, C yada T **İçeriği 1 mM dNTP

- Kit bileşenleri çözülür ve buzda bekletilir.
- DNA kontaminasyonu kontrolü yapabilmek kit içerisinde revers transkriptaz enzimi bulundurmeyen bir kontrol örneği bulunmaktadır.

Buna göre;

1. İzole edilen RNA örneği ve primer d(T)23VN, RNase bulundurmeyen steril 0.2 mL'lik bir tüpte karıştırılır. Kullanılan RNA örneği hacmi elde edilen konsantrasyona göre aşağıdaki tabloda verildiği gibi 1-6 µL aralığında değişkenlik gösterir.

Örnek bileşenleri	Miktar
Total RNA	1–6 µl
d(T)23VN (50 µM)	2 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	Değişken
Toplam hacim	8 µl

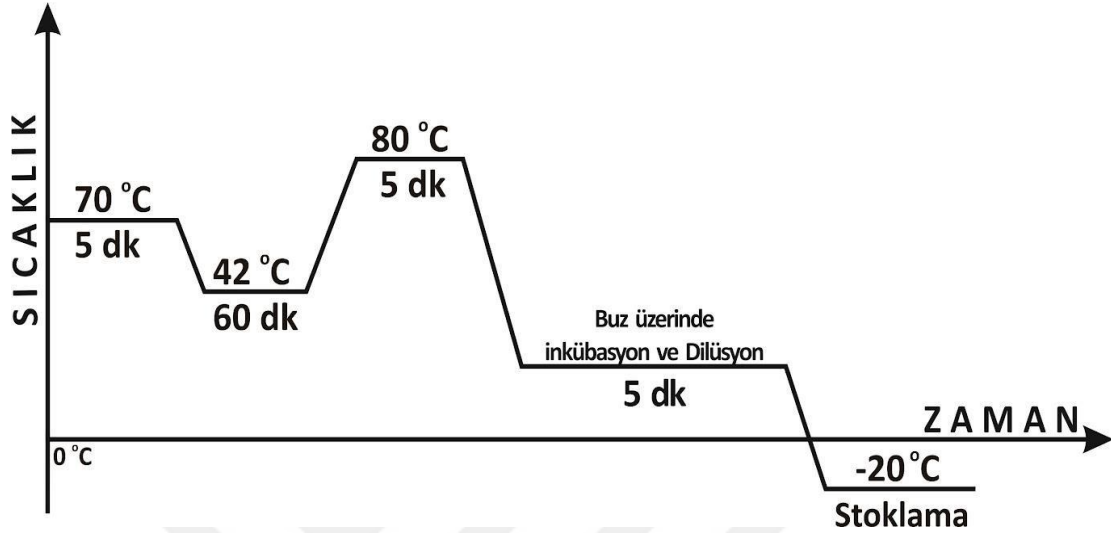
2. Hazır hale gelen RNA örnekleri 70°C'de 5 dakika bekletilerek denatüre edilir.
3. Ardından 5 dk buz üzerinde bekletildikten sonra kısa bir spin santrifüj yapılır. (GC oranı yüksek olan ve uzun mRNA'lar bulunduran RNA kısımları cDNA verimini arttırmaktadır.)
4. Ardından aşağıdaki tabloda verildiği gibi örnekler üzerine 10 µl M-MuLV Reaksiyon karışımı ve 2 µl M-MuLV Enzim karışımı negatif kontrol üzerine ise 10 µl M-MuLV Reaksiyon karışımı ve 2 µl Nükleaz içermeyen H₂O eklenir.

Bileşenler	Örnekler	Negatif kontrol
M-MuLV Reaksiyon karışımı	10 µl	10 µl
M-MuLV Enzim karışımı	2 µl	-
Nükleaz içermeyen H ₂ O	-	2 µl

5. Toplamda 20 µl hacme sahip olan örnekler, cDNA sentez reaksiyonunun gerçekleşmesi için 42°C'de 60 dakika inkübasyona bırakılır. (Eğer random primer karışımı kullanılırsa öncesinde 25°C'de 5 dakika inkübasyon daha sonrasında 42°C'de bir saat inkübasyon işlemi uygulanır.)
6. Daha sonra örnekler 80°C'de 5 dakika inkübe edilerek enzim inaktif hale getirilir.

7. Ardından elde edilen cDNA üzerine 30 µl nükleaz free H₂O eklenerek elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de muhafaza edilmelidir.

cDNA sentezi aşaması Sensquest H976c4-7-0 Labcycler PCR cihazı yardımıyla Şekil 3.2'de verilen döngü takip edilerek gerçekleştirildi

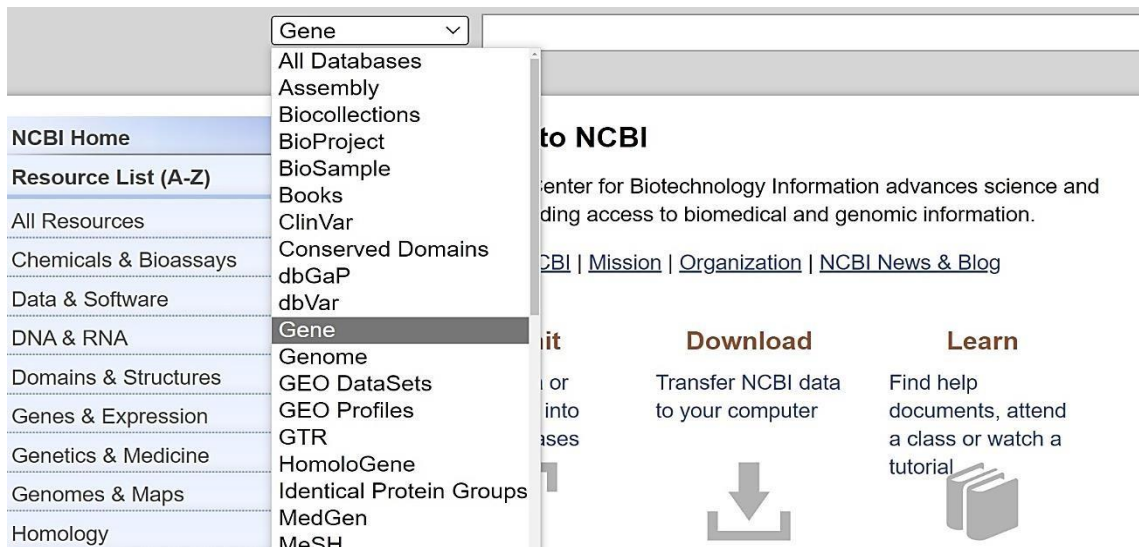


Şekil 3.2 cDNA sentezinde kullanılan termal protokol

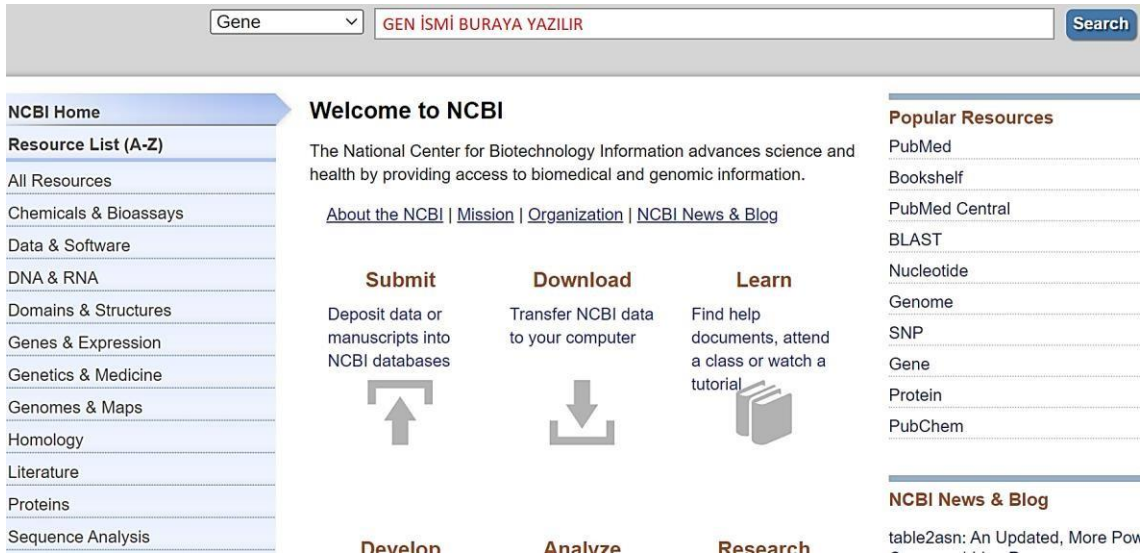
3.7. Primerlerin tasarlanması

3.7.1. Primer tasarlamak için gen sekansına ulaşılması

Tez çalışması sırasında gerçekleştirilerek mRNA ekspresyon çalışmaları için *Gst*, *Gpx*, *Gr* gen bölgelerine ait primerler tasarlandı. Bu amaçla [National Center for Biotechnology Information \(nih.gov\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (NCBI) databazından faydalandı (Şekil 3.3).

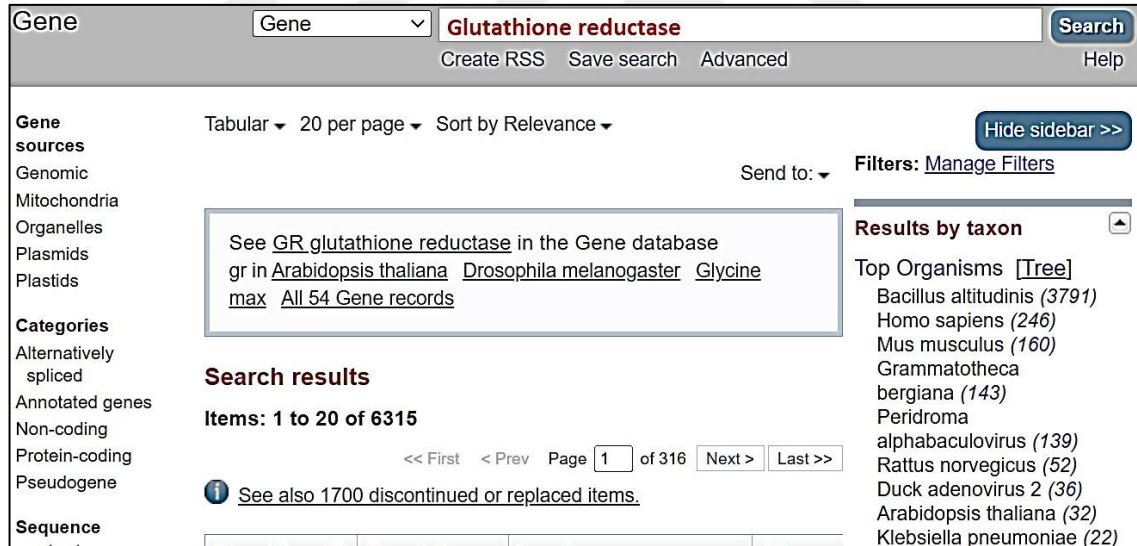


Şekil 3.3 Primerleri tasarlamak için kullanılan NCBI database



Şekil 3.4 Aradığımız geni yazacağımız NCBI sayfası

NCBI sayfasından “All databases” kısmından “Gene” seçildi (Şekil 3.4). Arama kısmına genin uzun veya kısa ismi ya da erişim numarası yazılıp “search” butonuna basılarak organizma seçim bölümüne ulaşıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Organizma seçim sayfası

Şekil 3.5’te belirtildiği gibi organizma seçimi sayfası kullanılarak ilgili genin çalışılacağı organizma seçimi yapılır. Bu çalışmada kullandığımız organizma Wistar sıçanları olduğu için bu bölümde “Rattus norvegicus” seçildi.

Çalışılan genin hangi organizmada tarandığını belirten Şekil 3.5’te gösterildiği üzere arama boşluğuna “aradığımız gen” yazılıp “search” butonuna butonuna tıklayarak

genin organik baz ve protein sekansı sayfasına erişildi (Şekil 3.6). Anlatımda örnek olması açısından *Gr* gen ismi kullanılmıştır.

The screenshot shows the NCBI Gene database search results for the query "(Gr) AND 'Rattus norvegicus'[porgn: __txid10116]". The search results are displayed in a tabular format, showing 52 items. The first three items are listed:

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
☐ Nr3c1 ID: 24413	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 [<i>Rattus norvegicus</i> (Norway rat)]	Chromosome 18, NC_051353.1 (31271681..31393320, complement)	GR, Gcr, Grl
☐ Gsr ID: 116686	glutathione-disulfide reductase [<i>Rattus norvegicus</i> (Norway rat)]	Chromosome 16, NC_051351.1 (58482209..58525256, complement)	
☐ Camk4	calcium/calmodulin-	Chromosome 18,	Ccdpk,

The search results also include a sidebar with filters, a search bar, and a "Find items" button.

Şekil 3.6 İlgili genin özelliklerinin belirtildiği NCBI sayfası

Ulaşılan sayfada NM ile başlayan gen sekans kodu (NM_...) ve NP ile başlayan protein sekansı kodu (NP_...) bağlantıları yer almaktadır (Şekil 4.7). NM... ile başlayan linke tıklayarak Şekil 3.8’de gösterilen gen sekansına ulaşıldı.

The screenshot shows the NCBI protein page for NP_446358.2, glutathione reductase. The page includes the following information:

NM_053906.2 → NP_446358.2 glutathione reductase

See identical proteins and their annotated locations for NP_446358.2

Status: VALIDATED

Source sequence(s) [CK357934](#), [FM035154](#), [JACYVU010000283](#)

UniProtKB/TrEMBL [A6IVS9](#), [F1LRE1](#)

Related [ENSRNOP00000084963.1](#), [ENSRNOT00000094128.1](#)

Conserved Domains (3) summary

Domain	Location	Description
TIGR01421	Location:1 → 410	gluta_reduc_1; glutathione-disulfide reductase, animal/bacterial
pfam00070	Location:121 → 197	Pyr_redox; Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase
pfam02852	Location:300 → 408	Pyr_redox_dim; Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase, dimerization domain

Şekil 3.7 İlgilenilen genin gen ve protein sekansı NCBI veritabanı

Gen sekansının görüntülendiği sayfada ekzon ve intronların bulunduğu genin tam sekansı gösterilir. Sayfada görünen sekans 10 bazlık gruplar halinde gösterilir. Sayfada bulunan CDS linki ile ilgilenilen genin kodlanan bölgeleri işaretlenebilir. Primer tasarımının kolaylık ağırlaması açısından aynı sayfada bulunan FASTA seçeneği sayesinde bu gruplar arasındaki boşluklar yok edilebilir (Şekil 3.8).

Rattus norvegicus glutathione-disulfide reductase (Gsr), mRNA

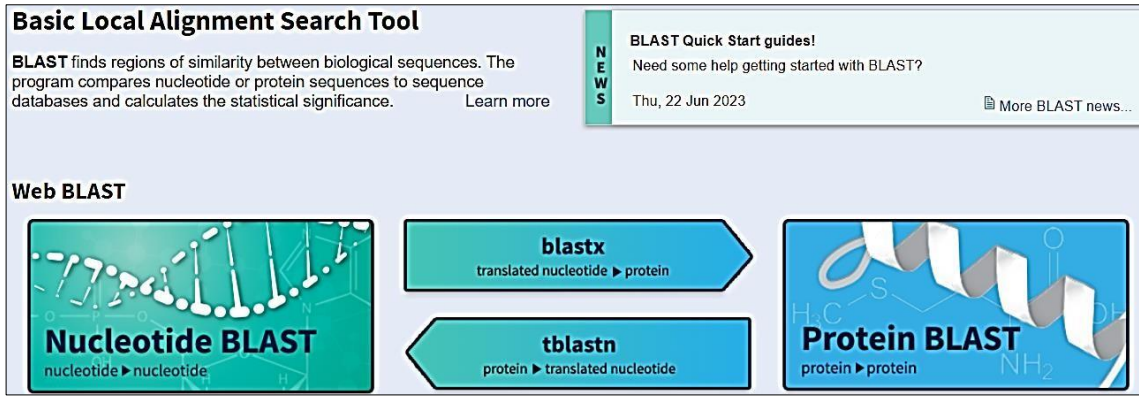
NCBI Reference Sequence: NM_053906.2

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>NM_053906.2 Rattus norvegicus glutathione-disulfide reductase (Gsr), mRNA
AGAGTCACAAGCTGGGCGGCACTTGCCTGAACGTTGGATGTGTACCCAAAAAGGTAATGTGGAACACAGC
CGTGCACTCGGAATTCATACATGATCACGTGGATTACGGCTTTCAAAGTGAAGTAAATTCAATTGG
CATGTCATCAAGGAGAAGCGGGATGCTTACGTGAGCCGCTGAACAACATCTACCAAAACAATTTAACCA
AGTCCCACATCGAAGTCATCCACGGCTACGCAACATTTGCAGATGGTCCCCAGCCACAGTGGAAAGTCAA
CGGGAAGGTTCACTGCTCCACACATCCTGATCGCCACGGGTGGTGTGCCACGGTTCCTCATGAGAAC
CAGATCCAGGTGCCAGCCTGGGGATAACCAAGTGTGGGTTCTTTCAGTGGAAGACTTGCCAGCCGCA
GCGTTATTGTGGGTGCCGTTACATTGCCGTGGAGATTGCGGGCATCTCTCCGCCCTGGGCTCCAAGAC
GTCTCTTATGATCAGGCATGATAAGGTGCTTAGAAGCTTTGATTCACTCATCAGTTCCAATGCACCGAG
GAGCTGGAGAACGCTGGCGTGGAGGTGTTGAAGTTCTCACAGGTTAAGGAAGTAAAGAAGACCCATCGG
GCTTGGAACTCCATGTGGTTACTGCACTTCCCGGTAGGAAACCCACCGTGACCACGATTCCAGATGTCGA
TTGCCTGCTCTGGGCCATTGGACGGGACCCAAATTCTAAGGGCCTGAATCTAAATAAAGTGGGATTGAG
ACTGATGACAAAGGCCATATCCTAGTGGACGAGTTCCAGAATACCAATGTCAAAGGCGTCTATGCCGTGG
GCGATGTCTGTGGGAAAGCACTTCTACCCAGTTGCGATCGCTGCTGGCCGGAACCTGCCCATAGACT
TTTTGAGGGCAAGAAGATTCCAGGTGGACTATGACAACATCCCTACCGTGGTCTTCAGCCACCCGCT
ATCGGGACAGTGGGGCTCACTGAAGTGAAGCCGTCCTAAGTATGGCAAAGACAATGTGAAATCTACT
CGACCGCCTTACCCCGATGTATCAGCTGTGACCACGAGGAAGACGAAATGCGTGATGAAGATGGTTTG
TGCCAACAAGAGGAGAAGGTGGTTGGCATCCATATGCAGGGGATTGGCTGCGATGAGATGCTTCAGGGC
TTCGCTGTAGCAGTGAAGTGGGGGCCACCAAGGCCGACTTCGACAATACGGTCGCCATTATCCTACCT
CTTCAGAAGAGCTGGTCACACTGCGCTGAGAGCCCCGGGACTCGTGGCTAGCGGTCCGACCAGTGGGCT
CTGGGAGGAACCAATCAAGTTTACGCTCTGCGCCAGCTTTATAGATTTCTGTATTTTAAATCAGGAATTC
TGGTGGTGTAAATTTCTAGTTAAGCAAAAATCGAGGTCTTAAGTGTCTAATCATAAGGTTGTTTGTTA
ATCCGGGGTTGGTTTTCATGTGATAATTTTACACTAGTTAGCATTTTGATTTTTTTTTTAATTAAACAG
CCTGTGTTCTTTGTGTTTTCTTGTCTTGGCCTCATTCCAAGTTTAAATATATGAAGTACACGGAAGTTA
GCACACCTGACGGATGACTATAGCAGCTAATTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGACGCCAGGGTAAGCTCA
AACAACTCAAAATCTCCAGCTACAGCCTCATGAGCGCTGCAGTTCTGGGCATGCGTGCCCTCTCCCGGC
CTAGCTTGCTAGTTTTATATGATGGTAAGTCTCCATCTATAAATATGCAAGTGTACAGAATACATGTGTG
CTTTTCGACCTGGTGTCTGTATGGGAAA
```

Şekil 3.8 İlgili organizma genine ait FASTA sayfası

Bu aşamada qPCR çalışmasında mRNA ekspresyon seviyeleri araştırılacak olan bu genin sekansının tamamı kopyalanarak Şekil 3.9’da gösterilen blastlama sayfası aracılığıyla nükleotid blastlama çalışması gerçekleştirilebilir. Yapılan bu işlem sayesinde bu genin başka hangi organizma genleri ile ne ölçüde homoloji gösterdiği saptanabilir.



Şekil 3.9 Çalışılan gen sekansının homolojisinin kontrol edildiği database

Bu çalışmada öncelikli olarak blastlama yapılarak başka genler ile homoloji oranları belirlendi. Bunun için kopyalamış olduğumuz sekans Şekil 3.10’da gösterilen databaseda “Add organism” kullanılarak blastlama yapıldı. Blastlama basamağı tasarlanacak primerlerin spesifik olarak sadece araştırılacak olan genin çoğaltılabilmesi açısından önemlidir. Bu nedenle blastlama işlemi gerçekleştirilmelidir. Blastlama ile homolojinin araştırılması sonrası başka genler ile örtüşmeyen bölgelerden primer tasarlanır. Bunun amacı daha önce de açıklanmaya çalışıldığı üzere Real-Time PCR aşamasında başka genlerin çoğaltılmasını engellemek vesadece ilgilenilen genin spesifik olarak çoğaltılmasını sağlayarak araştırma sonuçlarının güvenilirliğini arttırmaktır.

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#) [Clear](#)

Query subrange [?](#)

From

To

Or, upload file Seçilen dosya yok [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

☐ Align two or more sequences [?](#)

Choose Search Set

Database ☒ Standard databases (nr etc.): ☐ rRNA/ITS databases ☐ Genomic + transcript databases ☐ Betacoronavirus

New ☐ Experimental databases [Try experimental taxonomic nt databases](#) [Downl](#)

For more info see [What are taxonomic nt databases?](#)

Nucleotide collection (nr/nt) [?](#)

Organism Optional ☐ exclude [Add organism](#)

Şekil 3.10 Gen sekansının homoloji kontrolü yapıldığı blastlama ekranı

Homoloji bölgeleri işaretlenmiş olan ilgilenilen genin homoloji göstermeyen bölgelerinden yaklaşık olarak 700-1000 bazlık dizilimler seçilir ve primer tasarımı için [Primer3 Input](#) sayfasına gidilir. Açılan bu sayfada yapılacak olan Real-Time PCR metoduna uygun olarak primer TM sıcaklıkları ve primer sekans uzunlukları, üretilecek olan ürün uzunlukları, prob kullanılıp kullanılmayacağı gibi çeşitli özellikler arasında istenilen ayarlamalar yapılır. Bu çalışmada Sybergreen metodu kullanılacağından dolayı Şekil 3.11’de gösterildiği gibi uygun ayarlamalar gerçekleştirilerek “pick primer” linki tıklandı. Database tarafından önerilen primerler arasında amacımıza uygun olan primerler ROCHE firmasından sipariş edildi (Çizelge 3.8). Çalışmamızda kullandığımız genlerimizin çoğaltılmasına yönelik kullanacağımız yönteme uygun olarak tasarlamış olduğumuz primerlerimizin özelliklerinin optimum değer aralıkları Çizelge 3.7’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.7 Primerin tasarımı için optimum değer aralıkları

	Minimum baz uzunluğu	Optimum baz uzunluğu	Maksimum baz uzunluğu
Ürün boyutu	50	100	150
Primer boyutu	19	20	21
Primer TM	59	60	61
Primer %GC	45	50	55
Primer MaxPoly-X		3	

General Primer Picking Conditions

Upload the settings from a file Seçilen dosya yok

Primer Size Min Opt Max

Primer Tm Min Opt Max Max Tm Difference [Table of thermodynamic](#)

Product Tm Min Opt Max

Primer GC% Min Opt Max

Product Size Ranges

Number To Return Max 3' Stability

Max Library Mispriming Pair Max Library Mispriming

Thermodynamic Secondary Structure Alignments	Old Secondary Structure Alignments
☒ Use Thermodynamic Oligo Alignment	
TH: Max Self Complementarity 45.0	Max Self Complementarity 8.00
TH: Max 3' Self Complementarity 35.0	Max 3' Self Complementarity 3.00
TH: Max Pair Complementarity 45.0	Max Pair Complementarity 8.00
TH: Max 3' Pair Complementarity 35.0	Max 3' Pair Complementarity 3.00
TH: Max Primer Hairpin 24.0	

Şekil 3.11 Primerlerin optimum özelliklerinin girildiği NCBI database

Tasarlanan Primerlerde A-T (Adenin-Timin) nükleotidleri ile başlayıp G-S (Guanin-Sitozin) nükleotidleri ile bitiyor olmasına dikkat edilmelidir. Art arda 4 ve daha fazla aynı baz tekrar etmemelidir. Tasarlanan primerlerde var olan dörtlü tekrarlar spesifik olmayan bağlanmalara sebebiyet verirken dimerleşme yapabilmektedir.

Çizelge 3.8 qPCR yönteminde kullanılan primerler ve erişim numaraları

Gen sembolü	Erişim numarası	Uzama pozisyonu	Sekans (5'-3')
<i>Gr-1</i>	NM_053906.2	Forward	5'-AGTTCAGTCTGCTCCACACATCC-3'
		Reverse	5'-TCCAGCTGAAAGAACCCATC-3'
<i>GPx-1</i>	NM_183403.2	Forward	5'-TGGCTTACATCGCCAAGTC-3'
		Reverse	5'-CCGGGTAGTTGTTCTCAGA-3'
<i>Gstp-1</i>	NM_017013.4	Forward	5'-AGACGGGAATTTGATGTTTGAC-3'
		Reverse	5'-TGTCAATCAGGGCTCTCTCC-3'
<i>Gapdh</i>	NM_007393.5	Forward	5'-TGGACCTCATGGCCTACATG-3'
		Reverse	5'-AGGGAGATGCTCAGTGTTGG-3'

3.7.2. Real-Time PCR uygulaması

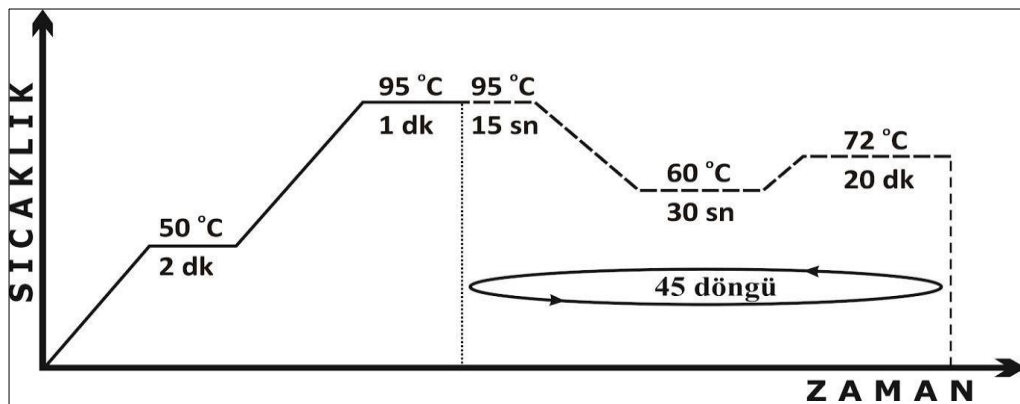
Glutasyon döngüsü antioksidan genlerin Real-Time PCR uygulamaları Sybergreen tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Sybergreen Real-Time PCR tekniğinde hedef (target) ve referans (housekeeping) genlerin mRNA seviyeleri farklı PCR tüplerinde aynı şartlarda gerçekleştirilir. Target genleri, ekspresyon seviyelerini belirlemeye çalıştığımız glutasyon döngüsü antioksidan genleri olurken housekeeping geni hücre içerisinde temel hücresel fonksiyonların sürdürüldüğü her hücrede eksprese olan kurucu genlerdir. Tez kapsamında gerçekleştirilen Real-Time PCR çalışmalarında *Gapdh* geni housekeeping gen olarak kullanıldı. Bir genin ekspresyon seviyelerinin hesaplanmasında Real-Time PCR cihazı tarafından kantitatif ekspresyon seviyelerini gösteren C_T değerlerinden yararlanılır. Buna göre housekeeping genlerin C_T değerleri referans alınarak aynı örnekten hazırlanmış hedef genlerin C_T 'leri değerlendirilir. Bu tez çalışmasında glutasyon döngüsü genleri *Gpx*, *Gr* ve *Gst* hedef genlerinin C_T değerleri *Gapdh* referans geni C_T değerleri referans alınarak değerlendirildi. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda kontrol ve deney gurupları karaciğer dokularından hazırlanmış olan cDNA örnekleri kullanılarak mRNA ekspresyon dereceleri en az 3

tekrarlı olarak ölçüldü. Sybergreen metodu ile gerçekleştirilen Real-Time PCR uygulamasında kullanılan örneklerin bileşen içerikleri Çizelge 3.9’da gösterilmektedir.

Çizelge 3.9 qPCR’da kullanılan bileşenlerin miktarları ve konsantrasyonları

Bileşenler	Konsantrasyon	Miktar (µL)
ddH ₂ O (Steril)	-	1
Sybrgreen Master Mix	1X	5
Forward Primer (Hedef/Referans)	1 pmol	1
Reverse Primer (Hedef/Referans)	10 pmol	1
↓	↓	↓
cDNA	0,02 ng/ µl	2

Sybergreenreal time PCR tekniğinin uygulanması qiagen Rotor Gene Q cihazında Şekil 3.12’de verilen termal protokol takip edilerek gerçekleştirildi. Buna göre cihaza konulan örneklerden bulunan cDNA’nın kolay denatüre olabilmesi için öncelikli olarak 50 °C’de 2 dk süreyle bir ön ısıtmaya tabi tutuldu. Ardından sıcaklık 95 °C’ye çıkarılarak DNA denatüre edildi. Bu noktaya kadar uygulanan termal döngü 1 döngü olarak gerçekleştirildi. Ardından 95 °C’de 15 sn denatürasyon, 60 °C’de 30 sn primerlerin bağlanması ve son olarak 72 °C’de uzama basamağı 45 döngü olarak tekrarlanarak hedef ve referans genlere ait ürün kesitleri çoğaltıldı. 45 döngünün gerçekleştirilmesi basamağında hedef ve referans genler cihazın hassasiyetine bağlı olarak belirli kopyaya ulaştıklarında ışıma verirler. Bu ışıma durumları cihaz tarafından C_T değerleri olarak kaydedilir. Daha sonra hedef ve referans genlerin kantitatif gen ekspresyonları cihaz tarafından ifade edilen bu C_T değerleri kullanılarak yapılır.



Şekil 3.12 qPCR tekniğinde takip edilen termal döngü

3.7.3. Sybergreen Real-time PCR sonuçlarının hesaplanması

Kontrol ve deney gruplarından toplanan karaciğer dokularından hazırlanan cDNA'lar kullanılarak Sybergreen metodu ile real-time PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Cihazdan elde edilen hedef gen C_T değerleri ile aynı cDNA dan çalıştırılan referans C_T değerleri eşitlik 3.1 yardımıyla kantitatif mRNA ekspresyonlarına dönüştürüldü (Livak ve Schmittgen, 2001).

$$\text{Ekspresyon } (\Delta C_t) : 2^{C_T (\text{Referans}) - C_T (\text{Hedef})} \quad 3.1$$

Kantitatif ekspresyon değeri olarak bilinen ΔC_T verilerinin hesaplandığı eşitlik 3.1'deki terimlerin açıklamaları şu şekildedir;

1. **(2) değeri:** Hedef gen primer etkinlik oranını gösterir. (Primerlerin etkinlik oranları cihaz tarafından qPCR cihazı tarafından belirlenen değerlerdir. Tasarlanan her primer için cihaz tarafından belirlenen bu değerlerin%100'e yakın olduğu durumlarda 2 olarak kabul edilir)
2. **C_T (Referans):** Real-Time PCR reaksiyonu sonunda housekeeping genin kantitatif miktarının hesaplanmasında kullanılan cihaz tarafından ifade edilen değerdir.
3. **C_T (Hedef):** Real-Time PCR reaksiyonunda hedef (target) genin kantitatif miktarını ifade eden değerdir.

Çalışmanın hassasiyeti ve sonuçların güvenilirliği açısından tüm mRNA ekspresyon çalışmaları aynı cihazda yürütüldü. Glutasyon döngüsü antioksidan genlerin C_T değerleri ile housekeeping geni C_T değerleri eşitlik 3.1'e yerleştirilerek ΔC_T değerleri belirlendi. En az 3'er kez tekrarlanan bu testten elde edilen verilerin "ortalama $\pm$ standart hata" ları hesaplandı ve tüm deney grupları kontrolleri ile istatistiki olarak kıyaslandı.

3.8. Protein aktivite çalışmaları

Bilindiği gibi gen, DNA üzerindeki anlamlı nükleotid zincirlerine denir. Bu anlamlı nükleotid zincirleri mRNA'lar vasıtasıyla proteinlere çevrilir. Hücrede farklı görevlere sahip proteinler mevcuttur. Fonksiyonel proteinler olan enzimatik aktiviteye sahip moleküller önemli protein molekülleridir. Enzimler olarakta bilinen bu proteinler hücresel redoks dengesi açısından elzem olan glutasyon döngüsü gibi metabolik

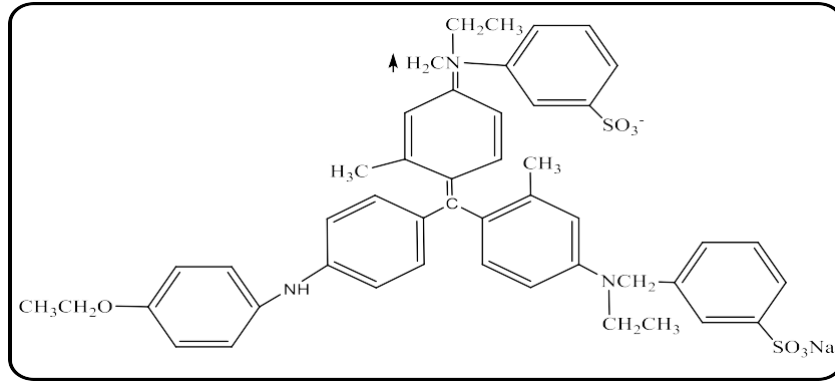
faaliyetlerin düzenli işleminde büyük öneme sahiptirler. Bu tez çalışmasında, mRNA düzeyinde ekspresyonları araştırılan antioksidan genlerin protein seviyesinde yansımaları olan GPx, GR ve GST fonksiyonel proteinlerinin kinetik aktiviteleri kontrol ve deney grubu fare karaciğer dokularında araştırıldı.

3.8.1. Bradford (Coommassie Blue) protein tayini

Bradford protein tayin yöntemi çalışmanın amacı ve bakılacak protein miktarına bağlı olarak tercih edilen bir metoddur. Bu metod, organik boyalar vasıtasıyla proteinlerin asidik ve bazik gruplarla etkileşim oluşturup renk farklılığı meydana getirmesi esasına dayanır. Bu metodun en önemli molekülü olan coomassie brilliant blue G-250 boyası saf molekül halinde iken 465 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Coomassie brilliant blue G-250 süpernatandaki proteinlere bağlanabilir (Şekil 3.13). Coomassie brilliant blue G-250 ve protein kompleksleri 595 nm dalga boyunda maksimum absorbanslarını verirler. Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldığında solüsyondaki protein miktarı ile paralel olarak mavi renk tonları elde edilir. Mavi renk oluşumunun nedeni esasen solüsyonda olan aminoasit residüleridir. Farklı renk tonlarına sahip örnekler spektrofotometrik olarak ölçülürken farklı absorbans değerleri verirler. Buradan yola çıkılarak hazırlanan konsantrasyonları belirli standartlar ile çizilen standart eğriler yardımıyla bir örnek içindeki protein miktarı kantitatif olarak belirlenebilir.

3.8.2. Bradford protein tayininin uygulanışı

Bradford protein tayini bu çalışmada araştırılan antioksidan proteinlerin spesifik aktivitelerini hesaplamak amacıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla daha önce enzim aktivitesi ölçümleri için hazırlanan karaciğer doku süpernatantları kullanıldı. Bradford protein tayini için örnek hazırlama aşamasında öncelikli olarak coomassie brilliant blue G-250 içeriğinde olan protein tayin solüsyonu hazırlandı. Coomassie brilliant blue G-250 molekül yapısı Şekil 3.13'te verilmiştir.



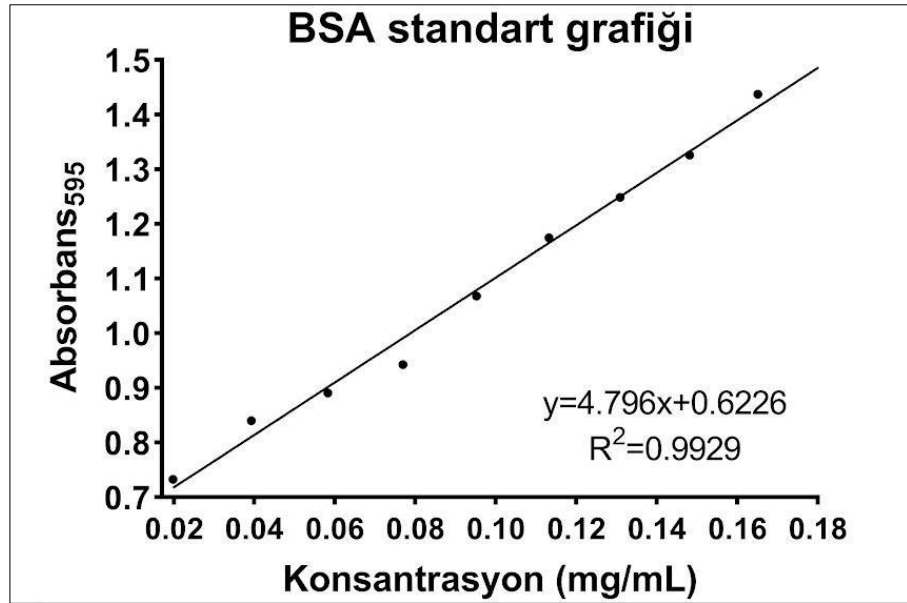
Şekil 3.13 Coomassie brilliant blue molekül yapısı

Daha sonra kör ve örnek sayısı hesap edilerek uygun büyüklükte temiz tüpler ayarlandı. Bu tüplere her örnekten 10 μL alınarak üzerine 90 μL dH₂O ilave edilerek 10 kat daha seyreltik yeni örnekler hazırlandı. Kör ise örnek yerine saf su ilave edilerek hazırlandı (Çizelge 3.10). Bunların üzerine 400 μL coomassie brilliant blue boyası eklenerek toplam hacim 500 μL yapıldı. Ardından örnekler oda sıcaklığında 10 dk karanlıkta inkübasyona bırakılarak protein bağlanması gerçekleştirildi.

Çizelge 3.10 Bradford protein tayinini uygulamasında örnek tablo

Bileşenler	Kör (μL)	Örnek (μL)	BSA (μL)
dH ₂ O	100	90	90
Süpernatant	-	10	10
Coomassie Blue boyası	400	400	400
Toplam Hacim	500	500	500

Ardından kör ve örneklerin 200 μL kadarı plate yüklenerek 595 nm’de absorbans değerleri kaydedildi (Bradford, 1976). Elde edilen absorbans değerlerini konsantrasyon birimlerine çevirmek amacıyla bovin serum albümin standart protein olarak kullanılarak standart grafiği çizildi (Şekil 3.14). Bu amaçla 1 mg/mL konsantrasyona sahip stok bovin serum albümin solüsyonundan bilinen konsantrasyonlarda farklı yeni örnekler hazırlandı. Hazırlanan bu örneklerin 595 nm’de absorbansları ölçülerek konsantrasyon ve absorbansa bağlı standart denklem çizildi. Bilinmeyen örneklerimiz olan karaciğer süpernatantları ölçümlerinden elde edilen absorbans değerleri standart grafik yardımıyla mg/mL konsantrasyon birimlerine çevrildi.



Şekil 3.14 BSA standart grafiği

3.8.3. Glutasyon peroksidaz (GPx) enzimi aktivite ölçümü

Daha önce -80°C derin dondurucuda bulunan kontrol ve deney gurubu karaciğer dokularının tartımı yapılarak her 1 mg doku için 10µL tampon kullanılarak homojenatlar hazırlandı. Homojenatların hazırlanmasında 50 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. Tampon doku üzerine eklendi ve üzerine yeterli miktarda zirkonyum parçalayıcı eklenerek homojenizatör (Qiagene Tissue Lyser LT) yardımıyla 30 Hz'de 4°C'de 3+3 dakika 2 peryot halinde homojenizasyon işlemi yapıldı. Daha sonra 1 saat boyunca +4°C'de 13500 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatantlar farklı tüplere alındı. Elde edilen süpernatantlarda GPx aktivitesi kinetik olarak bakıldı. GPx aktivitesinin ölçümü, EC 1.11.1.9 kod numaralı sigma aldrich protokolünün aşamaları mikrolplaka okuyucu spektrofotometreye uyarlanarak gerçekleştirildi. Sigma aldrich GPx aktivite ölçümünde kullanılan solüsyonlar Çizelge 3.11'de görülmektedir. Protokole göre örnekler ve diğer reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.12'de verilen miktarlarda kuvarz plate üzerine pipetlenir. Ardından 10 dakika inkübasyona bırakılır. Daha sonra H₂O₂ ilave edilerek her dakika absorbanslar kaydedilerek 5 dakika süreyle kinetik ölçüm gerçekleştirilir. GPx aktivite ölçümünde kullanılan sigma aldrich protokolüne göre GPx enzim ünitesi, 25°C ve pH:7'de H₂O₂ kullanarak, 1 µmol GSH'ı, GSSG'ye çeviren GPx miktarı olarak belirtilmektedir.

Çizelge 3.11 Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinde kullanılan çözeltiler

A Çözeltisi	50 mM NaH_2PO_4 tamponu + 0,4 mM EDTA
B Çözeltisi	1 mM 50mL NaN_3 (A çözeltisi içerisinde)
C Çözeltisi	NADPH her bir ölçüm için 1 mg kullanılır (Taze kullanılmalı)
D Çözeltisi	GR enzim solüsyonu 100 U/mL
E Çözeltisi	200 mM GSH
F Çözeltisi	10mM NaH_2PO_4 içinde 1mM DTT pH=7
G Çözeltisi	Süpernatant
H Çözeltisi	%0,042 Hidroje Peroksit

B, D ve E çözeltileri protokolda önerildiği oranlar ile mikropate pipetlendi. Karışımın üzerine paralel oranda azaltılmış C solüsyonu (NADPH çözeltisi) eklendi. Çizelge 3.12'de belirtilen pipetleme prokolü takip edilerek GPx enzim aktiviteleri 340 nm'de kaydedildi.

Çizelge 3.12 GPx aktivite ölçümü pipetleme protokolü

	Kör (µL)	Numune (µL)
Reaksiyon Kokteyli (B+D+E)	250	250
1 mM DTT + NaH_2PO_4 çözeltisi (F)	5	-
Süpernatant (G)	-	5
10 dk inkübasyon		
%0,042 Hidroje Peroksit (H)	5	5
Toplam hacim	260	260

GPx enzim aktivite ölçümünden elde edilen absorbans değerleri protokol tarafından önerilen eşitlik 3.2'ye yerleştirilerek enzim üniteleri (EU/mL) hesaplandı. Ardından elde edilen bu sonuçlar protein tayin sonuçları ile birlikte değerlendirilerek spesifik aktiviteleri (EU/mg) hesaplandı.

$$\frac{(\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min Test} - \Delta A_{340\text{nm}}/\text{min Blank})(2)(3.1)(\text{df})}{(6.22)(0,05)} \times \frac{1}{\text{mg protein/mL}} \quad 3.2$$

Eşitlik 3.2'de verilen terimlerin açıklamaları şu şekildedir;

- (2) : Her β -NADPH'ın yükseltgenmesinde kullanılan 2 µL GSH miktarı
- (3.1) : Her reaksiyonda kullanılan toplam küvet hacmi
- (df) : Seyreltme faktörü
- (6.22) : 340 nm'de β -NADPH'ın mM ekstinksiyon katsayısı
- (0.05) : Her tekrarda kullanılan enzim miktarı

3.8.4. Glutasyon S-Transferaz (GST) enzimi aktivite ölçümü

Kontrol ve deney guruplarına ait karaciğer örneklerinden her 1 mg doku için 10 µL tampon kullanılarak homojenatlar hazırlandı. Homojenizasyonun hazırlanması (Habig ve ark., 1974) tarafından önerilen protokole göre gerçekleştirildi. Santrifüj edilen homojenatlardan elde edilen süpernatantları kullanılarak GST'nin enzim aktivitesi kinetik olarak ölçüldü. Enzim aktivite testleri Çizelge 3.13'te gösterilen GST pipetleme protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi.

Çizelge 3.13 GST aktivite ölçümü pipetleme protokolü

	KÖR (µL)	NUMUNE (µL)
K-Fosfat tamponu	50	50
dH ₂ O	180	175
Süpernatant	-	5
CDNB	5	5
GSH	20	20
Toplam Hacim	255	255

Reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.13'te verilen miktarlara göre birleştirildikten sonra 340 nm dalga boyunda 3 dakika süreyle kinetik ölçüm yapıldı ve her dakikada absorbens değerleri kaydedildi. Örneklerin güvenilirliği açısından ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen absorbens değerleri eşitlik 3.3 yardımıyla enzim üniteleri (EU/mL)'ne çevrildi. Ardından Bradford protein tayini sonuçları ile birlikte değerlendirilerek spesifik aktivite (EU/mg) değerleri hesaplandı (Habig ve ark., 1974).

$$\text{Spesifik aktivite (EU/mg)} = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \cdot t} \times \frac{V_t}{V_o} \times SF \times \frac{1}{\text{mg protein/mL}} \quad (3.3)$$

Eşitlik 3.3'te verilen terimlerin açıklamaları şu şekildedir;

- Abs** : 340 nm'de ölçülen absorbens değerleri
ε : 340 nm'de 1 mM CDBN-SG'nin ekstinksiyon katsayısı
t : Enzim aktivitesinin ölçüldüğü toplam zaman
V_t : Toplam küvet hacmi
V_o : Örneğin hacmi
SF : Dilüsyon Faktörü

3.8.5. Glutasyon Redüktaz (GR) enzimi aktivite ölçümü

Öncelikle kontrol ve deney gurupları karaciğer dokuları tartıldı. Her 1 mg doku için 10 µL 50 mM Tris-HCl tamponu ve zirkonyum parçalayıcılar eklenerek homojenizatör (Qiagen Tissue Lyser LT) yardımıyla 30 Hz'de 4°C'de dokular parçalandı. Ardından 60 dk ve 13500 rpm'de santrifüj işlemi yapılarak süpernatantlar alındı. Elde edilen süpernatantlar kullanılarak Carlberg ve Mannervik (1985) tarafından önerilen metod kullanıldı. Buna göre Çizelge 3.14'te verilen pipetleme protokolü takip edilerek GR'nin kinetik enzim ölçümü 340 nm'de 3 dakika süre ile ölçülerek her dakikadaki absorbans değerleri kaydedildi.

Çizelge 3.14 GR aktivite ölçümü pipetleme protokolü

	Kör (µL)	Numune (µL)
Na-Fosfat Tamponu	50	50
dH ₂ O	150	145
Süpernatant	-	10
GSSG	25	25
NADPH	25	25
Toplam Hacim	300	300

Ölçülen absorbans değerleri eşitlik 3.3 yardımıyla enzim ünitelerine (EU/mL) çevrildi. Ardından protein tayini sonuçları ile değerlendirilerek spesifik aktiviter (EU/mg) hesaplandı.

3.9. Antioksidan İlişkili Bazı Metabolitlerin Ölçümü

3.9.1. GSH ve GSSG ölçümü

Kontrol ve deney gurubu karaciğer dokuları tartıldı. Daha sonra her 1 mg dokunun üzerine 10 µL fosfat tamponu ilave edildi. Zirkonyum parçalayıcılar kullanılarak homojenizatör (Qiagen Tissue Lyser LT) yardımıyla 40 Hz'de 3+3 dk iki periyot olarak dokular homojeniz edildi. Ardından 1000 g'de santrifüj yapılarak berrak süpernatantlar GSH ve GSSG ölçümleri için iki part halinde yeni tüplere alındı. Santrifüj sonrası süpernatantların bulanık olması halinde üzerlerine hacimleri ile orantılı olarak %5'lik TCA eklenip vorteklendikten sonra yeniden santrifüj yapılabilir. GSH'ın kantitatif tayini (Griffith, 1980) tarafından önerilen metoda göre gerçekleştirildi. Süpernatanın

ilkpartı kullanılarak Çizelge 3.15'te verilen değerlere göre 412 nm dalga boyunda 5 dakika süre ile kantitatif GSH ölçümü gerçekleştirildi ve her dakikada elde edilen absorbans değerleri kaydedildi (Griffith, 1980).

Çizelge 3.15 Redükte glutatyon (GSH) ölçümü pipetleme protokolü

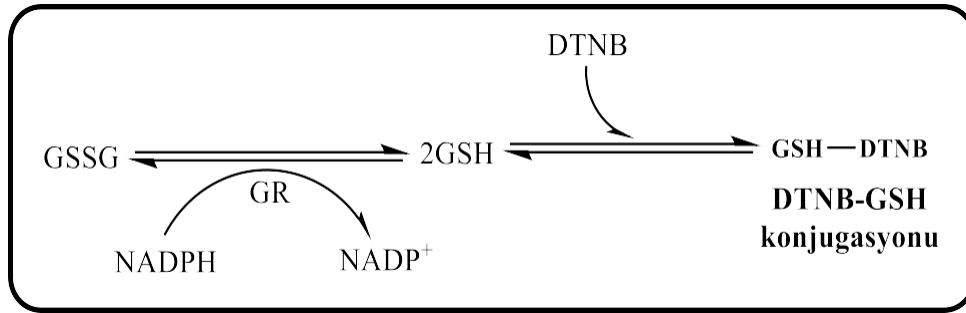
	Kör (µL)	Numune (µL)
200 mM K-fosfat (50 mM EDTA'lı)	155	135
2 mM NADPH	20	20
6 mM DTNB	20	20
Süpernatant	-	20
0,5 EU/mL GR	5	5
Toplam hacim	200	200

Daha önce hazırlanmış olan süpernatanın ikinci partı GSSG ölçümü için kullanıldı. Bunun için süpernatanın her 400 µL si üzerine 8 µL 2-vinilpiridin eklenerek örnekler 60 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 3.16 Yükseltgenmiş glutatyon ölçümü pipetleme protokolü

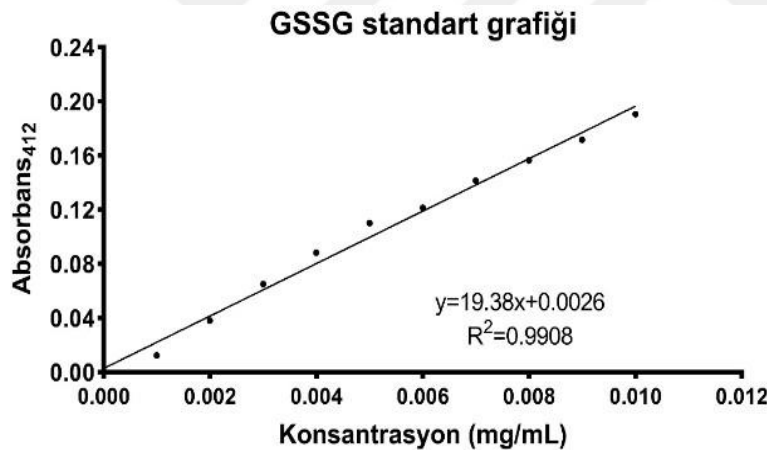
	Kör (µL)	Numune (µL)
200 mM K-fosfat (50 mM EDTA'lı)	155	135
2 mM NADPH	20	20
6 mM DTNB	20	20
Süpernatant	-	20
0,5 EU/mL GR	5	5
Toplam hacim	200	200

60 dakikalık inkübasyon sonrasında Çizelge 3.16'da verilen pipetleme protokolü takip edilerek 412 nm dalga boyunda 5 dk süreyle GSSG kinetik ölçümü yapıldı ve her dakikada alınan absorbanslar kaydedildi (Griffith, 1980). GSSG ölçümünde süpernatant içindeki GSSG'nin indirgenmesi sonucu oluşan GSH'ın DTNB ile oluşturdukları konjugasyon ürünü GSH-DTNB miktarı tespit edilir ve böylece GSSG miktarı dolaylı olarak ölçülmüş olur. GSH ve DTNB arasında meydana gelen konjugasyon Şekil 3.15'te gösterilmiştir.



Şekil 3.15 GSSG indirgenmesi sonucu oluşan GSH'ın DTNB ile konjugasyonu

GSH ve GSSG kinetik ölçümünden elde edilen absorbans verilerini konsantrasyona birimlerine çevirmek amacıyla saf GSSG molekülünden standart grafik yapıldı. Bu amaçla öncelikle 1 mg/mL konsantrasyonunda stok GSSG solüsyonu hazırlandı ve stok solüsyonunun 412 nm'de absorbans kontrolü yapıldı. Ardından örneklerin absorbans değerlerini kapsayacak şekilde GSSG stok solüsyonu seyreltilererek Şekil 3.16'da görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarda standart örnekleri hazırlandı.



Şekil 3.16 GSH ve GSSG hesaplamalarında kullanılan GSSG standart grafiği

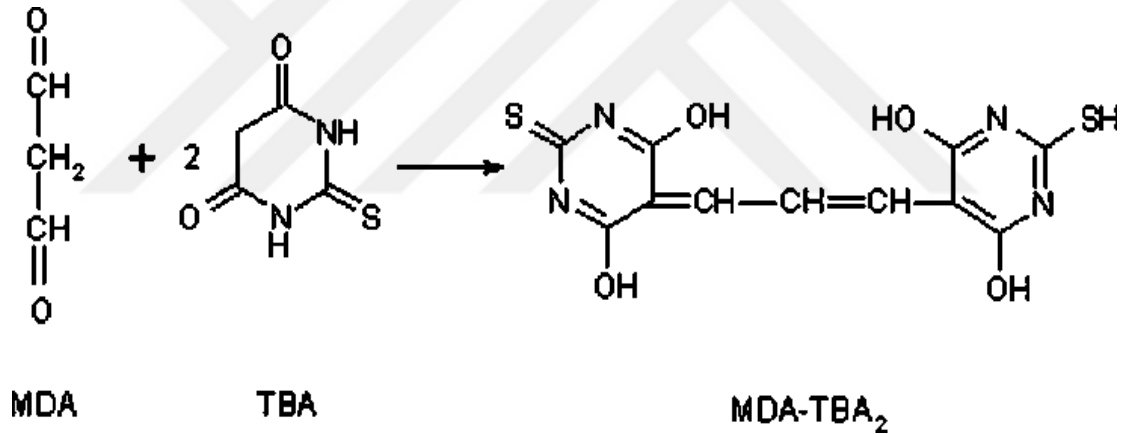
Konsantrasyonları bilinen standart örnekleri GSH ve GSSG kinetik ölçümünde kullanılan pipetleme protokolü takip edilerek absorbans değerleri kaydedildi. Elde edilen absorbans değerleri ve konsantrasyonları kullanılarak GSSG standart grafiği çizildi (Şekil 3.16). Karaciğer dokularından elde edilen süpernatantlar ile yapılan GSH ve GSSG ölçümlerinden elde edilen absorbans değerleri standart eğri yardımıyla konsantrasyon birimlerine çevrildi. Standart eğriden elde edilen sonuçlar mM konsantrasyonlarına çevrilerek ifade edildi. Ardından eşitlik 3.4 ve eşitlik 3.5 yardımıyla toplam GSH ve GSH/GSSG oranları hesaplandı.

$$\text{Toplam glutatyon (GSH + GSSG)} = \text{GSH} + 2 \cdot \text{GSSG} \quad 3.4$$

$$\text{GSH'in GSSG'ye oranı } \left(\frac{\text{GSH}}{\text{GSSG}} \right) = \frac{\text{Total GSH} - \text{GSSG}}{\text{GSSG}/2} \quad 3.5$$

3.9.2. Malondialdehid (MDA) ölçümü

MDA ölçümü hücrel lipid peroksidasyonunun iyi bir belirteçidir. MDA ölçümü Ohkawa ve ark. (1979) tarafından önerilen spektrofotometik yöntemle gerçekleştirildi. Yöntem biyolojik materyallerde peroksid lipidlerin yıkımı sonrası oluşan malondialdehid tiyobarbiturik asit (TBA) ile reaksiyonu esasına dayanır (Şekil 3.17). Reaksiyon sonucunda oluşan pembe rengin belirginliği MDA miktarı ile doğru orantılıdır.



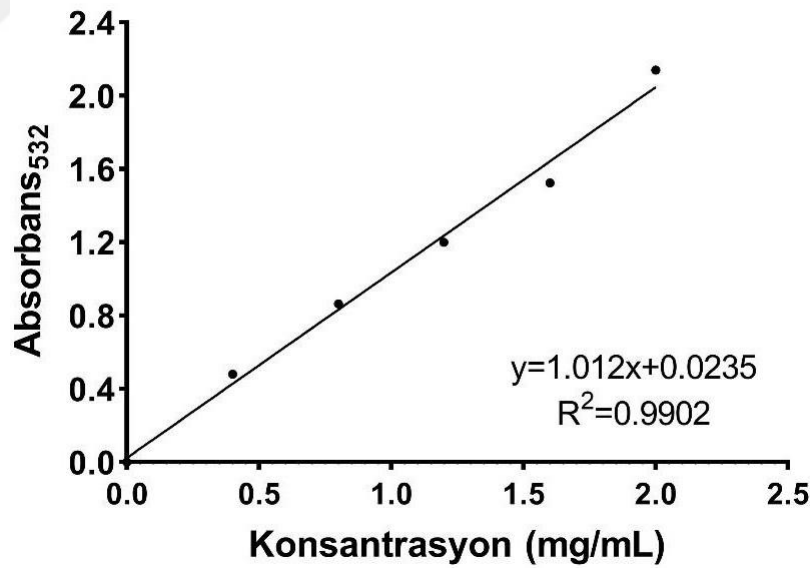
Şekil 3.17 TBA'nın MDA ile reaksiyonu

Malondialdehid ölçümü için öncelikle homojenat hazırlandı. Bu amaçla her 1 mg doku için 9 μL %1,15 KCl çözeltisi bir ependorf tüpü içine alındı ve 2'şer dakikalık süre ile 2 periyot olarak homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. 1000 g de 10 dk süre ile santrifüj edilerek süpernatantlarda MDA miktarları Çizelge 3.17'de verilen pipetleme protokolü takip edilerek 532 nm de ölçüldü (Ohkawa ve ark., 1979).

Çizelge 3.17 MDA ölçümü pipetleme protokolü

	Kör (µL)	Numune (µL)	Standart (µL)
%1.15 KCl çözeltisi	150	-	-
Süpernatant/Standartlar	-	150	150
%0.8 TBA	290	290	290
%20 asetik asit	290	290	290
%8.1 SDS	400	400	400
Toplam hacim	1130	1130	1130

Daha sonra elde edilen absorban değerlerini konsantrasyon birimlerine çevirmek için standart grafik hazırlandı. Bu amaçla 1,1,3,3 tetraetoksipropanın 10 nmol/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözelti dilüe edilerek farklı konsantrasyonlara sahip 1,1,3,3 tetraetoksipropan standart (1,1,3,3 tetraetoksipropan) numuneleri hazırlandı. Çizelge 3.17’de verilen pipetleme protokolüne 532 nm’de standart numunelerin absorban değerleri kaydedildi. Bilinen konsantrasyonlar ve absorban değerleri kullanılarak 1,1,3,3 tetraetoksipropan standart grafiği hazırlandı (Şekil 3.18).

Tetraetoksipropan standart grafiği**Şekil 3.18** MDA standart grafiği

Karaciğer dokularından hazırlanan süpernatantlarda ölçülen absorban değerleri Şekil 3.18’de gösterilen standart grafik yarımıyla mg/mL konsantrasyona birimlerine dönüştürüldü. Ardından bu konsantrasyon değerleri mM değerlere dönüştürülerek grafiklendi.

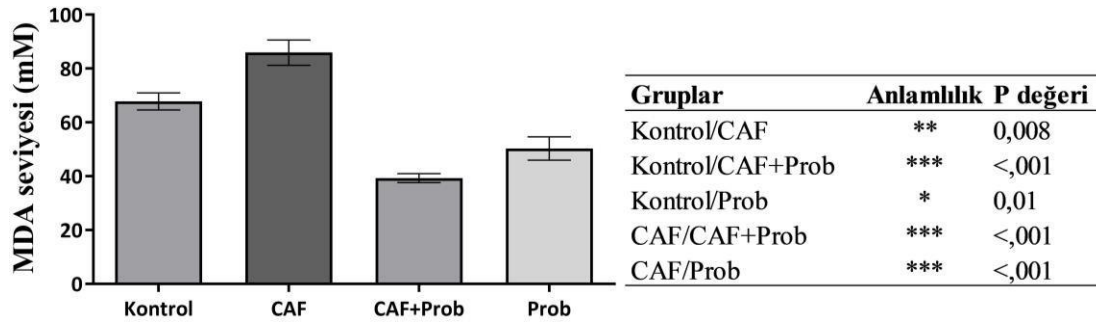
3.10. İstatistiki değerlendirme

Tez kapsamında yapılan çalışmalar Wistar sıçan karaciğer dokusunda gerçekleştirildi. Kontrol; ad libitum normal kemirgen diyeti, CAF; ad libitum normal kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti, CAF+Prob; ad libitum normal kemirgen diyeti ve kafeterya diyetine ek olarak SCD Probiotics takviyesi ve Prob; ad libitum kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics takviyesi verilen grup olmak üzere 4 grup hayvan kullanıldı. Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen testler en az 3'er tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Her bir gruptan elde edilen karaciğer dokularında glutatyon sistemi proteinlerinin mRNA seviyesinde gen ekspresyonları ve kinetik enzim aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Deney gruplarından elde edilen veriler ortalama±standart hata olarak ifade edildi. Standart One-way ANOVA'yı takiben Tukey's Multiple Comparisons test kullanılarak deney grupları sonuçları kontrol grubu sonuçları ile istatistiki olarak karşılaştırıldı. $P<0.05$ olanlar istatistiki olarak anlamlı değişim var olarak nitelendi ve istatistiki anlamlılık dereceleri "*" simgeleri kullanılarak derecelendirildi. Buna göre $P>0.05$ ise (ns) istatistiki olarak önemli değişim yok; $P<0.05$ ise ("*": önemli); $P<0.01$ ise ("**": çok önemli); $P<0.001$ ve $P<0.0001$ ise ("***": yüksek derecede önemli) olarak ifade edildi.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

Düzensiz veya yanlış beslenme, fastfood ve kızartılmış yiyeceklerin vücut fizyolojisi üzerinde olumsuz pek çok etkiye sahip olduğu bilinir (Rothwell ve Stock, 1982; Pini ve ark., 2017; Leigh ve ark., 2019). Yapılan pek çok çalışma da kanser veya nörodejeneratif pek çok hastalığın patolojisi düzensiz veya yanlış beslenme ve fastfood tüketimi ile ilişkilendirilmiştir (World Health Organization, 2009). Kızartılmış, işlenmiş gıda veya fastfood beslenmenin iyi bir simülasyonu olan CAF diyeti zengin karbonhidrat ve lipid içeriği ile yüksek enerjili bir diyettir. Bu nedenle obezite ve obezite ilişkili pek çok hastalığın primer etkenleri ile ilişkili olduğu söylenebilir. Bu bağlamda CAF diyetinin kanser dâhil çeşitli rahatsızlıklar ile ilişkisine dayanarak, antioksidan sistemin önemli bir parçası olan glutatyon döngüsü enzim ve metabolitlerinin düzenlenmesi üzerine olan etkisinin aydınlatılması CAF diyetinin antioksidan sistem üzerindeki olumsuz etkisinin öğrenilmesi açısından büyük öneme sahiptir.

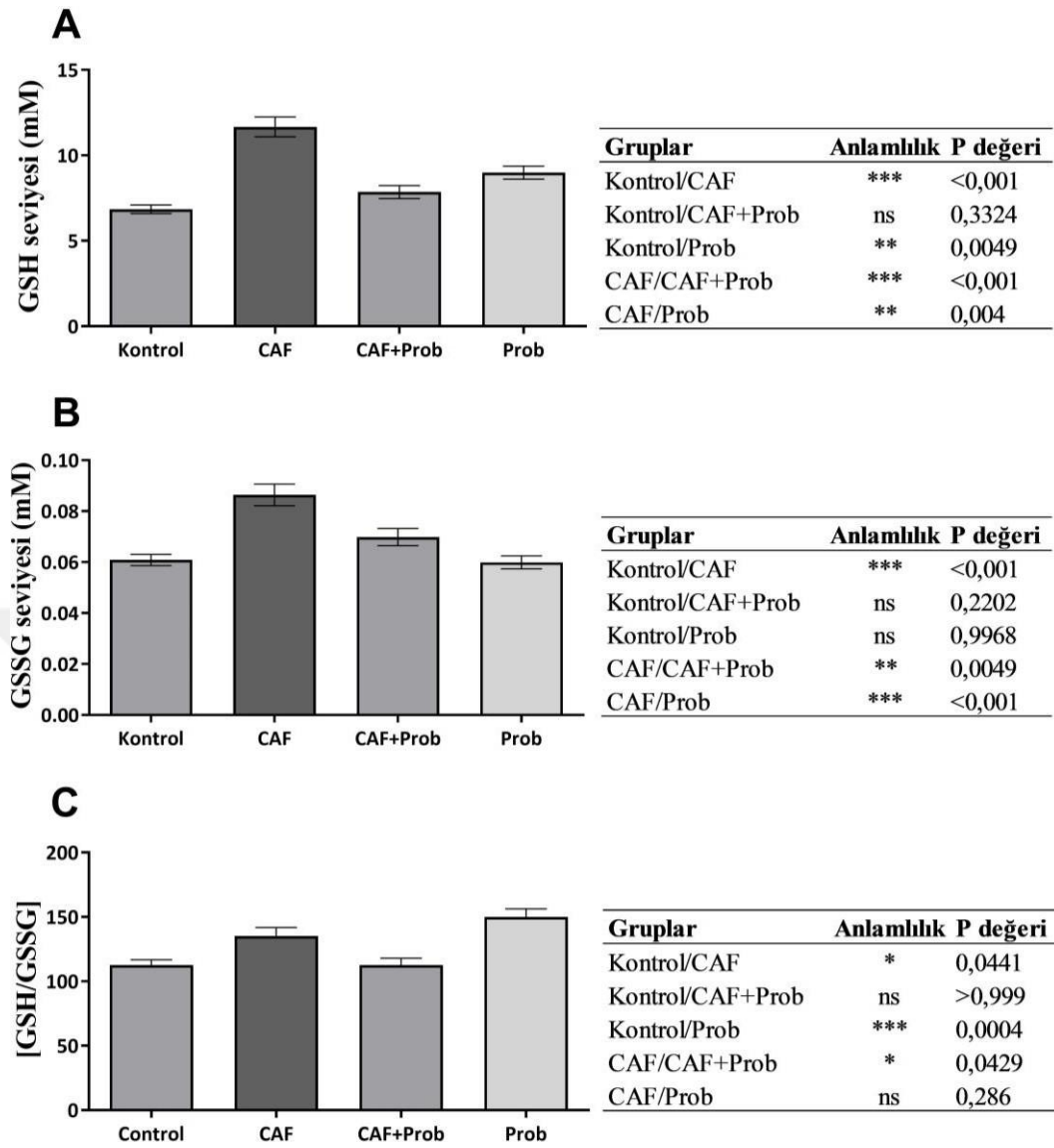
Probiyotikler bağırsak sağlığı ve bağırsak florası üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu bilinen önemli bileşenlerdir. Ayrıca bazı kanser hücre hatları üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda kansere karşı koruyucu etki gösterdikleri ve içerdikleri sekonder metabolitler sayesinde doğrudan ya da bağışıklık sistemini güçlendirmek suretiyle çeşitli hastalıklara karşı koruyucu oldukları bilinir (Alan ve ark., 2022). Bu bağlamda CAF diyetinin muhtemel negatif etkilerinin elimine edilebilmesine yönelik olarak SCD Probiotics takviyesinin olumlu etkilerinin araştırılması bu çalışmanın önemli amaçlarından biridir. Bu çalışmada Wistar Sıçan'larda glutatyon sistemi enzim ve metabolitlerinin düzenlenmesi üzerinde CAF diyetinin etkilerinin belirlenmesi, 11 farklı probiyotik bakteri içinde olan SCD Probiotics takviyesinin CAF diyetinin etkilerini geriye çevirip çeviremediği ve ayrıca CAF diyetinden bağımsız olarak SCD Probiotics takviyesinin glutatyon döngüsü üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.



Şekil 4.1 Malondialdehid (MDA) sonuçları ve istatistiksel değerlendirmesi. Kontrol; ad libitum normal kemirgen diyeti verilen grup, CAF; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti verilen grup, CAF+Prob; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti ve SCD Probiotics takviye diyeti verilen grup ve Prob; ad libitum normal kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics takviyesi verilen gruptur. Standart One-way ANOVA'yı takiben Tukey's Multiple Comparisons test kullanılarak deney grupları sonuçları kontrol grubu sonuçları ile istatistiki olarak karşılaştırıldı. $P < 0.05$ olanlar istatistiki olarak anlamlı değişim var olarak nitelendi ve istatistiki önem "*" simgeleri kullanılarak derecelendirildi. Buna göre $P > 0.05$ ise istatistiki olarak önemli değişim yok (ns); $P < 0.05$ ise önemli "**"; $P < 0.01$ ise çok önemli "***"; ve $P < 0.001$ ve $P < 0.0001$ ise yüksek derecede önemli "****" olarak ifade edildi.

Malondialdehid (MDA) ölçümü hücrel lipid peroksidasyonunun iyi bir belirteçidir. Lipid peroksidasyonu ise hücrel oksidatif stres, toksisite veya inflamasyon durumlarında belirgin şekilde kendini göstererek MDA seviyelerini yükseltir. Lipid peroksidasyonu kanserleşme sürecinde ilk adımlarında gerçekleşen önemli süreçlerden biridir. Bu nedenle lipid peroksidasyonunun belirlenmesi büyük önem taşır ve MDA ölçümü lipid peroksidasyonu belirlenmek için sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Hücrede belirli düzeydeki ROS konsantrasyonu, bazı sinyal iletim mekanizmalarının sağlığı açısından elzem olsa da bir ROS bileşeni olan H_2O_2 'in yüksek konsantrasyonunun MDA seviyesi ve ilişkili bazı hastalıkların patolojisi ile yakından ilgili olduğu bilinir (Koçpınar, 2015; Güller, 2015).

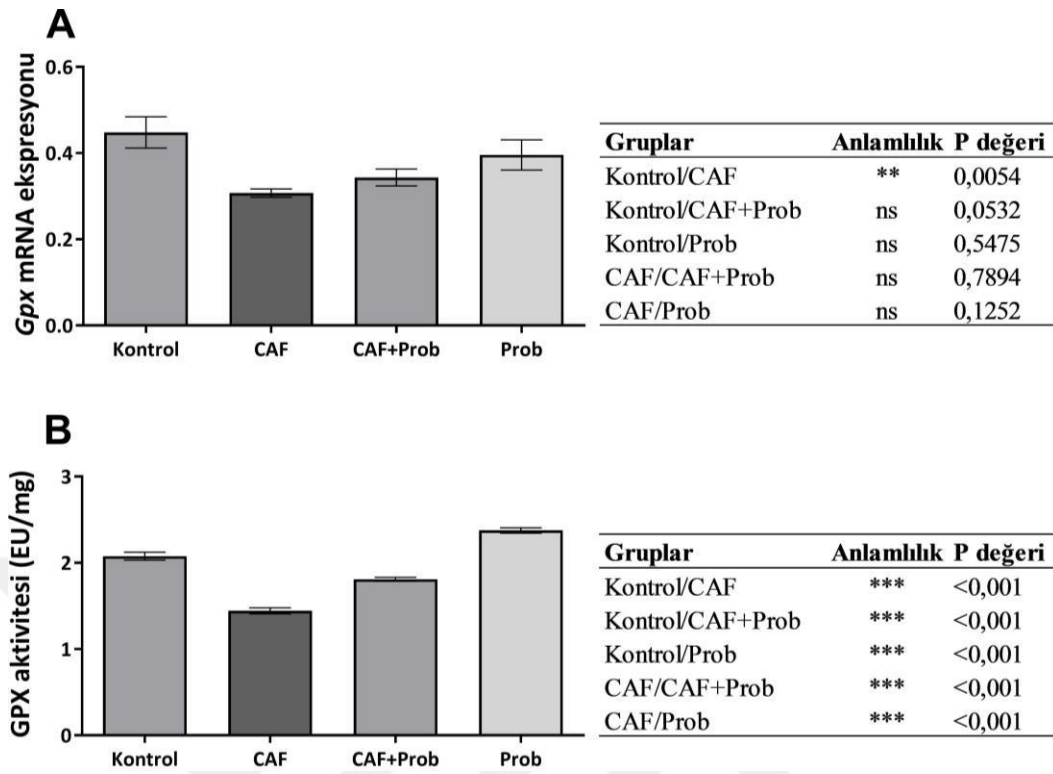
Bu verilere dayanarak öncelikle CAF diyeti ve SCD Probiotics takviyesinin MDA seviyesine nasıl etki ettiği araştırıldı. Sonuç olarak CAF diyeti verilen grupta MDA seviyesinin yükselmiş olduğu belirlendi. Buna ek olarak SCD Probiotics takviyesinin CAF diyeti ile artan MDA seviyesini yeniden eski haline getirdiği ancak kontrol diyetine ek sadece SCD Probiotics takviyesinin kontrol grubuna göre önemli bir etki yapmadığı gözlemlendi. Şöyle ki; CAF diyetine karşı SCD Probiotics takviyesinin tepk göstermesine karşın sadece SCD Probiotics takviyesinin önemli değişime neden olmayışından yola çıkılarak probiyotiklerin düzenleyici etkisinin karaciğer dokusunda da SCD Probiotics tarafından gerçekleştiriliyor olduğu söylenebilir (Şekil 4.1).



Şekil 4.2 Glutasyon sonuçları ve istatistiki değerlendirilmesi. **A)** indirgenmiş glutasyon (GSH) seviyesi **B)** yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) seviyesi ve **C)** GSH/GSSG oranındaki değişimdir. Kontrol; ad libitum normal kemirgen diyeti verilen grup, CAF; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti verilen grup, CAF+Prob; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti ve SCD Probiotics takviye diyeti verilen grup ve Prob; ad libitum normal kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics takviyesi verilen gruptur. Standart One-way ANOVA'yı takiben Tukey's Multiple Comparisons test kullanılarak deney grupları sonuçları kontrol grubu sonuçları ile istatistiki olarak karşılaştırıldı. $P < 0.05$ olanlar istatistiki olarak anlamlı değişim var olarak nitelendi ve istatistiki önem "*" simgeleri kullanılarak derecelendirildi. Buna göre $P > 0.05$ ise istatistiki olarak önemli değişim yok (ns); $P < 0.05$ ise önemli "**"; $P < 0.01$ ise çok önemli "***"; ve $P < 0.001$ ve $P < 0.0001$ ise yüksek derecede önemli "****" olarak ifade edildi.

Antioksidan sistemin bir parçası olan glutasyon döngüsü enzimatik aktiviteye sahip olan fonksiyonel proteinler içermesinin yanı sıra bu döngünün doğru ilerleyebilmesi için gerekli olan metabolitler de içerir. İndirgenmiş glutasyon (GSH) ve yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) bu döngünün iki önemli bileşenidir. Glutasyon döngüsünün hücrel redoks sisteminin sürdürülmesi ve hücre homeostazisi için elzem olduğu bilinmektedir (Circu ve Aw, 2012). Glutasyon döngüsü, GR ve GPx enzimatik

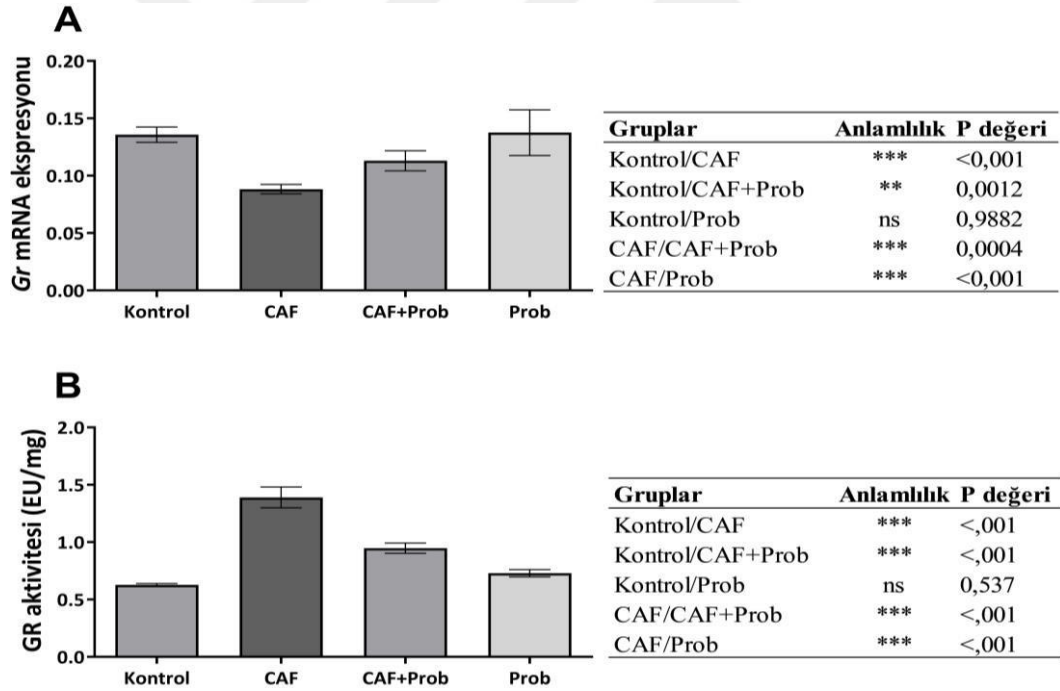
proteinlerive ayrıca GSH ve GSSG metabolitlerinin koordineli çalışması ile ilerler. Yapılan pek çok çalışmada yüksek oksidasyon engelleyici olarak bilinen GSH'ın hücrel faaliyetler açısından önemli olduğu ve iyi bir oksidatif stres markeri olduğu belirtilmektedir (Circu ve Aw, 2012; Hellou ve ark., 2012). Fizyolojik açıdan hücrenin tercih ettiği GSH konsantrasyonunun arttırılması, ROS düzenlenmesi ve hücrel toksisitenin giderilmesi gibi hücredeki hayati fonksiyonlar açısından büyük önem arz eder ve sağlıklı hücrelerde glutatyon formunun %90'dan fazlasını oluşturur (Halprin ve Ohkawara, 1967; Hellou ve ark., 2012). Bu çalışmada CAF diyeti ve SCD Probiotics'in glutatyon döngüsü metabolitlerine etkileri araştırıldı. Sonuç olarak CAF diyeti grubunda hem indirgenmiş hem de yükseltgenmiş glutatyon seviyesinin arttığı, SCD Probiotics takviyesi ile bu artışın istatistiki olarak önemli ölçüde geriye çevrildiği görüldü. Ayrıca sadece SCD Probiotics takviyesi verilen grupta GSH konsantrasyonunun kontrollere kıyasla istatistiki olarak arttığı ancak GSSG'de önemli bir değişim olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2 A ve B). Elde edilen bu sonuçlara dayanarak SCD Probiotics takviyesinin glutatyon seviyesi üzerinde düzenleyici etkisinin olduğu söylenebilir. Bununla birlikte CAF diyeti grubunda GSH ve GSSG seviyesindeki önemli artışın nedeni CAF diyetinin olumsuz etkisine karşı hücrel düzeyde verilen koruyucu bir tepki olabilir. Nitekim özellikle GSH antioksidan özelliği sayesinde önemli bir hücrel ROS düzenleyicisidir ve GSH'ın zenobiyotik kaynaklı toksisiteye karşı hücrel savunmada görev aldığı bilinir. Ayrıca CAF diyeti grubunda görülen bu etki yükselen MDA seviyesine karşı oluşturulmuş bir tepkide olabilir. Nitekim oksidatif stresin önemli markerlerinden birinin MDA seviyesinin yükselmesi olduğundan bahsedilmiştir. Buna dayanarak CAF diyetinin sebep olabildiği bu etkinin yok edilmesine yönelik olarak GSH üretimi arttırılmış olabilir. Buna ek olarak elde edilen GSH ve GSSG sonuçları oranlanarak GSH/GSSG oranları grafiklendi (Şekil 4.2 C). Sonuç olarak CAF grubunda ilginç şekilde bu oranın arttığı tespit edildi. GSH ve GSSG sonuçlarındaki artış ile paralel olan bu sonuca bakılacak olursa CAF diyetine karşı hücrel düzeyde tepki olduğu düşüncesi doğrulanmaktadır. Bu tepki CAF diyetine karşı geliştirilmiş olan bir tepki olabilir. Nitekim GSH'ın zenobiyotik maruziyetinin elimine edilmesinde önemli bir metabolit olduğu iyi bilinir. CAF + Prob grubunda bu tepkinin yeniden azalarak düzenlendiği tespit edildi. Ayrıca normal diyet ek olarak SCD Probiotics verilen sıçan karaciğerinde GSH/GSSG oranının önemli derecede yükseldiği tespit edilerek SCD Probiotics takviyesinin GSH konsantrasyonunu desteklediği fikri doğrulandı.



Şekil 4.3 Glutasyon peroksidaz (GPx) sonuçları ve istatistiki değerlendirmesi. **A)** *Gpx* mRNA ekspresyon değişimi ve **B)** GPx enzim aktivite sonuçları. Kontrol; ad libitum normal kemirgen diyeti verilen grup, CAF; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti verilen grup, CAF+Prob; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti ve SCD Probiotics takviye diyeti verilen grup ve Prob; ad libitum normal kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics takviyesi verilen gruptur. Standart One-way ANOVA'yı takiben Tukey's Multiple Comparisons test kullanılarak deney grupları sonuçları kontrol grubu sonuçları ile istatistiki olarak karşılaştırıldı. $P < 0.05$ olanlar istatistiki olarak anlamlı değişim var olarak nitelendi ve istatistiki önem "*" simgeleri kullanılarak derecelendirildi. Buna göre $P > 0.05$ ise istatistiki olarak önemli değişim yok (ns); $P < 0.05$ ise önemli "**"; $P < 0.01$ ise çok önemli "***"; ve $P < 0.001$ ve $P < 0.0001$ ise yüksek derecede önemli "****" olarak ifade edildi.

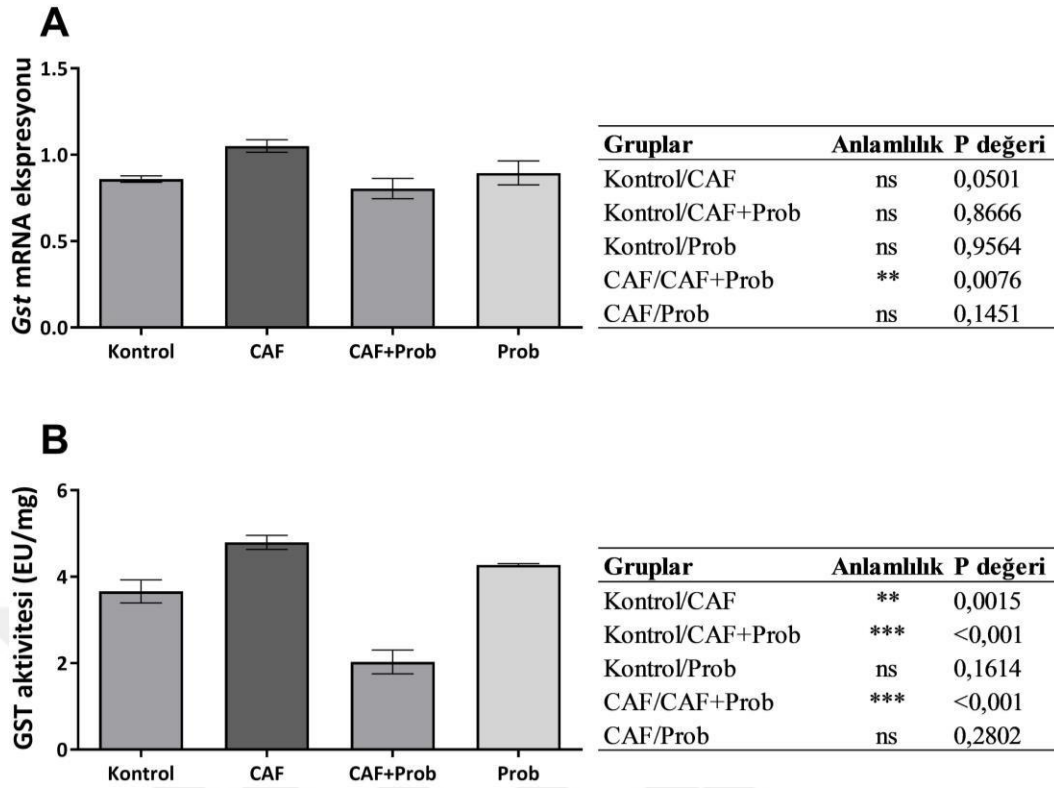
GPx glutasyon döngüsünün önemli bir enzimidir. GPx önemli aktivitesi sayesinde ortamda bulunan H_2O_2 molekülünü H_2O 'ya indirger. Bu sırada hücrel GSH'ı GSSG formuna yükseltir (Budak ve ark., 2014; Koçpınar, 2015). Bu aktivite sayesinde hücrel redoks sisteminin sağlığının devamı sağlanırken ortamda bulunan fazla H_2O_2 elimine edilerek potansiyel zararı engellemiş olur (Circu ve Aw, 2012). Hücrel glutasyonun %90'dan fazlası GSH formunda bulunması gerekir (Halprin ve Ohkawara, 1967). Bu nedenle GSSG oluşumu istenmeyen bir reaksiyonmuş gibi görünebilir. Ancak GSSG, glutasyon döngüsünün devamı ve dolayısıyla redoks dengesi için elzemdir (Circu ve Aw, 2012). CAF diyeti ve SCD Probiotics'in GPx ekspresyonu üzerine olan etkisi Real Time PCR ile gen seviyesinde ve kinetik enzim aktivite ölçümü ile protein seviyesinde belirlendi. Real Time PCR sonuçları ve enzim aktivite

sonuçlarının büyük oranda paralel olduğu gözlemlendi. Sonuçlara göre CAF diyeti verilen grupta *Gpx* mRNA seviyesinin azalmış olduğu tespit edildi. Bununla birlikte CAF diyetine ek SCD Probiotics takviyesi verilen grupta *Gpx* mRNA seviyesinin büyük oranda eski seviyesine yaklaştığını ancak sadece SCD Probiotics verilen grupta *Gpx* mRNA ekspresyonunda istatistiki olarak önemli bir değişimin olmadığı belirlendi. GPx'in enzim aktivite sonuçları gen ekspresyon sonuçları ile benzer bir değişim izledi (Şekil 4.3 B). Bu sonuç MDA seviyesindeki artış ile uyumlu sonuçlar içerir. Nitekim GPx enzim aktivitesinin sınırlandırılması sonucunda artan H₂O₂ birikimi MDA seviyesini dolaylı olarak arttırmış olabilir. Buna ek olarak *Gpx* gen ekspresyonuna bakılırsa SCD Probiotics takviyesinin CAF diyetinin olumsuz etkilerini istatistiki olarak anlamlı olmasa da nispeten tolere ettiği görülmektedir (Şekil 4.3 A). Bu durumun nedeni SCD Probiotics takviyesini takiben fizyolojik olarak tercih edilen glutatyon formunun (GSH) hücredeki konsantrasyonunu yüksek tutulmasına yönelik olarak gerçekleştirilen epigenetik bir düzenleme olabilir.



Şekil 4.4 Glutasyon redüktaz (GR) sonuçları ve istatistiki değerlendirmesi. **A)** *Gr* mRNA ekspresyon değişimi ve **B)** GR enzim aktivitesi değişimi. Kontrol; ad libitum normal kemirgen diyeti verilen grup, CAF; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti verilen grup, CAF+Prob; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti ve SCD Probiotics takviye diyeti verilen grup, ve Prob; ad libitum normal kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics takviyesi verilen gruptur. Standart One-way ANOVA'yı takiben Tukey's Multiple Comparisons test kullanılarak deney grupları sonuçları kontrol grubu sonuçları ile istatistiki olarak karşılaştırıldı. P<0.05 olanlar istatistiki olarak anlamlı değişim var olarak nitelendi ve istatistiki önem "*" simgeleri kullanılarak derecelendirildi. Buna göre P>0.05 ise istatistiki olarak önemli değişim yok (ns); P<0.05 ise önemli "**"; P<0.01 ise çok önemli "***"; ve P<0.001 ve P<0.0001 ise yüksek derecede önemli "****" olarak ifade edildi.

Glutatyonun indirgenmiş formu olan GSH, GSSG ye göre hücrede oldukça fazla miktarda olması gereken bir moleküldür (Owen ve Butterfield, 2010). Bu nedenle GR'nin enzimatik aktivitesi sayesinde GSSG yeniden GSH'a çevrilir. Bu sayede hem hücresel açıdan indirgenmiş çevre oluşturulmuş olur hem de glutatyon döngüsü tamamlanmış olur. Yapılan çalışmalar GSH'ın simultane olarak ROS elimine edebildiğini belirtmektedir (Koçpınar, 2015). Her ne kadar glutatyon eksojen olarak alınabiliyor olsa da, GR aktivitesinin etkisi ile hücredeki glutatyon havuzu %90'ın üzerinde indirgenmiş form (GSH)'da tutulur (Circu ve Aw, 2012). Bu veriler fizyolojik açıdan GSH'ın ne derece önemli olduğunu vurgulamaktadır. Bu nedenle GR, GSH'ın fizyolojik olarak istenen formunun üretilmesinde glutatyon döngüsü için önemli anahtar bir enzimdir. Bu amaçla çalışmada CAF diyeti ve SCD Probiotics'in GR üzerindeki etkisi gen ekspresyonu ve enzim aktivitesi çalışmaları ile araştırıldı. Sonuçlarda *Gr* gen mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak önemli ölçüde azalmış olduğu gözlemlendi. Ayrıca SCD Probiotics takviyesi ile *Gr* mRNA seviyesinin istatistiki olarak önemli derecede yeniden yükseldiği ve tek başına SCD Probiotics takviyesinin önemli bir etkiye sahip olmadığı tespit edildi. Enzim aktivite sonuçlarında CAF diyeti grubunda GR enzim aktivitesinin istatistiki olarak önemli derecede yükseldiği tespit edildi. Bu sonuç CAF diyet grubunda yükselmiş olduğu tespit edilen GSH miktarı ile uyumludur. Bununla birlikte SCD Probiotics takviyesinin CAF diyetinin etkisini nispeten eski hale getirmiş olduğu, tek başına SCD Probioticstakviyesinin ise önemli bir etkisinin olmadığı söylenebilir (Şekil 4.4).



Şekil 4.5 Glutatyon S-transferaz (GST) sonuçları ve istatistiki değerlendirilmesi. **A)** *Gst* mRNA ekspresyon değişimi ve **B)** GST enzim aktivitesi değişimi. Kontrol; ad libitum normal kemirgen diyeti verilen grup, CAF; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti verilen grup, CAF+Prob; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti ve SCD Probiotics takviye diyeti verilen grup ve Prob; ad libitum normal kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics takviyesi verilen gruptur. Standart One-way ANOVA'yı takiben Tukey's Multiple Comparisons test kullanılarak deney gurupları sonuçları kontrol grubu sonuçları ile istatistiki olarak karşılaştırıldı. $P < 0.05$ olanlar istatistiki olarak anlamlı değişim var olarak nitelendi ve istatistiki önem "*" simgeleri kullanılarak derecelendirildi. Buna göre $P > 0.05$ ise istatistiki olarak önemli değişim yok (ns); $P < 0.05$ ise önemli "**"; $P < 0.01$ ise çok önemli "***"; ve $P < 0.001$ ve $P < 0.0001$ ise yüksek derecede önemli "****" olarak ifade edildi.

Hücrel GSH'ın konsantrasyonu üzerinde etkili olan enzimler sadece GPx ve GR değildir. Yapılan çalışmalarda GSH'ın hücrel toksisite ile ilişkili olduğu, zenobiyotiklerin eliminasyonunda önemli role sahip olduğu ve eliminasyon işleminin GST enzim aktivitesi ile gerçekleştiği bildirilmektedir (Gallagher ve ark., 2006). Bu bağlamda GST, GSH üzerinden glutatyon döngüsü ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca GSH'ı kullanarak yüksek toksisite nedeni olma potansiyeline sahip çevrenin düzeltilmesine yönelik etkileri nedeniyle GSH konsantrasyonu üzerinde büyük etkiye sahiptir (Koçpınar, 2015). Bu çalışmada ayrıca CAF diyeti ve SCD Probiotics takviyesinin GST üzerine etkisi araştırıldı. Buna göre CAF diyet grubunda *Gst* mRNA seviyesinin istatistiksel olarak önemli olmayan şekilde GST enzim aktivitesinin ise önemli derecede yükseldiği görüldü. CAF diyet grubunda görülen mRNA ve enzim aktivite artışı oksidatif stres ve/veya hücrel toksisite oluşumunun işaretlerini içerir.

Nitekim pek çok çalışmada oksidatif stres ve toksisitenin ilişkili olduğunu, paralel nedenlere veya sonuçlara bağlı olduğu vurgulanmaktadır. Ayrıca pek çok çalışmada CAF diyetinin obezite gelişimine katkısı ve obezitenin kanser vb. ilişkili hastalıklara karşı hassasiyeti arttırdığı yönünde raporlar verilmiştir. CAF diyeti grubunda GST enzim aktivitesindeki artışın nedeni CAF diyeti ile meydana gelmiş olan muhtemel toksisite durumundan kaynaklanmış olabilir. Ayrıca SCD Probiotics takviyesinin CAF diyet grubunda görülen yüksek GST seviyelerine karşı tepki göstererek GST enzim aktivitesini ve *Gst* mRNA ekspresyonunu istatistiki olarak önemli derecede düşürdüğü açıktır. Ayrıca sadece SCD Probiotics takviyesi verilen grupta önemli değişim gözlenmedi (Şekil 4.5).



5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada kafeterya diyetinin Wistar sıçan karaciğer dokusu glutayton sistemi üzerindeki etkileri, Real-time PCR ile mRNA seviyesinde ve kinetik enzim aktivite ölçümleri ile protein seviyesinde araştırıldı. Ayrıca CAF diyetinin glutayton sistemi üzerindeki olası olumsuz etkilerinin SCD Probiotics takviyesi ile yeniden düzenlenip düzenlenmediği ve kafeterya diyetinden bağımsız olarak SCD Probiotics takviyesinin glutayton sistemine olan etkileri gen ekspresyon analizleri ve enzim aktivite ölçümleri ile araştırıldı. Bu tez çalışmasında araştırılan glutayton sistemi bileşenlerinde gözlenen mRNA ekspresyon değişimleri ve kinetik enzim aktivite değişimleri Çizelge 5.1’de renklendirilmiş şekilde özetlenmiştir.

Çizelge 5.1 Glutayton yolu bileşenlerinde gözlenen mRNA ve aktivite değişimleri. Turuncu renkli simgeler protein seviyesindeki artış, azalış ve önemsiz değişimleri simgelemektedir. Yeşil renkli simgeler mRNA seviyesindeki artış, azalış ve önemsiz değişimleri simgelemektedir. Kontrol; ad libitum normal kemirgen diyeti verilen grup, CAF; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti verilen grup, CAF+Prob; Kemirgen diyetine ek olarak kafeterya diyeti ve SCD Probiotics takviyesi verilen grup, ve Prob; ad libitum normal kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics takviyesi verilen gruptur.

Gruplar	Kontrol&CAF		Kontrol&CAF+Prob		Kontrol&Prob	
Parametre	Aktivite	mRNA	Aktivite	mRNA	Aktivite	mRNA
MDA	↑		↓		—	
GSH	↑		—		↑	
GSSG	↑		—		—	
—	↑		—		↑	
GPx/Gpx	↓	↓	↓	↓	—	—
GR/Gr	↑	↓	↑	↓	—	—
GST/Gst	↑	↑	↓	—	—	—

Sonuç olarak bu tez çalışmasında aşağıdaki bulgular elde edilmiştir;

- CAF diyeti verilen grupta MDA seviyesi kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak önemli ölçüde arttı.
- CAF diyeti verilen grupta artan MDA oranı SCD Probiotics takviyesi ile istatistiki olarak önemli derecede azaldı.
- Normal kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics takviyesiverilen Prob grubu MDA seviyesinin kontrol MDA seviyesine benzer olduğu gözlemlendi.
- CAF diyeti verilen grupta GSH seviyesi yükseldi. Bu yükselme MDA seviyesinde gözlenen artışa karşı oluşturulmuş metabolik bir tepki olabilir. Şöyle ki; CAF diyetinin olumsuz etkilerini tolere etmek için hücresel düzeyde GSH havuzu destekleniyor olabilir.
- CAF diyetine ek olarak SCD Probiotics verilen grupta GSH düzeyi kontrollere benzer seviyede gözlemlendi. Şöyle ki; SCD Probiotics takviyesi CAF diyeti ile artan GSH seviyesini yeniden düzenlediği tespit edildi.
- Normal kemirgen diyetine ek olarak SCD Probioticsbesin takviyesi verilen grupta GSH havuzunun artışı desteklendi.
- CAF diyeti verilen gurupta GSH seviyesinde gözlenen artışa benzer şekilde GSSG seviyesinin artmış olduğu tespit edildi. Bu sonuç CAF diyetine karşı metabolik bir tepki olarak GSH havuzunun arttırılması fikrini desteklemektedir.
- Normal kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics takviyesi verilen grupta kontrollere benzer GSSG seviyesi gözlemlendi.
- CAF diyeti grubunda GPx ekspresyon seviyeleri mRNA ve protein düzeyinde azaldı. Bu sonuç indirgenmiş çevrenin oluşturulması için GSH üretimini desteklemektedir.
- SCD Probiotics, CAF diyeti gurubunda görülen GPx enzim aktivitesini önemli derecede yükselterek kontrol grubu sonuçlarına yaklaştırdı. Ancak SCD Probiotics CAF diyetine karşı *Gpx* mRNA düzeyini istatistiki olarak önemsiz ölçüde (ns) yükselttiği tespit edildi.
- Normal kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics verilen grupta GPx ekspresyon seviyelerinde önemli bir değişim gözlenmedi.
- CAF diyeti verilen grupta *Gr* mRNA ekspresyonunda azalma ve GR enzim aktivitesinde artış gözlemlendi. Protein seviyesinde gözlenen bu sonuç GSH havuzunu destekleyen bir veridir.

- SCD Probiotics, CAF diyeti verilen grupta görülen *Gr* mRNA ekspresyonu ve GR enzim aktivitesi seviyelerini yeniden düzenleyerek kontrol grubu sonuçlarına yaklaştırdı.
- Normal kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics takviyesi verilen grupta *Gr* mRNA ekspresyonu ve GR enzim aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmedi.
- CAF diyeti verilen grupta *Gst* mRNA seviyesi istatistiki olarak önemsiz derecede (ns) ancak enzim aktivitesi olarak önemli derecede yükseldi.
- *Gst* mRNA sonuçlarında SCD Probiotics, CAF diyetinin etkisini istatistiki olarak önemsiz şekilde düzenlemişken protein seviyesinde GST enzim aktivitesini önemli derecede azalttı.
- Normal kemirgen diyetine ek olarak SCD Probiotics takviyesi verilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak önemli bir değişim gözlenmedi.

KAYNAKLAR

- Acan, N., Tezcan, E. 1989. Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties, *FEBS letters*, 250(1), 72-74.
- Akkuş, İ. 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, *Mimoza Yayınları*, Konya, 1, 57-63.
- Aköz, M., Vatansev, H., Gürbilek, M., Akkuş, İ., Vatansev, C., Kaptanoğlu, B. 2000. Glutasyon S-transferaz (GST) izoenzimlerinin çeşitli kanser vakalarında araştırılması, *Genel Tıp Dergisi*.
- Akpoyraz, M., Durak, İ. 1995. Serbest radikallerin biyolojik etkileri.
- Aksoy, Y. 2002. Antioksidan mekanizmada glutasyonun rolü, *T Klin Tıp Bilimleri*, 22, 442-448.
- Alan, Y., Savcı, A., Koçpınar, E.F., Ertaş, M. 2022. Postbiotic metabolites, antioxidant and anticancer activities of probiotic *Leuconostoc pseudomesenteroides* strains in natural pickles, *Archives of Microbiology*, 204(9), 1-13.
- AlGhuri, A., Volski, A., Cugini, C., Walsh, E.M., Chistyakov, V.A., Mazanko, M.S., Bren, A.B., Dicks, L.M., Chikindas, M.L. 2016. Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895, *Advances in Microbiology*, 6(6), 432-452.
- Altomare, E., Vendemiale, G., Albano, O. 1988. Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and non alcoholic liver diseases, *Life sciences*, 43(12), 991-998.
- Altunkaynak, B.Z., Özbek, E. 2006. Obezite: nedenleri ve tedavi seçenekleri, *Van Tıp Dergisi*, 13(4), 138-142.
- Anal, A.K., Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, *Trends in food science & technology*, 18(5), 240-251.
- Arrick, B.A., Nathan, C.F. 1984. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review, *Cancer research*, 44(10), 4224-4232.
- Arslan, N. 2014. Obezite ile Barsak Mikrobiyotası İlişkisi ve Obezitede Prebiyotikler ve Probiyotiklerin Kullanımı, *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 42(2), 148-153.
- Aslankoç, R., Demirci, D., Ümmahan, İ., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E.Ş., Yılmaz, B. 2019. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü- Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GPX), *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362-369.
- Ayvaz, Z. 2021. Antioksidanlar, *Ekoloji*, 26.
- Barber, D.A., Harris, S.R. 1994. Oxygen Free Radicals and Antioxidants: A Review: The use of antioxidant vitamin supplements to scavenge free radicals could decrease the risk of disease, *American pharmacy*, 34(9), 26-35.
- Başer, K. 2002a. Fonksiyonel gıdalar ve nutrasötikler. 14, *Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı, Bildiriler*, 29, 31.
- Başer, K. 2002b. Fonksiyonel gıdalar ve nutrasötikler. 14, *Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı, Bildiriler*, 29-31.

- Bayol, S.A., Farrington, S.J., Stickland, N.C. 2007. A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring, *British Journal of Nutrition*, 98(4), 843-851.
- Beilharz, J., Kaakoush, N., Maniam, J., Morris, M. 2018. Cafeteria diet and probiotic therapy: cross talk among memory, neuroplasticity, serotonin receptors and gut microbiota in the rat, *Molecular psychiatry*, 23(2), 351-361.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Budak, H., Gonul, N., Ceylan, H., Kocpinar, E.F. 2014. Impact of long term Fe(3)(+) toxicity on expression of glutathione system in rat liver, *Environ Toxicol Pharmacol*, 37(1), 365-70.
- Buettner, G.R., Ng, C.F., Wang, M., Rodgers, V., Schafer, F.Q. 2006. A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state, *Free Radical Biology and Medicine*, 41(8), 1338-1350.
- Büyükdere, Y. 2018. Sıçanlarda Kafeterya Diyeti ve Yüksek Yağlı Diyetin Obezite İle İlişkili Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması.
- Can, Ö.P., Hijyen, F.Ü.V.F.B., Teknolojisi-ELAZIĞ, G. 2007. Probiyotik Mikroorganizmaların İmmün Sistem Üzerine Etkisi, *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, 194-196.
- Carlberg, I., Mannervik, B. 1985. Glutathione reductase, *Methods Enzymol*, 113, 484-90.
- Ceylani, T. 2023. Effect of SCD probiotics supplemented with tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) application on the aged rat gut microbiota composition, *Journal of Applied Microbiology*, 134(5), lxad092.
- Chai, Y.-C., Ashraf, S.S., Rokutan, K., Johnston, R.B., Thomas, J.A. 1994. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide, *Archives of biochemistry and biophysics*, 310(1), 273-281.
- Chang, H.M., Foo, H.L., Loh, T.C., Lim, E.T.C., Abdul Mutalib, N.E. 2021. Comparative studies of inhibitory and antioxidant activities, and organic acids compositions of postbiotics produced by probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from Malaysian foods, *Frontiers in veterinary science*, 1182.
- Chapman, C., Gibson, G.R., Rowland, I. 2011. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains?, *European journal of nutrition*, 50(1), 1-17.
- Chen, Y.-M., Wei, L., Chiu, Y.-S., Hsu, Y.-J., Tsai, T.-Y., Wang, M.-F., Huang, C.-C. 2016. *Lactobacillus plantarum* TWK10 supplementation improves exercise performance and increases muscle mass in mice, *Nutrients*, 8(4), 205.
- Circu, M.L., Aw, T.Y. 2012. Glutathione and modulation of cell apoptosis, *Biochim Biophys Acta*, 1823(10), 1767-77.

- Civelek, M. 2018. C ve E vitaminlerinin kromozom hasarları üzerindeki etkileri, İstanbul Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Cnubben, N.H., Rietjens, I.M., Wortelboer, H., van Zanden, J., van Bladeren, P.J. 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense, *Environmental toxicology and pharmacology*, 10(4), 141-152.
- Cook, J.B., Hendrickson, L.M., Garwood, G.M., Toungate, K.M., Nania, C.V., Morikawa, H. 2017. Junk food diet-induced obesity increases D2 receptor autoinhibition in the ventral tegmental area and reduces ethanol drinking, *PLoS One*, 12(8), e0183685.
- Cutting, S.M. 2011. *Bacillus* probiotics, *Food microbiology*, 28(2), 214-220.
- Çeltik, C., Tayfun, K., Mülümanoğlu, A.Y. 2022. Simbiyotik özellikli gıdalar, Bütünleyici ve Anadolu Tıbbı Dergisi, 3(2), 3-12.
- Çöteli, E., Alataş, M., Batan, N. 2017. *Syntrichia ruralis* ve *Syntrichia montana* (Pottiaceae) Taksonlarının Glutasyon İçeriklerinin Karşılaştırılması, *Anatolian Bryology*, 3(1), 25-30.
- Dalal, M., Khanna-Chopra, R. 2001. Differential response of antioxidant enzymes in leaves of necrotic wheat hybrids and their parents, *Physiologia Plantarum*, 111(3), 297-304.
- Demirtaş, C., Ofluğlu, E., Hussein, A., Paşaoğlu, H. 2012. Kafeinin Rat Karaciğerinde Oksidan Antioksidan Mekanizmalara Etkisi, *Gazi Medical Journal*, 23(1).
- Deveci, M., Öztürk, S., Bayram, Y., Aydın, A., Ayşe, E., Şengezer, M. 2005. Diyabetik yaraların tedavisinde topikal glutasyon uygulaması, *Türk Plastik Rekonstrüktif Ve Estetik Cerrahi Dergisi*, 13(3), 179-184.
- Diken, M. (2009), "Bazı Şifalı Bitkilerin Antioksidan İçerikleri. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü", Yüksek Lisans Tezi, 93 sy,
- Dikici, A. 2009. Çevresel stres faktörlerine karşı bakteriyel adaptasyonlar ve mekanizmaları, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4(3), 59-68.
- Drisko, J.A., Giles, C.K., Bischoff, B.J. 2003. Probiotics in health maintenance and disease prevention, *Alternative Medicine Review*, 8(2), 143-155.
- Duman, H., Kurt, Ö. 2017. Serum Ürik Asit Seviyelerinin Abdominal Aort Anevrizması Varlığı ile İlişkisi, *MN Kardiyoloji*, 24(2), 73-77.
- Dunne, C. 2001. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder, *Inflammatory bowel diseases*, 7(2), 136-145.
- Duygu, A., Ertürkmen, P. 2017. Probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus* spp. suşlarının kolesterol düşürücü etkileri ve olası mekanizmalar, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(1), 108-113.
- Dündar, Y., Anlaşılması, A.R.H.M.S., Radikaller, F.Ö.A. 1999. Antioksidanlar, *İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi*, 2(2), 134-142.
- Ejtahed, H.S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., Mofid, V. 2012. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients, *Nutrition*, 28(5), 539-543.

- Epp, O., Ladenstein, R., Wendel, A. 1983. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution, *European Journal of Biochemistry*, 133(1), 51-69.
- Ersoy, N., Açıkgöz, A., Özgürtaş, T. 2018. Probiyotikler ve Yara İyileşme Sürecine Etkileri: Anjiyogenez Üzerine Etki Mekanizması, *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 46(3), 303-310.
- Farnaud, S., Evans, R.W. 2003. Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties, *Molecular immunology*, 40(7), 395-405.
- Fattman, C.L., Schaefer, L.M., Oury, T.D. 2003. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine, *Free Radical Biology and Medicine*, 35(3), 236-256.
- Fidan, C., Yılmaz, C., Konuş, M. 2019. Detoksifikasyon Enzim Sistemleri ve Glutasyon S-Transferazlar, *Scientific Developments*, 76.
- Fidelus, R., Tsan, M. 1987. Glutathione and lymphocyte activation: a function of ageing and auto-immune disease, *Immunology*, 61(4), 503.
- Fırat, S. 1997. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutasyon, glutasyon peroksidaz, glutasyon-S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi, *Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya AB Dalı, Uzm. Tezi*, Ankara, 95s.
- Foolad, N., Brezinski, E.A., Chase, E.P., Armstrong, A.W. 2013. Effect of nutrient supplementation on atopic dermatitis in children: a systematic review of probiotics, prebiotics, formula, and fatty acids, *JAMA dermatology*, 149(3), 350-355.
- Gallagher, E.P., Gardner, J.L., Barber, D.S. 2006. Several glutathione S-transferase isozymes that protect against oxidative injury are expressed in human liver mitochondria, *Biochemical pharmacology*, 71(11), 1619-1628.
- Gandhi, S., Abramov, A.Y. 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012.
- Ghosh, J., Myers, C.E. 1998. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(22), 13182-13187.
- Gil-Cardoso, K., Ginés, I., Pinent, M., Ardévol, A., Terra, X., Blay, M. 2017. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats, *British Journal of Nutrition*, 117(2), 218-229.
- Giray Kurt, A. (2007), "Callisto Herbisitinin Zea mays L.(Mısır)'ın Martha F1 Kültür formunda total glutasyon, glutasyon redüktaz, glutasyon-S-transferaz ve pigment içeriği üzerine etkileri",
- Griffith, O.W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine, *Anal Biochem*, 106(1), 207-12.
- Gu, Z., Liu, Y., Hu, S., You, Y., Wen, J., Li, W., Wang, Y. 2019. Probiotics for alleviating alcoholic liver injury, *Gastroenterology Research and Practice*, 2019.
- Gutteridge, J. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clinical chemistry*, 41(12), 1819-1828.

- Güller, P. 2015. Gentamisin, Amoksisilin Ve Sefazolin Sodyum Antibiyotiklerinin Fare Karaciğer ve Böbrek Glutasyon Redüktaz Enziminin Aktivite, Protein ve Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 92, 1-5.
- Gyamfi, M.A., Ohtani, I.I., Shinno, E., Aniya, Y. 2004. Inhibition of glutathione S-transferases by thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, in vitro, *Food and Chemical Toxicology*, 42(9), 1401-1408.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I.M., Jakoby, W.B. 1974. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(10), 3879-82.
- Hall, K.D., Ayuketah, A., Brychta, R., Cai, H., Cassimatis, T., Chen, K.Y., Chung, S.T., Costa, E., Courville, A., Darcey, V. 2019. Ultra-processed diets cause excess calorie intake and weight gain: an inpatient randomized controlled trial of ad libitum food intake, *Cell metabolism*, 30(1), 67-77. e3.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. 1990. [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods in enzymology*, 186, 1-85.
- Halprin, K.M., Ohkawara, A. 1967. The measurement of glutathione in human epidermis using glutathione reductase, *J Invest Dermatol*, 48(2), 149-52.
- Hayes, J.D., Strange, R.C. 2000. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences, *Pharmacology*, 61(3), 154-166.
- Hellou, J., Ross, N.W., Moon, T.W. 2012. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota, *Environ Sci Pollut Res Int*, 19(6), 2007-23.
- Hemarajata, P., Versalovic, J. 2013. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation, *Therapeutic advances in gastroenterology*, 6(1), 39-51.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S. 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*.
- Ho, Y.-S., Magnenat, J.-L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., Funk, C.D. 1997. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia, *Journal of Biological Chemistry*, 272(26), 16644-16651.
- Hur, S.J., Lee, S.Y., Kim, Y.-C., Choi, I., Kim, G.-B. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods, *Food chemistry*, 160, 346-356.
- Ighodaro, O., Akinloye, O. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.
- Imanishi, H., Nakai, T., Abe, T., Takino, T. 1985. Glutathione metabolism in red cell aging, *Mechanisms of ageing and development*, 32(1), 57-62.

- Izuddin, W.I., Humam, A.M., Loh, T.C., Foo, H.L., Samsudin, A.A. 2020. Dietary postbiotic *Lactobacillus plantarum* improves serum and ruminal antioxidant activity and upregulates hepatic antioxidant enzymes and ruminal barrier function in post-weaning lambs, *Antioxidants*, 9(3), 250.
- Jha, N., Jurma, O., Lalli, G., Liu, Y., Pettus, E.H., Greenamyre, J.T., Liu, R.-M., Forman, H.J., Andersen, J.K. 2000. Glutathione Depletion in PC12 Results in Selective Inhibition of Mitochondrial Complex I Activity: Implications for Parkinson's Disease, *Journal of Biological Chemistry*, 275(34), 26096-26101.
- Johnson, A.R., Wilkerson, M.D., Sampey, B.P., Troester, M.A., Hayes, D.N., Makowski, L. 2016. Cafeteria diet-induced obesity causes oxidative damage in white adipose, *Biochemical and biophysical research communications*, 473(2), 545-550.
- Kahlon, T.S., Smith, G.E. 2004. Health Benefits of Grains, Fruits, and Vegetables and the USDA Food Guide Pyramid1, *Cereal foods world*, 49(5), 288.
- Kahraman, A., Çakar, H., Vurmaz, A., Gürsoy, F., Koçak, S., Serteser, M. 2003. Ağır Egzersizin Oksidatif Stres Üzerindeki Etkisi, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 4(2).
- Kanat, N., Akdemir, S. 2014a. Bakterilerde glutatyon ve önemi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 18(2), 111-117.
- Kanat, N., Akdemir, S. 2014b. Bakterilerde glutatyon ve önemi, *Sakarya University Journal of Science*, 18(2), 111-117.
- Karabulut, H., Gülay, M.Ş. 2016a. Antioksidanlar, *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1(1), 65-76.
- Karabulut, H., Gülay, M.Ş. 2016b. Serbest radikaller, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1).
- Karafakıoğlu, Y.S. 2010. Antioksidanlar ve bir antioksidan olarak taurin, *Kocatepe Veterinary Journal*, 3(1), 55-61.
- Karakaş, H.M., Saka, M. 2021. Obez Olan ve Olmayan Yetişkin Bireylerde Sezgisel Yeme Davranışının Hedonik Açlık ve Aşırı Besin İsteği İle İlişkisinin Belirlenmesi, *Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi-BÜSBİD*, 6.
- Karataş, F., Aşkın, U., Halifeoğlu, İ., Dönder, E. 2006. Guatr'lı hastalarda antioksidan vitaminler (A, E ve C), Selenyum ve Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) düzeylerinin araştırılması, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Tıp)*, 20(4), 277-280.
- Kasnak, C., Palamutoğlu, R. 2015. Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri, *Türk tarım-gıda bilim ve teknoloji dergisi*, 3(5), 226-234.
- Kavas, G.Ö. 1994. Reaktif Oksijen Metabolitlerine Fizyopatolojik Yaklaşım, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 47(4).
- Kıran, B. (2009), "Serviks Kanseriinde Glutatyon-S-Transferaz M1, Glutatyon-S-Transferaz T1, Glutatyon-S-Transferaz P1 ve Toll Like Reseptör-9 Gen Polimorfizminin araştırılması", *Bursa Uludag University (Turkey)*,

- Knapen, M.F., Zusterzeel, P.L., Peters, W.H., Steegers, E.A. 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: a review, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 82(2), 171-184.
- Koç, M., İmİK, H., Odabaşıoğlu, F. 2007. Ratlarda indometazin ile oluşturulan gastrik hasar üzerine askorbik asit'in gastroprotektif etkilerinin ve bu etkilerin antioksidan sistem ile ilişkisinin belirlenmesi, *Atatürk Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Ana Bilim Dalı*, 122.
- Koçpınar, E.F. 2015. Tip60 geninin oksidatif stres üzerine etkisinin karaciğer spesifik tip60 nakavt farelerde araştırılması, *Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 153, 126-127.
- Kohen, R., Nyska, A. 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, *Toxicologic pathology*, 30(6), 620-650.
- Krauth-Siegel, R.L., Bauer, H., Schirmer, R.H. 2005. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia, *Angewandte Chemie International Edition*, 44(5), 690-715.
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annuk, H., Kairane, C., Kilk, A. 2002. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics, *International journal of food microbiology*, 72(3), 215-224.
- Kurokawa, T., Kobayashi, H., Nonami, T., Harada, A., Nakao, A., Takagi, H. 1996. Mitochondrial glutathione redox and energy producing function during liver ischemia and reperfusion, *Journal of Surgical Research*, 66(1), 1-5.
- La Russa, D., Giordano, F., Marrone, A., Parafati, M., Janda, E., Pellegrino, D. 2019. Oxidative imbalance and kidney damage in cafeteria diet-induced rat model of metabolic syndrome: Effect of bergamot polyphenolic fraction, *Antioxidants*, 8(3), 66.
- Labbé, P., Alout, H., Djogbénu, L., Pasteur, N., Weill, M. 2011. Evolution of resistance to insecticide in disease vectors. in: *Genetics and evolution of infectious disease*, Elsevier, pp. 363-409.
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), 21-33.
- Leigh, S.-J., Kendig, M.D., Morris, M.J. 2019. Palatable western-style cafeteria diet as a reliable method for modeling diet-induced obesity in rodents, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(153), e60262.
- Leigh, S.-J., Morris, M.J. 2018. The role of reward circuitry and food addiction in the obesity epidemic: An update, *Biological psychology*, 131, 31-42.
- Leite, A.M.d.O., Miguel, M.A.L., Peixoto, R.S., Rosado, A.S., Silva, J.T., Paschoalin, V.M.F. 2013. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage, *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 341-349.
- Limón-Pacheco, J., Gonsébat, M.E. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative

- stress, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 674(1-2), 137-147.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25(4), 402-8.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
- López-Alarcón, C., Denicola, A. 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays, *Analytica chimica acta*, 763, 1-10.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B.C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food, *International dairy journal*, 11(1-2), 1-17.
- Luis, A., Corpas, F.J., López-Huertas, E., Palma, J.M. 2018. Plant superoxide dismutases: function under abiotic stress conditions. in: *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*, Springer, pp. 1-26.
- Manukyan, M.N., Yavuz, Y., Erbarut, İ., Ögünç, A.V., Ataizi-Çelikel, Ç., Yalçın, A.S., Güllüoğlu, B.M. 2008. Sıçanlarda whey proteini ile oluşturulan glutatyon önkoşullandırmasının karaciğer sıcak iskemi/reperfüzyon hasarında hem oksijenaz-1 sistemi üzerine etkisi, *Turkish Journal of Surgery*, 24(3), 137-144.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products, *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199.
- Martarelli, D., Verdenelli, M.C., Scuri, S., Cocchioni, M., Silvi, S., Cecchini, C., Pompei, P. 2011. Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training, *Current microbiology*, 62(6), 1689-1696.
- Mårtensson, J., Lai, J., Meister, A. 1990. High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(18), 7185-7189.
- Masip, L., Veeravalli, K., Georgiou, G. 2006. The many faces of glutathione in bacteria, *Antioxidants & redox signaling*, 8(5-6), 753-762.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., Saarela, M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods, *International Dairy Journal*, 12(2-3), 173-182.
- Meagher, E., Rader, D.J. 2001. Antioxidant therapy and atherosclerosis: animal and human studies, *Trends in cardiovascular medicine*, 11(3-4), 162-165.
- Meister, A., Anderson, M.E. 1983. Glutathione, *Annual review of biochemistry*, 52(1), 711-760.
- Memişoğulları, R. 2005. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi, *Duzce medical journal*, 7(3), 30-39.
- Meral, R., Doğan, İ.S., Kanberoğlu, G.S. 2012. Fonksiyonel gıda bileşeni olarak antioksidanlar, *Journal of the Institute of Science and Technology*, 2(2), 45-50.

- Mills, G.C. 1957. Hemoglobin catabolism: I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown, *Journal of Biological Chemistry*, 229(1), 189-197.
- Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., Prajapati, J. 2015. Probiotics as potential antioxidants: a systematic review, *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(14), 3615-3626.
- Moldovan, L., Moldovan, N.I. 2004. Oxygen free radicals and redox biology of organelles, *Histochemistry and cell biology*, 122(4), 395-412.
- Morón, Ú.M., Castilla-Cortázar, I. 2012. Protection against oxidative stress and “IGF-I deficiency conditions”, *Antioxidant enzyme*, 89.

M

- Mucellimi, A.B., Goularte, J.F., da Cunha, A.C.d.A., Caceres, R.C., Noschang, C., da Silva Benetti, C., Silveira, P.P., Sanvitto, G.L. 2014. Effects of exposure to a cafeteria diet during gestation and after weaning on the metabolism and body weight of adult male offspring in rats, *British journal of nutrition*, 111(8), 1499-1506.
- Mungan, A.G. 1996. Kan bankalarında CPDA-1 (Citrate Phosphate Dextrose Adenine) ile saklanan kanlarda allopürinölün lipid peroksidasyonu ve biyokimyasal parametrelere etkisinin incelenmesi.
- Murray, K., Rodwell, V., Bender, D., Botham, K.M., Weil, P.A., Kennelly, P.J. 2009. *Harper's illustrated biochemistry*. 28, Citeseer, New York, United States.
- Nollet, L.M., Toldrá, F., 2012, *Handbook of analysis of active compounds in functional foods*, CRC Press,
- Nordberg, J., Arnér, E.S. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.
- Oğuztüzün, S., Abu-Hijleh, A., Coban, T., Bulbul, D., Kılıç, M., İşcan, M., Iscan, M. 2011. GST isoenzymes in matched normal and neoplastic breast tissue, *Neoplasma*, 58(4).
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem*, 95(2), 351-8.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3122-3128.
- Owen, J.B., Butterfield, D.A. 2010. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. In: *Protein misfolding and cellular stress in disease and aging*, Springer, pp. 269-277.
- Öğüt, S. 2014. Doğal antioksidanların önemi.

- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z. 2015. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336.
- Özçalışkan İlkey, H., Ozcaliskan Ilkay, H. 2020. Kinoa'nın (*Chenopodium quinoa* Willd.) Kafeterya Diyetiyle Beslenen Ratlarda Glikoz Homeostazına Etkisi.
- Özdemir, Ö. 2015. Probiyotikler ve Alerji.
- Özden, A. 2006. Sağlıklı Yaşam İçin Yararlı Dost Bakteriler, Türk Gastroentoloji Vakfı Yayınları, Ankara.
- Özkan, A., Fışkın, K. 2004. Serbest oksijen radikalleri, karsinogenez ve antioksidant enzimler, *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 14, 52-60.
- Öztürk, İ. 2022. Beslenmede fermente gıdalar ve probiyotikler, *Beslenme ve Diyetetikte Biyopsikososyal Konulara Multidisipliner Yaklaşım*, 39.
- Paik, H.-D., Park, J.-S., Park, E. 2005. Effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD on lipid and antioxidant metabolisms in rats fed a high-fat and high-cholesterol diet, *Biological and pharmaceutical bulletin*, 28(7), 1270-1274.
- Pandey, T., Singh, S.K., Chhetri, G., Tripathi, T., Singh, A.K. 2015. Characterization of a highly pH stable chi-class glutathione S-transferase from *Synechocystis* PCC 6803, *PLOS one*, 10(5), e0126811.
- Percival, M. 1997. Phytonutrients and detoxification, *Clinical nutrition insights*, 5(2), 1-4.
- Pini, R.T.B., Ferreira do Vales, L.D.M., Braga Costa, T.M., Almeida, S.S. 2017. Effects of cafeteria diet and high fat diet intake on anxiety, learning and memory in adult male rats, *Nutritional Neuroscience*, 20(7), 396-408.
- Pisoschi, A.M., Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Plummer, S.F., Garaiova, I., Sarvotham, T., Cottrell, S.L., Le Scouiller, S., Weaver, M.A., Tang, J., Dee, P., Hunter, J. 2005. Effects of probiotics on the composition of the intestinal microbiota following antibiotic therapy, *International journal of antimicrobial agents*, 26(1), 69-74.
- Pocernich, C.B., Cardin, A.L., Racine, C.L., Lauderback, C.M., Butterfield, D.A. 2001. Glutathione elevation and its protective role in acrolein-induced protein damage in synaptosomal membranes: relevance to brain lipid peroxidation in neurodegenerative disease, *Neurochemistry international*, 39(2), 141-149.
- Poljsak, B., Šuput, D., Milisav, I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- Poole, L.B. 2015. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry, *Free Radical Biology and Medicine*, 80, 148-157.
- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., Freeman, B.A. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria, *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 22028-22034.
- Rafter, J. 2002. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective, *British Journal of Nutrition*, 88(S1), S89-S94.

- Rahman, I., MacNee, W. 2000. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation, *European Respiratory Journal*, 16(3), 534-554.
- Raya, C.E., Bandyopadhyay, D. 2018. Glutathione: A small molecule with big sense, *International Journal of Pharma Sciences and Scientific Research*, 4(5).
- Rayman, M.P. 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action, *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(4), 527-542.
- Raza, H. 2011. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease, *The FEBS journal*, 278(22), 4243-4251.
- Reuter, T.Y. 2007. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes, *Drug discovery today: disease models*, 4(1), 3-8.
- Rogers, P.J., Blundell, J.E. 1984. Meal patterns and food selection during the development of obesity in rats fed a cafeteria diet, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 8(4), 441-453.
- Rosenheck, R. 2008. Fast food consumption and increased caloric intake: a systematic review of a trajectory towards weight gain and obesity risk, *Obesity reviews*, 9(6), 535-547.
- Rothwell, N.J., Stock, M.J. 1982. Effects of feeding a palatable 'cafeteria' diet on energy balance in young and adult lean (+/?) Zucker rats, *British Journal of Nutrition*, 47(3), 461-471.
- Sahan, A., Kurutas, E., Dikel, S. 2003. Tatli Suya Adapte Edilmiş Levrek (*Dicentrarchus labrax*)'lerde Karaciger Antioksidan Sistemler ve Lipid Peroksidasyonu, *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 27(6).
- Sampey, B.P., Vanhoose, A.M., Winfield, H.M., Freemerman, A.J., Muehlbauer, M.J., Fueger, P.T., Newgard, C.B., Makowski, L. 2011. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet, *Obesity*, 19(6), 1109-1117.
- Sarıkaya, E., Doğan, S. 2020. Glutathione Peroxidase in Health and Diseases, *Glutathione system and oxidative stress in health and disease*.
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free radical biology and medicine*, 30(11), 1191-1212.
- Schäfer, M., Werner, S. 2011. The cornified envelope: a first line of defense against reactive oxygen species, *Journal of Investigative Dermatology*, 131(7), 1409-1411.
- Schimidt, H.L., Garcia, A., Martins, A., Garcia, M., Soares, M.B., Cibin, F.W., Mello-Carpes, P.B., Carpes, F.P. 2018. Effects of cafeteria diet on memory and hippocampal oxidative stress in a rat model of Alzheimer-like disease: Neuroprotection of green tea supplementation, *Journal of Functional Foods*, 49, 277-284.
- Sclafani, A., Springer, D. 1976. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes, *Physiology & behavior*, 17(3), 461-471.

- Scoaris, C.R., Rizo, G.V., Roldi, L.P., de Moraes, S.M.F., de Proença, A.R.G., Peralta, R.M., Natali, M.R.M. 2010. Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats, *Nutrition*, 26(3), 312-320.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y., De, B. 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect, *International journal of pharmaceutical sciences review and research*, 3(1), 91-100.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily, *Biochemical journal*, 360(1), 1-16.
- Shida, K., Nomoto, K. 2013. Probiotics as efficient immunopotentiators: translational role in cancer prevention, *The Indian journal of medical research*, 138(5), 808.
- Sies, H., Cadenas, E. 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 311(1152), 617-631.
- Smirnova, G., Oktyabrsky, O. 2005. Glutathione in bacteria, *Biochemistry (Moscow)*, 70(11), 1199-1211.
- Stamler, J.S., Slivka, A. 1996. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease, *Nutrition Reviews*, 54(1), 1-30.
- Storz, G., Hengge-Aronis, R., 2011, *Bacterial stress responses*, *Wiley Online Library*,
- Suárez-García, S., Del Bas, J.M., Caimari, A., Escorihuela, R.M., Arola, L., Suárez, M. 2017. Impact of a cafeteria diet and daily physical training on the rat serum metabolome, *PLoS One*, 12(2), e0171970.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ. 2008. Dantrolene inhibits human erythrocyte glutathione reductase, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(11), 2036-2039.
- Tak, T. (2018), "Broiler karaciğerinden saflaştırılan glutatyon S-transferaz enzimi üzerine bazı ağır metallerin etkisinin incelenmesi", Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
- Taylan, E., Resmi, H. 2010. The analytical performance of a microplate method for total sulfhydryl measurement in biological samples, *Turkish Journal of Biochemistry - Türk Biyokimya Dergisi*, 35(3), 275-278.
- Temel, Y., Bozkuş, T., Karagözoğlu, Y., Çiftçi, M. 2017. Glutatyon redüktaz (GR) enziminin japon bıldırcın (*Coturnix coturnix japonica*) eritrositlerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu, *Journal of the Institute of Science and Technology*, 7(3), 143-150.
- Tozkoparan, B., Aytaç, S.P. 2007. Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak glutatyon S-transferazlar, *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*(2), 139-164.
- Tripathi, M.K., Giri, S.K. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, *Journal of functional foods*, 9, 225-241.

- Valle, A., Oliver, J., Roca, P. 2010. Role of uncoupling proteins in cancer, *Cancers*, 2(2), 567-591.
- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4113-4117.
- Venturi, A., Gionchetti, P., Rizzello, F., Johansson, R., Zucconi, E., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Campieri, M. 1999. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis, *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 13(8), 1103-1108.
- Warden, C.H., Fisler, J.S. 2008. Comparisons of diets used in animal models of high fat feeding, *Cell metabolism*, 7(4), 277.
- Weitberg, A.B. 1990. Hydroxy-and Hydroperoxy-6, 8, 11, 14-Eicosatetraenoic Acids Induce Sister Chromatid Exchanges in Cultured Mammalian Cells, *The American journal of the medical sciences*, 299(1), 50-53.
- World Health Organization. 2009, Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks, *World Health Organization*,
- Wu, D., Meydani, S.N., Sastre, J., Hayek, M., Meydani, M. 1994. In vitro glutathione supplementation enhances interleukin-2 production and mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from young and old subjects, *The Journal of nutrition*, 124(5), 655-663.
- Yanbeyi, S. 1999. Aspirin ve antioksidant butylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri, *Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi*.
- Yavaşer, R. (2011), "Doğal ve sentetik antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması", *Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*,
- Yıldız, Ş., Turan, S. 2021. Timokinon, Timol ve Karvakrolün Antioksidan Aktiviteleri ve Lipit Oksidasyonunu Önleme Kapasiteleri, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 52(1), 108-118.
- Young, I., Woodside, J. 2001. Antioxidants in health and disease, *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.
- Yurdakök, M., 2015, Yoğurdun öyküsü: Probiyotiklerin tarihi, *Güneş Tıp Kitabevleri*,
- Zhao, Y., Seefeldt, T., Chen, W., Wang, X., Matthees, D., Hu, Y., Guan, X. 2009. Effects of glutathione reductase inhibition on cellular thiol redox state and related systems, *Archives of biochemistry and biophysics*, 485(1), 56-62.