

Anormal GM2 gangliosit birikiminin hücre metabolizmasındaki etkisi: erken başlangıçlı Tay-Sachs hastalığının fare modeli

Volkan SEYRANTEPE*

* İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ad, İzmir
volkanseyrantepe@iyte.edu.tr

Tay-Sachs hastalığı, GM2 gangliositini GM3 gangliositine eviren lizozomal β -hexosaminidaz A'nın (HEXA) α alt ünitesini kodlayan Hexa geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan ve ağır seyir gösteren bir hastalıktır. Hastalığın fare modeli olan Hexa-/- faresinde beklenmedik Őekilde normal bir yaşam döngüsüne sahiptir ve yaşamının son bir yılına kadar ciddi bir nörolojik bozukluk göstermemektedir. Fareler GM2 gangliositindeki sialik asiti sialidaz(lar) ile katabolize ederek GA2 glikolipitini oluşturur ve sonrasında β -hexosaminidaz tarafından işlem görür. Dolayısıyla, sialidazların varlığı ile birlikte Hexa bozukluğunun 'bypass' uğramasına neden olur. GM2 gangliositinin yıkımında Neu3 sialidazının katkısının olup olmadığını anlamak amacıyla HEXA ve NEU3 genleri mutasyona uğratılmış fareler elde edilmiştir. Hexa-/-Neu3-/- faresi doğumda sağlıklıdır ancak 1.5 ile 4.5 aylık yaş dilimleri içerisinde ölümler meydana gelmiştir. Histolojik ve immunohistokimyasal analizler sonucu nöron hücrelerinde sitoplazmik vakuoller görülmüştür. Beyin, böbrek ve testislerin elektron mikroskopik analiz sonuc sayıca fazla küçük veziküllerde ve kompleks lamellar yapılar da pleomorfik inklüzyonlar tesbit edilmiştir. Hexa-/-Neu3-/- faresinde sürekli artan nöronal kayıp ile birlikte nörodejenerasyon, purkinje hücrelerinin sayı kaybı ve astrogliozis görülmüştür. Yavaş

hareket, ataksi ve titreme bu farelerde gözlemlenen belirgin nörolojik anormalliklerdir. 4.5 aylık farelerin beyin ve 2.5 aylık farelerin visceral (böbrek, akciğer, karaciğer, kas ve testis) organlarından izole edilen asidik ve nötral gangliositlerin HPTLC analizlerinin sonucunda Hexa-/-Neu3-/- faresinin GM2 yıkımında ciddi tıkanıklık olduğu görülmüştür. Beyin ve diğer dokularda Hexa-/-Neu3-/- faresinde minor asidik gangliositlerin (GM2 ve GM3) birikimi görülmüştür. Nötral glikosifingolipit (GA2) seviyelerinde sadece Hexa-/-Neu3-/- faresinde nispeten artış vardır. Beyin özütlerinden yapılan ktle spektrofotometrik analizler sonucunda GM2, GM3 ve laktozilseramid(LacCer) ve GA2'de artış gözlemlenmiş ancak GA1 ve GM1 glikosifingolipitlerinde bir artış gözlemlenmemiştir. Ancak Neu3-/- faresinde LacCer ve az seviyelerde görülen GA1 yapıları Hexa-/- ve kontrol grubu faresine kıyasla anlamlı bir değişim göstermemiştir. Saggital fare beyin kesitlerinin MALDI-IMS analizleri ile özellikle hipokampus, serebellum ve kortekste olmak üzere bütün beyinde anormal boyutlarda GM2 birikimleri doğrulanmıştır. Bu karşılık serebellumda sadece az miktarda GA2 birikimi belirgindir. Sonuç olarak Hexa-/-Neu3-/- faresi klasik erken başlangıçlı Tay-Sachs hastalarının nöropatolojik ve klinik anormalliklerini taklit etmesinin yanısıra bu hastalığa yönelik potansiyel tedavilerin gelecekteki klinik öncesi testleri için uygun bir modeldir.



The effect of abnormal accumulation of GM2 ganglioside on cell metabolism: early onset Tay-Sachs disease mouse model.

Volkan SEYRANTEPE*

*İzmir High Technology Institute, Department of Molecular Biology and Genetics, Izmir
volkanseyrantepe@iyte.edu.tr

Tay-Sachs disease is a severe lysosomal storage disorder caused by mutations in Hexa, the gene that encodes for the α subunit of lysosomal β -hexosaminidase A (HEXA), which converts GM2 to GM3 ganglioside. Unexpectedly, Hexa^{-/-} mice have a normal lifespan and show no obvious neurological impairment until at least one year of age. These mice catabolize stored GM2 ganglioside using sialidase_(s) to remove sialic acid and form the glycolipid GA2, which is further processed by β -hexosaminidase B. Therefore, the presence of the sialidase_(s) allows the consequences of the Hexa defect to be bypassed. To determine if the sialidase NEU3 contributes to GM2 ganglioside degradation, we generated a mouse model with combined deficiencies of HEXA and NEU3. The Hexa^{-/-}Neu3^{-/-} mice were healthy at birth, but died at 1.5 to 4.5 months of age. Histological and immunohistochemical analysis demonstrated cytoplasmic vacuolation in the neurons. Electron microscopic examination of the brain, kidneys and testes revealed pleomorphic inclusions of many small vesicles and complex lamellar structures. The Hexa^{-/-}Neu3^{-/-} mice exhibited progressive neurodegeneration with neuronal loss, Purkinje cell depletion, and astrogliosis. Slow movement, ataxia, and tremors were the prominent neurological abnormalities observed in these mice.

HPTLC analysis of the acidic and neutral glycolipids of the brains (4.5 months of age) and visceral organs (kidneys, lungs, liver, muscle, and testes; 2.5 months of age) of Hexa^{-/-}Neu3^{-/-} mice which revealed a severe block in GM2 degradation. The abnormal accumulation of otherwise minor acidic gangliosides (GM2 and GM3) was observed in the brain and other tissues of Hexa^{-/-}Neu3^{-/-} mice. Slightly higher neutral glycosphingolipid (GA2) levels were detected only in the Hexa^{-/-}Neu3^{-/-} mice. Mass spectrometric analysis revealed the accumulation of GM2 and GM3 as well as lactosylceramide and GA2, but not GA1 or GM1 in the brain glycosphingolipid extracts of the Hexa^{-/-}Neu3^{-/-} mice. However, the slightly higher level of LacCer and the lower level of GA1 in Neu3^{-/-} mice was not significant compared to Hexa^{-/-} and WT mice, respectively. The analysis of sagittal mouse brain sections by MALDI-IMS confirmed the massive accumulation of GM2, in the whole brain, and especially in the cerebellum, hippocampus, and cortex, whereas the minor accumulation of GA2 was mainly concentrated in the cerebellum. Taken together, the Hexa^{-/-}Neu3^{-/-} mice mimic the neuropathological and clinical abnormalities of the classical early-onset Tay-Sachs patients, and provide a suitable model for the future pre-clinical testing of potential treatments for this condition.



Gaucher Hastalığı Patolojisinde Otofaji Moleküler Mekanizması

*Serap DÖKMECİ

* Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi
Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara
semre@hacettepe.edu.tr

Otofaji, sitozoldeki makromolekülleri ve organelleri otofajik vezikül adı verilen çift zarlı yapılar içine almak suretiyle lizozomlara taşıyan ve burada yıkılmasını sağlayarak hücre i dengesinin korunmasında önemli rol oynayan bir yıkım mekanizmasıdır. Gaucher Hastalığı, glikoserebrosidaz (GBA) enzimi mutasyonu sonucu, iç organlarda ve merkezi sinir sisteminde glikozilseramid ve diğer glikolipidlerin birikmesiyle ortaya çıkan bir lizozomal depo hastalığıdır.

Bugüne kadar otofajinin etkisi birçok lizozomal depo hastalığında gösterilmesine karşın, Gaucher hastalığındaki temel rolü yeterince açıklanamamıştır. Bu çalışmada, dört farklı mutasyon (L296V, N₃₇₀S, L444P,D409H)taşıyanGaucherhastalarından alınan fibroblastlarda, otofajinin moleküler mekanizması ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Transkripsiyonel ve protein analizleri sonucunda, otofaji-ilişkili gen (BECN1, ATG5 and LC₃) ifadelerinin hasta hrelerinde belirgin şekilde azaldığını ve bu genlerin kodladığı proteinlerin

biriktiği gözlemlenmiştir. Yapılan mikroskopik analizler, hasta hücrelerindeki protein birikiminin, otofagozom-lizozom birleşmesi bozukluğundan kaynaklandığını göstermiş olup, bu durumun artan lizozom pH'ı ve azalan lizozomal enzimatik aktivite ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bunlara ek olarak yapılan proteazomal yıkım mekanizması analizlerinde ise hasta hücrelerinde proteazomun proteolitik aktivitesinde belirgin bir dş gözlemlenmiş, bunun sonucu olarak da hasta hücrelerinin lme yatkınlığının arttığı tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgular, Gaucher hastalığında lizozom iç denge değişikliklerinin hem otofaji hem de proteazomal yıkım mekanizması aksaklıklarına yol açarak, hücrelerin ölüm oranının arttığına ve belki de Gaucher hastalarının klinik olarak farklı şiddet göstermelerinin altında yatan mekanizmalar olabileceğine işaret etmektedir.

Bu proje, TÜBİTAK-3501 Ulusal Genç Araştırmacı Kariyer Geliştirme Programı kapsamında, (Proje No: 112T130) desteklenmektedir..



Molecular mechanism of autophagic pathway in Gaucher cells

*Serap DÖKMECİ

* İHacettepe Univ. Faculty of Medicine, Dept.
of Medical Biology,
Ankara, Turkey
semre@hacettepe.edu.tr

Lysosomes regulate cellular homeostasis via degradation and recycling of biomolecules. Lysosomal hydrolyzes and lysosomal membrane-bound proteins are two main actors for functional lysosome and any mutation on the coding region of these proteins cause accumulation of un-metabolized target substrates in the cells and finally coming out of lysosomal storage disease (LSD). Gaucher's disease is a LSD resulting from the mutation of a lysosomal membrane-associated glycoprotein glucocerebrosidase (GBA) and GBA cofactor of saposin C. The disease cause intracellular accumulation of glucosylceramide and other glycolipids. Autophagy is a conserved cellular pathway, leading to the engulfment of portions of cytoplasm and organelles and subsequently delivers the cargo to lysosomes for degradation. Although the relevance of autophagy is shown in different LSDs, the underlying molecular mechanism in Gaucher disease is poorly understood. Here, we investigated molecular significance of autophagic pathway in fibroblasts cells

obtained from Gaucher patients. First, we analyzed the expression of autophagy and/or lysosome-related genes and proteins and then carried out active lysosome staining by using confocal microscopy analyses. In order to test autophagic flux, we used the differential pH sensitivities of RFP and GFP in mRFP-GFP-LC₃ probe. Finally, we investigated lysosomes in detail by performing enzymatic activity tests.

We observed significant attenuation in the expression of key autophagy-related genes and accumulation of their proteins in mutant cells. We found inhibition of autophagosomes to fuse with lysosomes, that is associated with lysosomal pH and reduced enzyme activity.

Our data indicate that autophagic pathway is directly affected by multifunctional lysosomes and may underlie the mechanism of clinical severity of Gaucher patients. Acknowledgement: This Project is supported by TUBITAK-3501 National Young Researchers Career Development Program, Project No: 112T130



Karaciğer Hücre Kültüründe Ve Karaciğer Dokusunda OluŐturulan Endoplazmik Retikulum Stresinin AraŐidonik Asit Salınımına ve İliŐkili İnflamatuar Yolaklara Etkisi

Prof. Dr. Mutay Aydın Aslan

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Biyokimya Anabilim Dalı, Antalya.
mutayaslan@akdeniz.edu.tr

Bu alıŐma endoplazmik retikulum (ER) stresi OluŐturulan hayvan ve hücre modelinde hepatik poliansatüre yağ asiti (PUFAs) deęiŐimlerini ve inflamatuvar yanıtı değerlendirmeyi amaçladı. Sıçanlar kontrol, tunikamisin (TM) ve TM + tauroursodeoksikolik acid (TUDCA) verilen gruplara ayrıldı. Hepatik ER stres tek doz tunikamisin (1 mg/kg vücut ağırlığı) enjeksiyonu ile indüklendi. ER stres inhibitörü olan TUDCA, ER stresi OluŐturulmadan 30 dk önce 250 mg/kg olarak enjekte edildi. Karaciğer THLE-3 hücrelerine 10 g/ml TM uygulanarak ER stresi indüklendi ve sitotoksik etkiyi azaltmak için 0.5 mM TUDCA TM inkübasyonundan 8 saat önce verildi. KC dokusunda OluŐan nekroinflamasyon hematoksilen-eozin ile boyanan KC kesitlerinde modifiye Ishak hepatik aktivite endeksine göre değerlendirilirken, hücre canlılığına MTT testi ile bakıldı. ER stres cevabının OluŐtuęu 78 kDa glukoz regüle protein (GRP 78) ve CCAAT/ enhanser bağlayıcı protein homolog protein (CHOP) ekspresyonunun immünohistokimyasal ve western blot analizi ile doğrulandı.

Karaciğer dokusunda ve THLE-3 hücrelerinde araŐidonik asit (AA, C20:4n6), dihomo-gama-linolenik asit (DGLA, C20:3n6), eikosapentaenoik asit (EPA, C20:5n3) ve dokosaheksaenoik asit (DHA, C22:6n3) seviyeleri çoklu reaksiyon izleme (MRM) metoduyla LC-MSMS ile belirlendi. Doku ve hücre örneklerinde inflamatuvar yolakları değerlendirmek için fosfolipaz A2 (PLA2), siklooksijenaz (COX) ve prostaglandin E2 (PGE2) lmleri yapıldı. Hepatik ER stres OluŐumu TM uygulaması ile sağlandı ve TUDCA verilerek azaltıldı. Tunikamisin tedavisi hem KC dokusunda hem de THLE-3 hücrelerinde ölçülen tüm PUFA'ları anlamlı olarak azalttı. PLA2 aktivitesi, COX ve PGE2 seviyeleri TM verilen sıçanlarda ve THLE-3 hücrelerinde anlamlı olarak arttı. Tauroursodeoksikolik acid, KC PUFA seviyelerinde bir miktar artış sağladı, PLA2, COX ve PGE2 seviyelerini düŐürdü. ÇalıŐmanın sonuçları hepatik ER stres varlığında proinflamatuvar durumun varlığını gösterdi. ER stresinde PUFA seviyelerindeki azalmayı ilk defa bu çalıŐma rapor etmektedir ve sonuçlar ER stresi OluŐan KC hastalıklarında omega-3 yağ asidi kullanımını destekler niteliktedir.



Changes in PUFA Levels and Inflammation in an Animal and Cell Model of Hepatic Endoplasmic Reticulum Stress

Mutay Aydın Aslan

Department of Medical Biochemistry Akdeniz
University Faculty of Medicine, Antalya 07070,
Turkey
mutayaslan@akdeniz.edu.tr

The presence of endoplasmic reticulum (ER) stress is as an important contributing factor in various liver diseases, including alcoholic liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, drug-induced liver injury, acute-on- chronic liver failure and hepatocellular carcinoma. Thus, investigating the ER stress response in both animal models and cell cultures can help to understand the pathology of these diseases. This study aimed to determine hepatic polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and inflammatory response in an animal and cell model of ER stress. Rats were divided into control, tunicamycin (TM) treated and TM + tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) treated groups. Hepatic ER stress was induced by TM and the ER stress inhibitor TUDCA was injected 30 minutes before induction of ER stress. Liver THLE-3 cells were treated with TM to induce ER stress and TUDCA was administered in advance to decrease cytotoxic effects. Necroinflammation was evaluated in liver sections while cell viability was determined via MTT assay. ER stress was confirmed by immunofluorescence and western blot analysis of C/EBP-homologous protein (CHOP) and 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78). Arachidonic acid (AA, C20:4n-6), dihomo-gamma-linolenic acid (DGLA, C20:3n-6), eicosapentaenoic acid

(EPA, C20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) in liver tissue and THLE-3 cells were determined by LC- MS/MS. Phospholipase A2 (PLA2), cyclooxygenase (COX) and prostaglandin E2 (PGE2) were measured in tissue and cell samples via ELISA. Hepatic ER stress was accomplished by TM and was alleviated by TUDCA. Tunicamycin treatment significantly decreased PUFAs in both liver tissue and THLE-3 cells compared to controls. Activity of PLA2, COX and PGE2 levels were significantly increased in TM treated rats and THLE-3 cells compared to controls. Tauroursodeoxycholic acid lead to a partial restoration of liver PUFA levels and decreased PLA2, COX and PGE2. In summary, we report that TM treatment results in significantly decreased PUFA levels and leads to significantly increased activity of cPLA2, COX and PGE2 levels in rat liver and human hepatocytes. We also shows that TUDCA increases PUFA levels and alleviates cPLA2, COX and PGE2 levels in liver tissue of TM treated rats. To our best knowledge, this is the first study reporting decreased PUFA levels in ER stress and supports the use of omega-3 fatty acids in liver diseases demonstrating ER stress. This study was supported by a grant (#214S₂₂₃) from The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK).



Bioactive Lipids in The Progression and Prevention of Colorectal Cancer

*Sreeparna Banerjee, PhD

* Department of Biological Sciences, Middle East Technical University,
banerjee@metu.edu.tr

Twenty Carbon polyunsaturated fatty acids (PUFA) such as arachidonic acid (AA) can be enzymatically oxygenated through enzymes such as cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX). The metabolic products comprise a family of bioactive lipids termed as 'eicosanoids'. Eicosanoids have a variety of functions, including homeostatic responses in the cardiovascular system, induction and resolution of inflammation, and modulation of immune responses against diseases associated with chronic inflammation, such as cancer. Chronic inflammation very frequently accompanies the development of colorectal cancer (CRC). It is therefore not surprising that many eicosanoids are implicated in CRC. Very frequently the eicosanoids work in an antagonistic and highly temporal manner in inflammation; therefore,

inhibition of the pro-inflammatory COX-2 or 5-LOX enzymes may subsequently inhibit the formation of their essential products, or shunt substrates from one pathway to another, leading to undesirable side-effects. It is therefore important to understand the function and activities of the different enzymes and their products in order to design drugs that solely target the inflammatory molecules found in both chronic inflammation and cancer. In this talk, I will discuss the cancer promoting and anti-cancer roles of different eicosanoids in CRC. Additionally, I will delineate the roles that eicosanoids with opposing functions play in neoplastic transformation in CRC through their effects on proliferation, apoptosis, motility, metastasis, and angiogenesis.



LDL kolesterol ne kadar dŐrlmeli ?

*Miyase Bayraktar

* IHacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Dahiliye Anabilim dalı,
Endokrinoloji nitesi, Ankara

Koroner kalp hastalığı, Dnyada lmlerin ve Kengelliliğinin önemli nedenlerinden biridir. Epidemiyolojikalışmalar, aterosklerozun ortaya çıkışında yüksek kolesterolün önemini göstermişlerdir. Özellikle dşkdansiteli (LDL) kolesterol koroner kalp hastalığı ile sıkıbir birliktelik içindedir. Kalp hastalıklı veya kalp hastalığı, inme için yüksek risk taşıyan hastalarda, hangi yöntemle olursa olsun, LDL kolesterolün dŐrlmesinin yararlıarıık bir şekilde ortaya konmuştur. LDL kolesterolnhayatın erken yıllarından itibaren dŐrlmesinindaha ileri yaşlarda statinle elde edilen sonuçlara grehastalık riskinde 3 katından daha fazla azalma yaptığıson çalışmalarda görülmüştür. nk ateroskleroz

yaşam sürecinde erken yaşlarda başlar, dolayısıyla LDLne kadar erken yaşta dŐrlrse sonuç o kadar iyi olacaktır.

Bununla beraber, önemli bir soru bu yanıtı almak için LDL kolesterolün ne kadar dŐrleceđidir.

Hastalığın

nlenmesinde LDL'yi dŐrmek için uygulanan tedavine kadar yoğun ise sonucun o kadar iyi olduğuna dair veriler artmaktadır. LDL'yi çok fazla dŐrmenin potansiyel riskleri henüz tam saptanamamıştır. şitli hastalık riskleri ile ilişkisi, örneğin nrodejenrativ hastalık, viyamin eksikliği vs.halen tartışmaya açıktır.



How much LDL cholesterol should be lowered ?

*Miyase Bayraktar

* Hacettepe University, Medical Faculty,
Department of Internal
Medicine, Endocrinology, Ankara
bayraktarmiyase@gmail.com

Coronary heart disease is the most common cause of death and disability throughout the world. Epidemiologic studies have shown that elevated levels of cholesterol play a key role in the development of atherosclerotic disease. In particular, low density lipoprotein (LDL) cholesterol has been strongly associated with coronary heart disease (CHD) risk. Lowering LDL cholesterol reduces the incidence of atherosclerotic disease. The benefits of lowering LDL cholesterol have been demonstrated extensively, particularly in individuals with heart disease or at high risk of heart disease or stroke, irrespective of how the reduction is achieved. It has been shown in the studies that lowering LDL

beginning early in life resulted in a three-fold greater reduction in the risk of CHD than treatment with a statin started later in life. Because coronary atherosclerosis begins early in life, lowering LDL at a younger age may produce even greater reductions in the risk of CHD.

However, there is a question over how much LDL cholesterol lowering is low enough and what supporting evidence there is for this. It is becoming increasingly evident that the more intensive the lipid lowering regimen, the greater the potential gain in the prevention of disease.

The potential risk of lowering LDL cholesterol to very low levels has not been confirmed, and its association with certain health risks is still under debate.



Apolipoprotein Mimetik Peptidler-HDL

*Doç. Dr. İbrahim Aslan

*Sağlık Bilimleri Üniversitesi Antalya Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi
Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kliniği, Antalya
iaslan@turk.net

Günümüzde kullanılan antilipidemik ilaçlara rağmen, rezidüel kardiyovasküler hastalık riskinin devam etmesi; plazma atherojenik lipoproteinlerinde azaltılsağlayacak yeni tedavilerin geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. zerinde çalışılan molekül grublarından biri olan 'Apolipoprotein mimetik peptidler', Apolipoprotein A1(ApoA1) ve Apolipoprotein E (ApoE) nin moleküler yapısından faydalanılarak geliştirilmiştir. ApoA1

ve ApoE ; amphipatik helikal yapı içermektedir. Ayrıca Apo E nin reseptör bağlayıcı parçası, ApoB içeren lipoproteinlerin klirensinde önemli rol oynamaktadır. Apolipoprotein mimetik peptidlerin amino asidi içeriğindeki düzenlemeler; lipid afinitesinde, kolesterole flksnde, antiinflamatuar, antioksidan etkilerinde değişime ve atherojenik lipoproteinlerin klirensinde artışa yol açmaktadır.

Yeni geliştirilen ilaçlar tedavi yönetimimizi daha spesifik ve etkin hale getirebilecektir.

Apolipoprotein Mimetic Peptides-HDL

*Doç. Dr. İbrahim Aslan

*Health Science University
Department of Endocrinology and Metabolism
Antalya Training and Research Hospital,
Antalya.

Despite current anti-lipidemic drugs, continuation of residual cardiovascular disease risk has led to the development of novel medications that decrease plasma atherogenic lipoproteins. One of the molecule groups which has garnered attention and extensively studied is 'Apolipoprotein mimetic peptides'. These peptides are designed based on molecular structures of apolipoprotein A1 (ApoA1) and apolipoprotein E (ApoE). ApoA1 and ApoE contain amphipathic helical structures. In addition, receptor binding

domain of Apo E has an important role in the clearance of ApoB containing lipoproteins.

Composition of amino acid sequences in apolipoprotein mimetic peptides influence lipid affinity, cholesterol efflux, anti-inflammatory, antioxidant effects and lead to increased clearance of atherogenic lipoproteins. Development of apolipoprotein mimetic peptides as novel drugs has a potential to be more effective and specific in the medical management of atherosclerosis

Metabolomik veri setlerinin R’da analizi

*İdil Yet ,PhD

* Biyolojik Bilimler ODT
idilyet@gmail.com

Oldukça karmaşık bir yapıya sahip olan biyolojik sistemin incelemesinde sistemler biyolojisi (sisteomik)denilen yeni bir yaklaşım ortaya çıkmıştır. Sisteomikbiyolojik sistemin çeşitli basamaklarındaki yapısalve işleyişe bağlı değişkenler ile biyolojik sistemlerarasındaki ilişkiyi inceler. Sisteomik terimi; genomik,transkriptomik, proteomik ve metabolomik terimlerinintamamını kapsamaktadır. Moleküler fenotipin kimyasal karşılığı olarak tanımlanmakta ve fenotip ile genotip arasındaki bağıngurulmasına metabolom yardımcı olmaktadır. Protein,hücre duvarı, RNA ve DNA gibi yapıların yapısında yer alırveya metabolizmanın düzenlenmesinde metabolomlargrevlidirler. Bu nedenle son yıllarda biyokimya,farmakoloji ve toksikolojik çalışmalarda metabolomik analizlerine sıklıkla başvurulmaktadır. Metabolomik; biyolojik sistemlerde yer alan küçük moleküllerin tanımlanması ve kantitasyonu olarak tanımlanmaktadır.Untargeted metabolomik çalışmalarında, belli birbiyolojik sistemdeki mümkün olan en fazla metabolitin tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Untargeted metabolomik analizleri sıklıkla iki grubun karşılaştırılması için kullanılmaktadır (hasta-sağlıklı, aynı hastalığın farklıdereceleri gibi). Targeted metabolomik çalışmalarında, benzer fizikokimyasal özelliğe sahip veya benzerbiyokimyasal yolağa ait ve önceden belirlenen metabolitlerin tanımlanması ve düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Metabolomların fizikokimyasal yapısındaki farklılık ve biyolojik sistemlerin kompleks yapısı nedeniyle tek bir analitik yöntemle tüm metabolitlerin tespit edilmesi mümkün değildir. Bu nedenle untargeted metabolomik analizinde farklı analitik teknikler kullanılmaktadır. (MS, NMR vb.). Metabolomik analizlerinde; Serum, plazma, idrar, lenfsıvısı, safra, gaita ve tükürük gibi farklı örnek tiplerikullanılabilir.Bu aşamalarda yapılacak teknik bir hata analizlerdehataya ve sonuçların yanlış yorumlanmasına nedenolabilir. Biyoinformatik analizlerle bu teknik hatalarıeşitli analizlerle tespit etmek (heatmap, PCA)mümkündür. Verinin kalite kontrolu ve verinin analizinde R kullanılması önerilmektedir. R istatistiksel hesaplamave grafikleri için bilgisayar programı olup aynı zamanda programlama dilidir. R çok geniş istatistiki (doğrusal ve doğrusal olmayan modelleme, klasik istatistik testleri,zaman serileri analizi, sınıflandırma, kümeleme ve diğer) ve grafik çizim teknikleri sunmaktadır. R kullanarak verimizi normalize edip, karmaşık biyoinformatik analizler yapabiliriz. R yazılım programı, Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında (GWAS), genetikvaryasyonları tanımlamak ve bu amaçla varyasyonlarınilişkili belirteçlerini araştırmada, hasta ve kontrolgruplarının bütün genomlarının analiz edilmesini ierenok boyutlu çalışmalarda hesaplama kolaylığı sağlar.Ayrıca, Metabolit GWAS (MGWAS) ve Metabolom WAS (MWAS) alışmalarında da R yazılım programından faydalanabiliriz.

Metabolomics Data Analyses with R

*İdil Yet, PhD

*[†]Biological Sciences, METU
idilyet@gmail.com

Metabolomics is a rapidly growing area of research, in part due to recent advances in technology that have allowed for a wide coverage of the human genome. Metabolites are small compounds present in cell and body fluids, and are involved in biochemical processes of the cell. It is assessed that the human metabolome, which is defined as the complete set of small molecular weight molecules, covers more than 5,000 different metabolites of various biochemical classes such as sugars, amino acids, lipids or carnitines. Metabolomics analyses are predominantly performed on blood (plasma and serum) and urine samples, as these are easy to obtain. They can also be obtained from saliva, stool, sweat, tissues and intact cells. Changes in the organism are magnified in the metabolome compared to the genome.

Metabolomics is a promising tool in the search for biomarkers, which help to detect environmental exposures, diseases, to improve the disease prognosis, to develop therapeutics or to evaluate drug toxicity. There are two main strategies to measure metabolites, a non-targeted and a targeted approach. Whilst the nontargeted approach aims to measure all metabolites in a sample, the targeted approach focuses specifically on the

quantification of selected metabolites. The most often used high-throughput methods to measure metabolites are mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

To date, genome wide association study (GWAS) have found associations between genotype variation and disease phenotypes, and as extension to this approach, the metabolome wide association study (MWAS) tests for systematic associations of metabolites with phenotypes and diseases. As metabolites are products of genetic as well as proteomic processes, metabolites are very closely linked to genetics in contrast to most of the other phenotypes. The examination of the genetic basis of metabolites can be achieved with metabolome GWAS (mGWAS). To conduct these high-level bioinformatic analyses we need to use scripting languages such as R to improve the reproducibility. R is an open source programming language and software environment for statistical computing and graphics that is supported by the R Foundation for Statistical Computing. R can also be used for the quality control stage of the metabolites (outlier removing, visualisation, normalisation, heatmap, and principal component analyses) prior to the complex statistical analyses.



Bir Biyoaktif Yağ Olan Palmitoleatın Katlanmamış Protein Yanıtı ve Enflamasyonu Baskılayarak Aterosklerozun Gelişimini Önlemesi

Begüm Kocatürk^{1,2}, İsmail Çimen^{1,2}, Seda Koyuncu¹, Özlem Tufanlı^{1,2}, Umut I. Onat^{1,2}, Asli D. Yıldırım^{1,2}, Onur Apaydın^{1,2}, Şeyma Demirsoy¹, Zaliha G. Aykut¹, Uyen T. Nguyen³, Steven M. Watkins³, Gökhan S. Hota- mışlıgil⁴, Ebru Erbay^{1,2}

1 Moleküler Biyoloji ve Genetik Departmanı, Bilkent Üniversitesi, Ankara 06800, Türkiye. 2 Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Enstitüsü, Bilkent Üniversitesi, Ankara 06800, Türkiye. 3 Metabolon, Sacramento, CA 95691, Amerika. 4 Genetik ve Kompleks Hastalıklar Departmanı ve Sabri Ülker Merkezi, Harvard T.H. Chan Toplum Sağlığı Fakültesi, Boston, MA 02115, Amerika.

Ateroskleroz, damar sertliği, dünya çapında ölüme

sebebiyet veren en büyük sebeplerden biridir. Hastalığın damarlarda ilerleyişinde önemli bir ekten makrofaj olarak bilinen bağışıklık sistemi hücrelerinin damar çeperinde biriken yağ plaklarına yapışmasıdır. Burada biriken yağları yok etmeye çalışan makrofajlar eş zamanlı enflamatuvar sitokin üretiminide artırmak süretiyle damardaki plakların gelişimini artırır.

Ateroskleroz hastalarının dolaşımında doymuş yağ asidi miktarında önemli bir artış gözlemlenmektedir. Daha önceki bilimsel çalışmalar doymuş yağ asitlerinin makrofaj ve endotel gibi aterosklerotik plak oluşumuna etkili olan hücrelerin içinde katlanmamış protein yanıtını olarak bilinen bir stres yanıtını (KPY) aktive ettiğini ve de inflamazom denilen inflamatuvar bir kompleksin bir araya gelmek süretiyle, inflamatuvar sitokinlerin salınımını artırdığını göstermiştir. Yine önceki çalışmalar bu iki stres ve inflamatuvar aktivasyon mekanizmasının da ateroskleroz oluşumunda rol oynayan temel süreçlerden olduğunu ortaya koymuştur. Doymuş yağ asitlerinin aksine doymamış yağ asitlerinin makrofajlarda stres ve inflamatuvar yanıtları baskıladığı gözlemlenmiş olmasına rağmen, örneğin kanda en sık rastlanan bir doymamış yağ asidi olan oleik asidin aterosklerotik hastalığı direk önleyebildiğine dair deneysel kanıt elde edilememiştir. Önceki çalışmalarda normalde kan dolaşımında seyrek miktarda bulunan bir

doymamış yağ çeşidi olan palmitoleatın (PAO) obezite gibi durumlarda adipoz dokuda de novo yağ sentezi ile yapımının arttığı ve salgılandıktan sonra karaciğer gibi uzak dokularda glukoz metabolizmasını regüle ederek bir nevi lipid hormon (lipokin) olarak çalışabildiğini gösterilmiştir. Bu çalışmamızda organizmanın hiperlipidemi gibi bir metabolik stres altında oral yolla PAO ile beslenmesinin bir inflamatuvar hastalık olan ateroskleroz üzerinde etkin olabileceği hipotezini kurduk. Kantitatif lipidomik yöntemle incelediğimizde PAO'nun makrofaj içindeki organel membranlarına girerek yeniden düzenlediğini

ve özellikle endoplazmik retikulumun membranlarından menşei alan KPY'nın ve mitokondri içinde gelişen reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu baskıladığını gördük. Bu iki stres yanıtının aktivasyonunda rol oynadığı NLRP3 inflamazom ve IL-1 β salınımının da makrofajlarda baskılandığını gözlemledik. Oral yolla farelere verilen PAO aterosklerotik plaklarda da KPY'nı azaltarak plağın gelişimini zaman içinde baskılamaktadır. Bu bulguların tümü, vücudumuzda de novo yağ asidi sentezinin bir ürünü olan PAO'nun doymuş yağ asitleri ve kolesterolün organel membranında neden olduğu hasarı engellemek süretiyle makrofajların bu organellerden menşei alan stres ve inflamatuvar yolları aktive etmesine önlediğini göstermektedir. Hücre ve fare hastalık modellerinden

Nutritional Modification of Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammasome Activity by a Bioactive Lipokine Prevents Atherosclerosis

Begüm Kocatürk^{1,2}, İsmail Çimen^{1,2}, Seda Koyuncu¹,
Özlem Tufanlı^{1,2}, Umut I. Onat^{1,2}, Asli D. Yıldırım^{1,2},
Onur Apaydın^{1,2}, Şeyma Demirsoy¹, Zaliha G. Aykut¹,
Uyen T. Nguyen³, Steven M. Watkins³, Gökhan S. Hota-
mıışlıgil⁴, Ebru Erbay^{1,2}

¹ Molecular Biology and Genetics Department, Bilkent University, Ankara 06800, Türkiye. ² National Nanotechnology Center, Bilkent University, Ankara 06800, Türkiye. ³ Metabolon, Sacramento, CA 95691, USA. ⁴ Department of Genetics and Complex Diseases, Sabri Ülker Center, Harvard T.H. Chan School of Public Health, Boston, MA 02115, USA

Atherosclerosis is the leading cause of death in the civilized world. The disease progresses as macrophages engulf lipids and accumulate in the vessel wall. The newly formed foam cells release pro-inflammatory cytokines which is crucial in disease pathogenesis. It was previously shown that the level of saturated fatty acids (SFAs) is elevated in the plasma of patients with atherosclerosis. Interestingly, SFAs do not only trigger Endoplasmic Reticulum (ER) stress but also activate inflammasome, of which both have pro-atherogenic role. Based on the aforementioned findings, we hypothesize that in contrast to SFAs, unsaturated fatty acids, in particular Palmitoleate (PAO), has a remedial effect on plaque formation. Our studies show that systemic PAO treatment evokes an overall lipidomic remodeling in

mice that is associated with resistance to lipid-induced ER stress, production of mitochondrial reactive oxygen species and inflammasome activation in macrophages. In addition, PAO uptake decreases pro-inflammatory IL-1 β levels in serum and atherosclerotic plaque, reduces ER stress in plaque resident macrophages and plaque size in a mice model of atherosclerosis. These findings demonstrate that external supplementation of a product of de novo lipogenesis such as PAO can promote metabolic resilience of organelles and limit the progression of atherosclerosis. Overall, these findings indicate that PAO supplementation could be a desirable therapeutic approach for metabolic and inflammatory diseases.



Primary Cilia Membranında Lokalize Olan TGF- β Reseptör I/II'nin Seramid Tarafından Reglasyonu ve Tmr Metastazının Baskılanması

Salih Gencer^{1,2}, Besim retmen²

¹skdar niversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Blm,
34662 skdar, İstanbul, Türkiye
²Medical University of South Carolina, Department of
Biochemistry and Molecular Biology, 29401 SC, USA

Amaç: Yapılan son çalışmalar, farklı karbon uzunluğundaki seramid türlerinin, karaciğer hemo-stasisi, insülin direnci, apoptoz ve kanser patolojisi gibi çeşitli biyolojik proseslerde farklı fizyolojik roller üstlendiklerini göstermiştir. Fakat, T β RI/II sinyal yolağı ile kontrol edilen tümör metastazında, sistemik seramid ve tümör hücresindeki seramid'e ilişkin sinyal mekanizmasının rolü daha önce açıklanmamıştır.

Gereç-Yöntem: Bu alışmada, A549, UMSCC-22A, MEFs ve 4T1 hücre hatları kullanıldı. CerS₄^{-/-} fare daha önce belirtildiği şekilde tarafımızdan elde edildi. Hücrelerin in vitro metastaz özellikleri boyden chamber yöntemi kullanılarak yapıldı. CerS₄ ve diğer proteinlerin miktarı IHC ve western blot yöntemleriyle tespit edildi.

Bulgular: Bu alışma ile, Seramid Sentaz 4 (CerS₄) tarafından sentezlenen seramidin Smad7 ile TGF-beta reseptör-I arasındaki etkileşimi stabilize ettiğini ve bu kompleksin, TGF-beta reseptör I ve II'nin primary cilia membranına hareketini (lokalizasyonunu) bloke ettiği görüldü. CerS₄'n moleküler ya da genetik (CerS₄ knockout sistemde) düzeyde değişimi

Smad7-TGF-beta reseptör I kompleksinin stabilitesini etkileyerek (Arl₆ transporter ve T β RI arasında ki etkileşimi arttırarak) yeni keşfettiğimiz "cilia targeting signal (31-ATALQ-35)" aracılığı ile TGF-beta reseptrftinin primary cilia'da lokalize olmasının mümkün olduğu görüldü. Bu aktivasyon ile primary ciliadalokalize olan TGF-beta reseptör ifti Smo zerinden

Shh sinyal yolağını aktive ederek, tümör hücresinin metastazını arttırdığı görülmüştür. 4T1 hücrelerinde, Smad7'nin ekspresyonunu arttırmak ya da intraflagella transport protein 88 (IFT88) zerinden primary cilia oluşumunu shRNA ile baskılanması, TGF-beta reseptör I-Smo etkileşimini azaltarak 4T1 tümör hücrelerinin karaciğer metastazını bloke ettiği görülmüştür.

Sonuç: Bütün bu bulgular, CerS₄/Seraamid-Smad7 kompleksinin, TGF-beta sinyal yolağı üzerinden tümör metastazını kontrol ederek terapötik amaçlı potansiyel bir hedef olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Metastaz, TGF-beta sinyal yolağı, Seramid, Primary Cilia



TGF- β Receptor I/II Trafficking and Signaling at Primary Cilia is Inhibited by Ceramide to Attenuate Cell Migration and Tumor Metastasis

Salih Gencer^{1,2}, Besim Öğretmen²

¹Üsküdar Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 34662 Üsküdar, İstanbul, Türkiye

²Medical University of South Carolina, Department of Biochemistry and Molecular Biology, 29401 SC, USA

Mechanisms that regulate TGF-beta receptor type I/II (T β RI/II) trafficking to primary cilia membrane for mediating signal transduction remain unknown. Here, we show that ceramide synthase 4 (CerS₄) generated ceramide, bioactive sphingolipid, stabilized Smad7- T β RI association, which then inhibited the trafficking of T β RI/II to primary cilia membrane. A mutant T β RI, which is resistant to Smad7 interaction, restored receptor signaling to increase migration in response to CerS₄/ceramide induction. Genetic or molecular alterations of CerS₄ abundance prevented Smad7-T β RI inhibitory complex, and increased association between Arl₆ transporter and T β RI via novel cilia targeting signal (31-ATALQ-35). Mutation of the cilia targeting signal abolished the trafficking of the receptor to the cilia membrane in response to CerS₄ knockdown in various cell types. Localization of

T β RI/II to primary cilia activated smoothened (Smo), a key part of the sonic hedgehog (Shh) signaling, inducing migration/invasion. This process induced liver metastasis both in wild type and CerS₄^{-/-} knock-out mice in response to endogenous CerS₄/ceramide knockdown in 4T1 mammary cancer cells, injected in the mammary pads. WT-Smad7 transfections, or primary cilia inhibition by shRNA-mediated knockdown of intraflagella transport protein 88 (IFT88) prevented T β RI- Smo crosstalk and attenuated liver metastasis of 4T1-shCerS₄ cells. Overall, these data define a novel mechanism for the regulation of T β RI/II targeting selectively at the primary cilia membrane by CerS₄/ceramide-Smad7 inhibitory complex to control Shh/Smo-mediated cell migration and invasion without affecting canonical TGF- β signaling.

Keywords: Metastasis, TGF-beta receptors,



Pediatric Primer Siliyer Diskinezi Hastalarının Plazma Seramid, Sfingomyelin ve YKL-40 Dzeyleri

Elife Dilara Bal Topu¹, Göken Tuğcu², Filiz Özcın³,
Mutay Aslan³, Sanem Eřref², Mina Hızal², Ebru Yalın²,
Deniz Ersöz², Uğur Özelik², İncilay Lay¹, Yeşim Öztař¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, ocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Göğüs Hastalıkları Bilim Dalı, Ankara

³ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Antalya

Amaç: Primer siliyer diskinezi (PSD) silya yapı ve/veya fonksiyonunda kalıtsal bozukluk sonucunda mukosilyer klirensin bozulması ile kronik solunum sistemi enfeksiyonlarının görüldüğü bir hastalıktır. Klinik tablosu, klor kanalı (KFTR) bozukluğu sonucunda mukus bileşiminin değişmesi ile karakterize olan kistik fibrozis (KF) hastalığıyla çok benzemekle birlikte, PSD'deki akciğer hastalığı daha iyi seyirlidir. Bu alışmada KF ve PSD hastalarında akut akciğer enfeksiyonu ve tedavi sonrası dönemde, sfingomyelin (SM) ve seramid (SER) düzeylerindeki olası farklılıkların araştırılması ve sağlıklı bireylerle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Hastalardaki inflamasyon düzeyinin değerlendirilmesi için YKL-40 düzeyleri ölçülmüştür.

Gereç ve Yöntem: KF (n=17) ve PSD (n=7) tanılı ocuk hastalardan, akut akciğer enfeksiyonu ve tedavi sonrası taburculuk döneminde alınan kan örneklerinden elde edilen plazmalarda; SM16, SM18, SM24, SER16, SER18, SER20, SER22 ve SER24 düzeyleri LC-MS/MS ile ölçülmüştür. Sonuçlar PSD- KF hastaları arasında ve benzer yaş aralığındaki sağlıklı çocuklarla (n=9) kıyaslanmıştır. PSD ve KF hastalarındaki

inflamasyonu değerlendirmek amacıyla, plazma YKL-40 düzeyleri ticari ELİSA kiti kullanılarak florometrik yöntemle ölçülmüştür.

Bulgular: PSD hastalarının alevlenme ve taburculuk dönemi plazmalarında ölçülen tüm SM ve SER düzeyleri, KF hastalarının alevlenme ve taburculuk dönemine göre yüksektir ($p<0,001/p<0,05$). Sağlıklı ocuklarla kıyaslandığında ise PSD hastalarında alevlenme döneminde 18 SM, 16 SER, 18 SER, 20 SER ve taburculuk döneminde 24 SER düzeyleri yüksektir ($p<0,05$). YKL- 40 düzeyleri, PSD ile KF hastaları arasında anlamlı farklı değilken, her iki hastalıkta da sağlıklı kontrole göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Sonuç: Çalışmamızda klinik tabloları benzeyen PSD ve KF hastalarında plazma SER ve SM metabolitlerinde anlamlı fark görülmüştür. Her iki hastalıkta da akut alevlenme döneminde enfeksiyon bulguları ve inflamasyon artışı olmasına rağmen SER ve SM düzeylerinde gözlenen arklılıklar; inflamasyondan bağımsız olarak, KF'de KFTR mutasyonunun, PSD' de ise silia patolojisinin bir sonucu olabilir.



Plasma Ceramide, Sphingomyelin And YKL-40 Levels In Pediatric Primary Ciliary Dyskinesia Patients

Elife Dilara Bal Topçu¹, Gökçen Tuğcu², Filiz Özcan³,
Mutay Aslan³, Sanem Eşref², Mina Hızal², Ebru Yalçın²,
Deniz Ersöz², Uğur Özçelik², İncilay Lay¹, Yeşim Öztaş¹

¹Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of
Medical Biochemistry, Ankara

²Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of
Pediatric Chest Diseases, Ankara

³Akdeniz University, Faculty of Medicine, Department of
Medical Biochemistry, Antalya

Purpose: Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a disease in which mucociliary clearance is impaired as a result of hereditary disorder of the cilia structure and / or function, and chronic respiratory infections occur. Although the clinical course is very similar to cystic fibrosis (CF) disease, which is characterized by alteration of the mucus composition as a result of chlorine-rich (CFTR) impairment, pulmonary disease has a better prognosis in the PCD. In this study, it was aimed to investigate possible differences in sphingomyelin (SM) and ceramide (CER) levels in acute pulmonary infection and post-treatment period in CF and PCD patients and to compare with healthy individuals. YKL-40 levels were measured to assess the level of inflammation in the patients.

Materials and Methods

Blood samples were obtained from pediatric patients with CF (N = 17) and PSD (N = 7) during acute pulmonary infection and at discharge after treatment. SM16, SM18, SM24, CER16, CER18, CER20, CER22 and CER24 levels were measured in plasma

by LC-MS / MS. The results were compared between PCD-CF patients and healthy children of similar age range (N = 9). Plasma YKL-40 levels were measured by fluorometric method using commercial ELISA kit.

Findings:

All SM and CER levels measured at exacerbation and discharge were higher in PCD than those of CF ($p < 0.001$ / $p < 0.05$). Compared with controls SM18, CER16, CER18, CER20 and CER24 levels were higher in exacerbation in PCD ($p < 0.05$). YKL-40 levels were similar between two disease groups at acute exacerbations, however they were significantly higher than healthy controls ($p < 0.05$).

Conclusion: We found significant difference in plasma CER and SM metabolites in PCD and CF patients who had similar clinical presentations. Although findings of infection and increased inflammation were present in acute exacerbations in both diseases, the observed differences in plasma CER and SM may be a result of cilia pathology in PCD and



Metoksi Araşıdonil Florofosfonat (MAFP) Uygulamasının PC-3 Prostat Kanseri Hcreleri Lipid Trleri zerine Etkisinin Lipidomiks Analizi

Serap şahin-Blkbaşıa, b, Brian S Cummings,b

aCumhuriyet niversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas, TÜRKİYE

bDepartment of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, University of Georgia, Athens, GA, USA
wserap@yahoo.com

Lipidler biyolojik membranların esas bileşenleridirler.

Biyolojik sistemlerde; membran çift tabakalı yapıyı oluşturma, enerji depolama, sinyal iletimi, membran proteinlerinin fonksiyonları ve etkileşimleri için ortam sağlamak gibi farklı ve önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptirler. Fosfolipidler, hücre büyümesi ve metastaz sırasında hücre sinyallemesinde de önemli bir rol oynamaktadır. Fosfolipaz A2 (PLA2), gliserofosfolipidlerde sn-2 ester bağını hidrolizleyerek bir yağ asidi ve bir lizofosfolipid oluşturan esterazdır. PLA2 inhibitörleri hem araşıdonik asit hem de lizofosfatidik asit (LPA) oluşumunu azaltmaları nedeniyle, önemli anti kanser teraptikleridir.

Metoksi araşıdonil florofosfonat (MAFP), en çok çalışılan PLA2 inhibitörüdür.

Lipid metabolizmasının düzeltilmesi ve regülasyonu, insan sağlığında önemli bir etkiye sahiptir. Dolayısıyla, lipidlerin büyük ölçeklerde toplu olarak karakterize edilmeleri veya

“lipidomiks”, sağlık araştırmalarında yüksek öneme sahiptir. Metabolomiksin bir dalı olan Lipidomiks, normal ve patolojik durumlarda, biyolojik sistemlerdeki lipidlerin

belirlenmesi ve miktarının ölçülmesiyle ilgilenen bir bilim dalı olup, lipidomiksteki gelişme ilk olarak Han ve Gross tarafından öne çıkarılmıştır. Lipidomik yöntemle yapılan çalışmaların sonuçları, kanser progresyonunun yanı sıra diğer insan hastalıkları ile lipid

oranlarındaki değişiklikler arasında sıkı bir korelasyon olduğunu göstermektedir.

Prostat kanseri erkeklerde, akciğer kanserinden sonra en sık teşhisi konulan ve tüm dünyada en yaygın beşinci sıradaki kanser türüdür. PC-3 hücreleri, en sık kullanılan prostat kanseri modellerinden biridir ve kemik türevi metastazlardan türemiştir. Bu alışmada; PLA2 inhibitörü olan MAFP uygulamasının, PC-3 prostat kanser hücreleri lipid türlerine etkisinin lipidomiks yaklaşımla belirlenmesini

amaçlanmıştır. PC-3 hücreleri, 6 saat süreyle MAFP (10 μ M) ile muamele edildikten sonra, Bligh-Dyer yöntemine göre lipid ekstraksiyonu yapıldı ve inorganik fosfat testi kullanılarak lipid miktarları belirlendi. Elektrosprey iyonizasyon-kötü spektrometresi (ESI-MS) analizi yapıldı. MetaboAnalyst 2.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) ve Lipid Maps ([http://www.](http://www.metaboanalyst.ca/)

<http://www.metaboanalyst.ca/>) biyoinformatik veri tabanları kullanılarak veriler işlendi ve lipid türleri tanımlandı. Sonuç olarak; bir PLA2 inhibitörü olan MAFP uygulamasının, yağ asitleri, gliserolipidler, sfingolipidler ve gliserofosfolipidleri içeren çeşitli lipid türlerinde değişikliklere neden olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: Lipidomiks, Metoksi araşıdonil florofosfonat, ESI-MS, Lipid Maps, PC-3

* Bu alışma Türkiye Cumhuriyeti Yüksek ğretim Kurumu Tarafından desteklenen post-doktora projesinin bir kısmını oluşurmaktadır.

Lipidomics Analysis of the Effect of Methoxy Arachidonyl Fluorophosphonate (MAFP) Application on PC-3 Prostate Cancer Cell Lipid Species

Serap Şahin-Bölükbaşı, b, Brian S Cummings, b

aCumhuriyet University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Sivas, TURKEY bDepartment of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, University of Georgia, Athens, GA, USA
wsrap@yahoo.com

Lipids are the main component of biological membranes. They have diverse and important biological function, such as membrane structure, energy storage, signal transduction, protein function and protein interaction. Phospholipids also play an important role in cell signaling during cell growth and metastasis. Phospholipase A2 (PLA2) are esterases that hydrolyze the sn-2 ester linkage in glycerophospholipids to form a fatty acid and a lysophospholipid. PLA2 inhibitors are possible anticancer therapeutics because they reduce both arachidonic acid and lysophosphatidic acid (LPA) formation. Methoxy arachidonyl fluorophosphonate (MAFP) is one of the mostly prominently studied PLA2 inhibitors. Lipid remodeling and regulation of lipid metabolism has important implication in human health. Therefore, mass characterization of lipids on a large scale or "lipidomics" has a high potential to affect health research. The development of lipidomics, a branch of the metabolomics, was first highlighted by Han and Gross, deals with the determination and quantification of lipids in biological systems in normal and pathological conditions. Studies using lipidomics show that the progression of cancer, as well as other human diseases, strongly correlates to changes in lipid ratios.

Prostate cancer is the fifth most common type of cancer in the world and the most commonly diagnosed after lung cancer in man. PC-3 cells are one of the most commonly used prostate cancer models and are derived from bone-derived metastases. In this study we used a lipidomics approach to determine the effect of the PLA2 inhibitor MAFP application on the PC-3 cell lipidome. PC-3 cells were treated with MAFP (10 µM) for 6 hours, after which lipids were extracted using a Bligh-Dyer protocol and quantified using an inorganic phosphate assay. Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) analysis was performed and the data were analyzed and identified of lipid species using MetaboAnalyst 2.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) and the Lipid Maps (<http://www.lipidmaps.org/>) bioinformatics databases. As a result; MAFP application, which is a PLA2 inhibitor, was shown to alter several lipid species, including fatty acids, glycerolipids, sphingolipids, and glycerophospholipids.

Keywords: Lipidomics, Methoxy arachidonyl fluorophosphonate, ESI-MS, Lipid Maps, PC-3 *This work constitutes part of the post-doctoral project supported



KURŐUN MARUZİYETİ OKSİSTEROL DZEYLERİNİ NASIL DEĐİŐTİRİR?

Aslı Karacan Diner*, Afshin Samadi+, İncilay Lay+,
Tuğe etin*, Türkan Nadir ziŐ*, Yeşim ztaŐ+, Suna
Sabuncuoğlu*

*Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi,
Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye
+Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Hacettepe
niversitesi, Ankara, Türkiye

KurŐun (Pb) esas olarak geri dnŐm olmayan, doğada bulunan ve yaygın kullanımına sahip toksik bir maddedir. İnsanlarda kurŐun zehirlenmesi, kurŐun içeren benzin ve boya katkılarının yasaklanmasından bu yana azalmıŐ olsa da, bazı otomobil akülerinin ve diğer ticari ürünlerin üretimi ve geri dnŐm alanında Pb maruz kalma riski taŐıyan bazı popülasyonlar için önemli bir problem oluŐturmaya devam etmektedir. Organik veya inorganik kurŐun maruziyeti akut veya kronik zehirlenmeye neden olabilmektedir. Yüksek düzeyde Pb maruziyeti bazı kanserlerde mortalite artıŐı, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık ve amiyotropik lateral skleroz ile iliŐkilendirilmiŐtir. KurŐunun oksidatif strese yol açarak antioksidan savunmanın enzimatik ve enzimatik olmayan farklı bileŐenlerini etkilediği birçok epidemiyolojik ve hayvan çalıŐmasında gösterilmiştir. Oksisteroller pekçok farklı biyolojik etkinliğe sahip, okside 27-karbon kolesterol türevleri veya kolesterol biyosentezinin yan ürünleridir. Birçok oksisterol sitotoksik ve pro-apoptotik etkinliğe sahiptir. Çalışmamızda, kurŐuna maruz kalan iŐçilerde Őelasyon tedavisinin uygulanmasından önce ve sonra kolesterol oksidasyon düzeyini değerlendirmek için 7-ketokolesterol (7-KC) ve Kolestan-3β,5α,6β-

triol (Triol) düzeyleri llmŐtr. Őelasyon tedavisi uygulanmasından önce ve sonra kurŐuna maruz kalan iŐçilerden (yaŐ aralığı 25 ila 52, n=42) ve sağlıklı kontrol grubundan (yaŐ aralığı 22 ila 45, n=30) heparinli kan örnekleri toplanmıŐtır. KurŐuna maruz kalan iŐçilerde tedavinin uygulanmasından nceki 7-KC düzeyi kontrol grubunun ve Őelasyon tedavisinden sonra llen 7-KC düzeyine göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuŐtur (sırasıyla; 37,35±2,53 ng/mL, 20,26±1,38 ng/mL, 22,91±4,49 ng/mL, p < 0,0001). Benzer Őekilde, kurŐuna maruz kalan iŐçilerde tedavinin uygulanmasından önceki ortalama triol düzeyi kontrol grubunun ve Őelasyon tedavisinden sonra ölçülen ortalama triol düzeyine göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuŐtur (sırasıyla; 41,81±2,53 ng/ml, 13,83±1,75 ng/ml, 17,64±3,42 ng/ml, p < 0,0001). İlginç bir Őekilde, grupların 7-KC ve triol düzeyleri arasında çok güçlü bir korelasyon görülmüŐtür (r=0,943). ÇalıŐmamızın bulguları, kurŐun maruziyetinin kolesterol otoksidasyonunu indükleyebileceğini doğrulamaktadır. Bununla birlikte, Őelasyon tedavisi uygulanması, oksisterol düzeylerini kontrol grubunun düzeylerine kadar azaltmıŐtır. Oksisteroln kurŐun toksisite mekanizmasındaki rolünü anlamak için daha fazla çalıŐma yapılması gerekmektedir.



HOW DOES LEAD EXPOSURE CHANGE OXYSTEROL LEVELS?

Aslı Karacan Dinçer*, Afshin Samadi+, Incilay Lay+,
Tuğçe Çetin*, Türkan Nadir Öziş*, Yeşim Öztaş+, Suna
Sabuncuoğlu*

*Department of Pharmaceutical Toxicology, Faculty of
Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey.

+Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine,
Hacettepe University, Ankara, Turkey.

Lead (Pb) is basically a non-biodegradable, toxic material that is found naturally and has widespread human uses. Though lead intoxication in humans has diminished since the prohibition of lead addition to gasoline and paint, it is still a problem for certain populations at risk of exposure related to the manufacturing and disposal of some car batteries and other commercial products. Human exposure to organic or inorganic lead can result in acute or chronic poisoning. High lead exposures have been associated with increased mortality from certain cancers, hypertension, cardiovascular disease, and amyotrophic lateral sclerosis. The ability of lead to cause oxidative stress and to influence various enzymatic and nonenzymatic components of antioxidant defense has been shown in many epidemiological and animal studies. Oxysterols are oxidized 27-carbon cholesterol derivatives or by-products of cholesterol biosynthesis, with a spectrum of biologic activities. Several oxysterols have cytotoxic and pro-apoptotic activities. In our study, the 7-ketocholesterol (7-KC) and Cholestane-3 β ,5 α ,6 β - triol (Triol) levels were measured to evaluate cholesterol

oxidation before and after receiving chelation therapy in lead exposed workers. Heparinized blood samples were collected from lead exposed workers (aged 25 to 52, n=42) before and after receiving chelation therapy and healthy controls (aged 22 to 45, n=30). 7-KC levels were significantly higher in lead exposed workers before chelation therapy compared to both the control group and after chelation therapy (37,35 \pm 2,53 ng/mL, 20,26 \pm 1,38 ng/mL, 22,91 \pm 4,49 ng/mL respectively, p < 0,0001). Mean triol levels were also significantly higher in the patient group compared to both the control group and after chelation therapy (41,81 \pm 2,53 ng/mL, 13,83 \pm 1,75 ng/mL, 17,64 \pm 3,42 ng/mL respectively, p < 0,0001). Interestingly, there was a very strong correlation between 7-KC and triol levels (r=0,943). Our results confirmed that lead exposure can induce cholesterol autoxidation. In addition to this, chelation therapy reduced the oxysterol levels similar to control group levels. Further studies are needed to understand the role of oxysterol in mechanism of lead exposure.

Key words: lead, chelation, oxysterol



SİLİKOZİS'DE KOLESTEROL OKSİDASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Neslihan Aksu*, Afshin Samadi+, İncilay Lay+,
Tuğe etin*, Türkan Nadir ziş*, Suna Sabuncuoğlu*

* Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik
Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
+Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim
Dalı, Ankara, Türkiye

Silikozis, silika (SiO_2) adı verilen kimyasalın uzun süre solunması sonucu gelişen nefes darlığı, yorgunluk gibi belirtilerle akciğerlerde ortaya çıkan ve kalıcı ve ilerleyebilen hasara yol açan kronik inflamatuvar bir meslek hastalığıdır. Silikozis hastalarında enflamatuvar solunum rahatsızlıkları ve romatoid artrit, sistemik skleroz ve vaskülit gibi silikozise bağlı komplikasyonlar oluşur. Silika kristaline maruziyetin akciğer fibrozis riskini de arttırdığı düşünülmektedir. Türkiye'de her yıl önemli sayıda yeni vaka teşhis edilmektedir. Silikozisi de içine alan pekçok akciğer hastalığında oksidatif stresin rolü olduğu belirlenmiştir. Oksisteroller, kolesterolün oksidasyonu sonucu oluşan moleküllerdir. Oksisteroller, enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla olmak üzere iki farklı yoldan meydana gelmektedir. Dolaşımda ve dokularda enzimatik yolla oluşan oksisteroller daha fazla bulunmaktadır ve bu türevler vücutta önemli biyolojik faaliyetlerin regülasyonunda görev alırlar. Enzimatik olmayan (oto-oksidasyon) yolla oluşan oksisterol türevleri ise patolojik olayların oluşumu arasında ilişki olduğu çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur. Bu nedenle, kolesterol oksidasyonu sonucunda oluşan bu moleküllerin hastalıkların teşhisi

ve izlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada, silikoziste kolesterol oto-oksidasyonunu değerlendirmek amacıyla 47 silikozis hasta grubu ve 30 sağlıklı kontrolde heparinize kan örnekleri toplanmış ve plazmaları ayrılmıştır. Plazma örneklerinde 7-ketokolesterol (7-KC) ve kolestan-3 β , 5 α , 6 β -triol (Triol) düzeyleri HPLC-MS/MS cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Hasta ve kontrol gruplarında llen 7-KC düzeylerinin sırasıyla 40,61 \pm 2,07 ng/ml ve 20,26 \pm 1,38 ng/ml olduğu belirlenmiştir. Triol düzeyleri ise hasta grubunda 16,15 \pm 2,22 ng/ml, kontrol grubunda ise 13,83 \pm 1,75 ng/ml olarak ölçülmüştür. Ölçülen her iki parametrenin de hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve orta düzeyde korelasyon gösterdikleri saptanmıştır ($p < 0,001$; $r = 0,494$). Sonuçlar, silikoziste oksidatif strese bağlı oluşan inflamasyonun bir sonucu olarak kolesterol oto-oksidasyonunun oluşabileceğini doğrulamaktadır. Silikozis mekanizmasında oksisterollerin rolünü aydınlatmak amacıyla daha ileri çalışmaların yapılması gereklidir.

Anahtar kelimeler: Oksisterol, silikozis, kolesterol oksidasyonu



EVALUATION OF CHOLESTEROL OXIDATION IN SILICOSIS

Neslihan Aksu*, Afshin Samadi+, Incilay Lay+, Tuğçe Çetin*, Turkan Nadir Ozis*, Suna Sabuncuoglu*

* Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology, Ankara, Turkey
+Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Ankara, Turkey

Silicosis is a chronic inflammatory occupational disease that occurs in the lungs and causes permanent and progressive damage, such as shortness of breath, fatigue after a long term respiration of the chemical named silica (SiO_2). Silicosis patients have inflammatory respiratory disorders and silicosis-related complications such as rheumatoid arthritis, systemic sclerosis and vasculitis. Silica crystalline exposure is also thought to increase the risk of lung fibrosis. There is a significant number of newly diagnosed cases every year in Turkey. It has been determined that oxidative stress plays a role in many lung diseases including silicosis. Oxysterols are molecules that result in the oxidation of cholesterol. Oxysterols can occur by two different pathways, including enzymatic and non-enzymatic. Oxysterols are formed more enzymatically in circulatory system and tissues. These derivatives act in the regulation of important biological activities in the body. Oxysterol derivatives, which are formed by non-enzymatic (auto-oxidation) pathways, have been shown to be related to pathological events. For this reason, it is thought that these molecules,

which are formed as a result of the oxidation of cholesterol, can be used as biomarkers in the diagnosis and monitoring of diseases. In this study, heparinized blood samples were collected from 47 silicosis patient groups and 30 healthy controls to evaluate auto-oxidation of cholesterol in silicosis and the plasmas were separated. 7-ketocholesterol (7-KC) and cholestane- 3β , 5α , 6β -triol (Triol) levels were measured using HPLC-MS/MS in plasma samples. The mean levels of 7-KC in the patient and control groups were $40,61 \pm 2,07$ ng/ml and $20,26 \pm 1,38$ ng/ml, respectively. Triol levels were measured as $16,15 \pm 2,22$ ng/ml in the patient group and $13,83 \pm 1,75$ ng/ml in the control group. Both parameters measured were significantly higher in the patient group than the control group and were found to be moderately correlated ($p < 0,001$; $r = 0,494$). The results confirm that cholesterol auto-oxidation can occur in silicosis as a result of oxidative stress induced inflammation. Further studies are necessary to understand the role of oxysterols in the mechanism of silicosis.

Key words: Oxysterol, silicosis, cholesterol oxidation



ÇEVRESEL KİMYASAL MADDELERE MARUZİYET SONRASI LİPİT PEROKSİDASYONU VE PROTEİNOKSİDASYONU ARASINDAKİ İLİŐKİ VE SELENYUM BİLEŐİKLERİYLE OLASI KORUMA

Pınar Erkekoglu¹, Belma Kocer-Gumusel¹

1Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, F. Toksikoloji Anabilim Dalı, 06100 Ankara, Türkiye
E-posta: belmagumusel@yahoo.com; erkekp@yahoo.com

Biyolojik sistemler sürekli endojen ve eksojenoksidanlara maruz kalırlar. Birçok alışma oksidanların serbest radikal hasarına ve lipit peroksidasyonuna neden olabileceğini göstermiştir. Membran fosfolipitlerisadece çoklu doymamış yağ asit içerikleri nedeniyle değil, ayrıca prooksidatif serbest radikal trlerinioluşturma yetenekleri olduğu için hücre membranıylaenzimatik ve enzimatik olmayan etkileşimlerindenolayı oksidasyona hassastırlar. Lipit peroksidasyonun yaygın sonucu vardır: membranlara yapısal hasar,sekonder ürünlerin oluşumu ve protein oksidasyonu.Ancak, protein oksidasyonu bağımsız olarak oluşabilirveya lipit peroksidasyon gözlenirse de ortaya çıkmayabilir.Proteinler biyolojik sistemlerde yüksek orandabuldukları ve yüksek reaksiyon hız sabitelerine sahip oldukları için radikaller ve iki elektron içeren oksidanlarınana hedeflerdir. Selenyum birçok biyolojik işlevi olanesansiyel bir eser elementtir. Glutasyon peroksidaz ve

tiyoredoksin redüktaz gibi selenoenzimler yüksek antioksidan özelliğe sahiptir. Yaptığımız in vivo ve in vitro çalışmalarda, farklı selenyum türlerinin (inorganik veya organik) farklı oksidan çevresel kimyasal maddelere karşı koruyucu olduğunu gözlemledik. Ayrıca, lipit peroksidasyonunun oluşturduğu protein oksidasyonunun sodyum selenit ve selenometiyonin gibi belirli selenyum bileşikleriyle suplementasyon ile nlenebildiğini veya azaltılabildiğini belirledik. Sonuçlarımız selenyumun birçok çevresel kimyasalın neden olduğu oksidatif stres, lipit peroksidasyonu vebunu takip eden protein oksidasyonuna karşı koruyucu olduğunu gösterdi. Bunların yanında selenyumunfarklı hastalık durumlarında ortaya çıkan oksidatifstres ve lipit peroksidasyonunu da azaltabildiği de belirlenmiştir. Selenyumun lipit peroksidasyon ve protein oksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin altında yatan mekanizma(lar)ın belirlenmesi için daha fazla sayıda mekanistik çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



INTERACTION BETWEEN LIPIDPEROXIDATION AND PROTEIN OXIDATION AFTER EXPOSURE TO ENVIRONMENTAL CHEMICALS AND POSSIBLE PROTECTION BY SELENOCOMPOUNDS

Pınar Erkekoglu¹, Belma Kocer-Gumusel¹

* Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology, Ankara, Turkey
+Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Ankara, Turkey

Biological systems are continually exposed to endogenous and exogenous oxidants. Many studies have shown that these oxidants lead to free radical damage and lipid peroxidation. Membrane phospholipids are particularly susceptible to oxidation not only because of their highly polyunsaturated fatty acid content but also because of their association in the cell membrane with non-enzymatic and enzymatic systems capable of generating prooxidative-free radical species. There are three broad outcomes to lipid peroxidation: structural damage to membranes, generation of secondary products and protein oxidation. However, protein oxidation can arise independently or protein oxidation may not be present even though lipid peroxidation is observed. Proteins are major targets for radicals and two-electron oxidants in biological systems due to their abundance and high rate constants for reaction. Selenium is an essential trace element with many biological functions. Selenoenzymes like

glutathione peroxidase and thioredoxin reductase have high antioxidant properties. Throughout our in vivo and in vitro studies, we have observed that different forms of selenium (inorganic or organic) can be protective against the lipid peroxidation caused by different oxidant environmental chemicals. Moreover, protein oxidation caused by lipid peroxidation can be prevented or decreased with supplementation with certain selenocompounds, like sodium selenite and selenomethionine. Our results showed that selenium can be protective against the oxidative stress, lipid peroxidation and consequent protein oxidation caused by a wide variety of environmental chemicals. In addition, selenium can decrease oxidative stress and lipid peroxidation caused by different disease states. More mechanistic studies are needed to show the underlying mechanism_(s) for the protective effects of selenium against lipid peroxidation and protein oxidation.



İleri Yaş Hipertansif Olgularda Trombosit Sayısında Artış

Hanife USTA ATMACAb, Levent DENİZa, Hale ARALa,
şehide BAZa, Feray AKBAşAb, Murat USTAc,

aSağlık Bakanlığı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul Eğitim ve
Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Bölümü, İstanbul.

bSağlık Bakanlığı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul Eğitim
ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları Kliniği, İstanbul.

cGiresun niversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim
Dalı, Giresun.

Amaç: Çalışmamızda hipertansiyon tanısı ile takip edilmekte olan 65 yaş üzeri hipertansif olgularda, kardiyovasklerrisk faktörlerinden alanin transaminaz (ALT), gama-glutamil tranferaz (GGT), C-reaktif protein (CRP) ve kan sayımı parametrelerini araştırmayı amaçladık.

Yöntemler: Hipertansiyon tanısını almış halen anti-hipertansif tedavi alan ve ilaç alımı ile hastalık kontrol altında olan, diyabetes mellitus dahil ek hastalık ve ilaç öyküsü olmayan 65 yaş üstü olgular (yaş: $71,6 \pm 9,1$ yıl ve N: 47) hasta grubunu oluştururken (kan basıncı değerleri $>140/90$ mmHg); 65 yaş üstü sağlıklı bireyler (yaş: $72,7 \pm 7,2$ yıl ve N = 47) kontrol grubunu oluşturdu. Sigara ve kronik alkol kullananlar çalışma dışı tutuldu. Tüm olgularda rutin biyokimya AU 2700 analizöründe (Beckman Coulter Inc.), kan sayımı parametreleri Sysmex XE 5000 (Sysmex Medical International) ile çalışıldı.

Sonuçlar: Gruplar arasında yaş, cinsiyet, ALT, GGT, CRP, beyaz küre sayısı ve nötrofil/lenfosit oranı (NLR), platelet dağılım genişliği (PDW), ortalama platelet hacmi (MPV) ve plateletcrit (PCT) parametrelerinin ortalama veya ortanca değerleri için gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık saptanmadı. Kontrol grubuna kıyasla, hipertansif hasta grubunda ortalama platelet sayısı anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla, $216,9 \pm 57,4 \times 10^9/L$ ve $247,2 \pm 64,7 \times 10^9/L$; $p=0,03$); ancak, yine de hasta grubunda platelet sayısı

ortalama değerleri $450 \times 10^9/L$ zerine çıkmamıştı.

Tartışma: Diyabetik olguları dışladığımız çalışmada, karaciğer yağlanması gösteren enzimler ve inflamasyon belirteçleri açısından anlamlı fark bulunmayan hasta ve kontrol grupları elde edilmiş olup, ileri yaş hastalarda artmış trombosit sayısı hipertansiyon varlığıyla ilişkili bulunmuştur. Bu sonuç, bilindiği üzere artan platelet sayısının oluşturduğu hiperkoagülabilitenin kardiyovasküler morbidite ve mortaliteye katkısının yanında, hipertansiyon oluşumuna katkısı açısından tartışılabilir. Trombositozla birlikte artan platelet hücre membran metabolizması ve ihtiyaç bağlı artan serbest yağ asitlerinin platelet fonksiyonda kullanılmayan kısmı, büyük olasılıkla oksidatif hasara bağlı inflamatuvar süreçlerde rol alabilir. Serbest yağ asitlerinin nütrisyonel kalitesi ve birbirleri arasındaki etkileşimin tromboz gelişimi ve vasküler inflamasyondaki rolüne işaret edilmektedir. Yakın zamanda, fosfolipid metabolizmasında bozukluğun hipertansiyon ve patofizyolojisindeki rolü açıklığa kavuşmaya başlamıştır; bu konuda platelet sayısı/ indekslerindeki değişimin de birlikte değerlendirildiği lipidomik çalışmalara acilen ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: Platelet, Geriatri, Hipertansiyon, inflamasyon, Yağ asitleri, Fosfolipidler

Pediatric Orak Hücre Hastalarında Sfingozin 1-fosfat Düzeyi

Ahmet Yalınkaya¹, Burcu Eser², Selma nal³, Yeşim ztař¹

1. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD
2. Gülhane Eğitim Araştırma Hastanesi LC-MS/MS Araştırma Laboratuvarı
3. Mersin Üniversitesi Hastanesi Pediatric Hematoloji AD

Giriş: Orak hücre hastalığı (OHH) dünyada en sık görülen otozomal resesif kalıtmımlı hastalıklardan biridir. Hastalığın temelinde hemoglobinin beta zincirinin 6. Pozisyonunda Glu->Val değişimi yatmaktadır. Hemoglobindeki bu değişim sonucunda hemoglobin S oluşur (HbS). Hemoglobinin fonksiyonunda bozulma olmasa da hemoglobinin birbirine yapışması sonucu polimerler oluşur ve bu yapılar eritrositin fonksiyonu için hayati öneme sahip olan şeklinin bozulmasına ve kolayca parçalanmasına neden olur. Hastalığın kliniğinde kronik aneminin yanısıra kronik inflamasyon, vazooklzyonlar ve hayati tehdit edici ataklar görülür. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda orak hücre farelerde sfingozin 1-fosfat (S1P) düzeylerinin anlamlı olarak yükseldiği gösterilmiştir. Amacımız pediatric hasta grubunda S1P düzeylerini ölçmektir.

Materyal-Metod: Çalışmamızda orak hücre hastası çocuklardan (N=66) ve sağlıklı kontrollerden (N=45) kan alınarak plazma elde edildi. S1P lm Yujin Zhang ve arkadaşlarının LC-MS/MS metodu temel alınarak yapıldı.

REFERANSLAR

- [1] 1. Zhang, Y., et al., Elevated sphingosine-1-phosphate promotes sickling and sickle cell disease progression. J Clin Invest, 2014. 124(6): p. 2750-61.
- [2] 2. Sun, K., et al., Sphingosine-1-phosphate promotes erythrocyte glycolysis and oxygen release for adaptation to high-altitude hypoxia. Nat Commun, 2016. 7: p. 12086.
- [3] 3. Horky, J., J. Vacha, and V. Znojil, Comparison of life span of erythrocytes in some inbred strains of mouse using ¹⁴C-labelled glycine. Physiol Bohemoslov, 1978. 27(3): p. 209-17.
- [4] 4. Dholakia, U., et al., Determination of RBC Survival in C57BL/6 and C57BL/6-Tg(UBC-GFP) Mice. Comp Med, 2015. 65(3): p. 196-201.

Sphingosine 1-phosphate Levels in Pediatric Sickle Cell Disease Patients

Ahmet Yalçınkaya¹, Burcu Eser², Selma Ünal³, Yeşim Öztaş¹

1. Hacettepe University Faculty of Medicine Department of Medical Biochemistry

2. Gülhane Training and Research Hospital LC-MS/MS Research Laboratory

3. Mersin University Hospital Department of Pediatric Hematology

Introduction: Sickle Cell Disease (SCD) is one of the most common autosomal recessive diseases worldwide. The disease is based on a single Glu->Val mutation on the 6th position of the hemoglobin beta subunit gene. This change results in the hemoglobin known as hemoglobin S (HbS). Although HbS is not dysfunctional, the change causes hemoglobins to stick to each other, forming polymers which disrupt the characteristic shape of erythrocytes and lead to them being easily ruptured. The clinic of the disease includes: chronic anemia and inflammation, vaso-occlusions and life-threatening crises. The level of sphingosine 1-phosphate (S1P) was found to be elevated in SCD mice and was shown to effect disease severity. Our aim was to determine the level of S1P in pediatric SCD patients.

Material-Methods: Plasma was obtained from 66 SCD patients and 45 controls. S1P quantification was done with LC-MS/MS, based on the method reported by Yujin Zhang et al.

Findings: Mean S1P values were 145.78 ± 9.92 ng/ml in the patient group and 257.38 ± 21.32 ng/ml in the control group. Mean S1P value was significantly lower in patients compared to controls ($p < 0.001$).

Discussion: In a large-scale study, S1P levels were found to be elevated in SCD mice [1]. However, we found S1P levels to be lower in pediatric SCD patients compared to controls. To explain our results, we focused on the possible differences between SCD-model mice and human SCD. We found that, while the life-span of the erythrocyte in human SCD is reduced from 110- 120 days to 10-20 days; in mice models the reduction is from 20-55 days to 8-10 days [1-3]. Thus, in human SCD erythrocytes live 80-90% shorter lives, while in mice SCD erythrocyte life-span is shortened 50-75%. When we consider that 75% of S1P is synthesized in mature erythrocytes [4], this difference in erythrocyte life-span may explain our results.

REFERENCES

- [1] 1. Zhang, Y., et al., Elevated sphingosine-1-phosphate promotes sickling and sickle cell disease progression. *J Clin Invest*, 2014. 124(6): p. 2750-61.
- [2] 2. Sun, K., et al., Sphingosine-1-phosphate promotes erythrocyte glycolysis and oxygen release for adaptation to high-altitude hypoxia. *Nat Commun*, 2016. 7: p. 12086.
- [3] 3. Horky, J., J. Vacha, and V. Znojil, Comparison of life span of erythrocytes in some inbred strains of mouse using ¹⁴C-labelled glycine. *Physiol Bohemoslov*, 1978. 27(3): p. 209-17.
- [4] 4. Dholakia, U., et al., Determination of RBC Survival in C57BL/6 and C57BL/6-Tg(UBC-GFP) Mice. *Comp Med*, 2015. 65(3): p. 196-201.