



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOTEL HÜCRELERDE OKSİTOSİNİN VE SEKS
HORMONLARININ (ÖSTROJEN, PROGESTERON) C TİP
NATRIÜRETİK PEPTİT SENTEZİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

ÖMER KAÇAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA (TIP FAKÜLTESİ) ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr. A. Serpil BİLSEL

İSTANBUL-2009

Bu tez çalışmasının deneyleri TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde yapılmıştır.

I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım da danışmanlığımı yapan, her konuda destek ve bilgisini benden esirgemeyen değerli hocam Prof.Dr. Serpil Bilsel'e; yüksek lisans eğitimine başlamam için bana destek olan ve tez çalışmalarımın her aşamasında bilgisini paylaşan sayın hocam Doç. Dr. Kemal Baysal'a şükranlarımı arz ederim.

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, değerli hocalarım; Prof.Dr. Kaya Emerk'e, Prof.Dr. Goncagül Haklar'a, Prof.Dr. Nesrin Kartal Özer'e, Prof.Dr. Önder Şirikçi'ye, Prof.Dr. Yavuz Taga'ya, Prof.Dr. Süha Yalçın'a ve;

Çalışmalarım sırasında zaman zaman destek aldığım başta Hümeysra Turan'a ve Anabilim Dalımızın öğrencilerine teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının deneylerinin yapıldığı TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nden çalışma arkadaşlarım Zelal Adıgüzel ve Müge Serhatlı'ya yardımları için teşekkür ederim.

Zeynep Kamil Çocuk Sağlığı ve Doğum Hastanesi Kadın Doğum Klinik Şefi Dr. Sadiye Eren ve Kadın Doğum Uzmanı Dr. Oya Demirci'ye teşekkür ederim.

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, yanımda olduklarını bildiğim aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı (SAG-C-YLP-011107-0210) no'lu proje tarafından desteklenmiştir.

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR

II. İÇİNDEKİLER

III. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

IV. ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTESİ

1. ÖZET

2. SUMMARY

3. GİRİŞ VE AMAÇ

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Endotel Hücreler

4.2. C-Tip Natriüretik Peptitler

4.2.1. Natriüretik Peptit Ailesi ve Reseptörleri

4.2.2. C-Tip Natriüretik Peptitlerin Vasküler Etkileri

4.3. Oksitosin

4.3.1. Oksitosin ve Oksitosin Reseptörleri

4.3.2. Oksitosinin Damar Sistemi Üzerine Etkileri

4.4. Östrojen

4.4.1. Östrojenler ve Östrojen Reseptörleri

4.4.2. Östrojenin Damar Sistemi Üzerine Etkileri

4.4.3. Östrojenin Vazoaktif Maddelerin Düzenlenmesi Üzerine Etkileri

4.5. Progesteron

4.5.1. Progesteron ve Reseptörleri

4.5.2. Progesteronun Damar Sistemi Üzerine Etkileri

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemelerin Temizlik İşlemleri

5.2. Sığır Beyninden Ekstrakte Edilen Büyüme Faktörlerinin Elde Edilişi

5.2.1. Çözeltiler

5.2.2. Sığır Beynindeki Büyüme Faktörlerinin Eldesi

5.3. İnsan Göbek Kordonu Endotel Hücrelerinin (HUVEC) İzolasyonu

5.3.1. Çözeltiler

5.3.2. HUVEC'lerin İzolasyonu İşlemleri

5.4. Hücre Kültür Kaplarının Jelatin ile Kaplanması ve HUVEC'lerin Beslenmesi ve Bölünmesi

5.4.1. Çözeltiler

5.4.2. Hücre Kültür Kaplarının Fibronektin ile Kaplanması

5.4.3. HUVEC'lerin Beslenmesi

5.4.4. HUVEC'lerin Bölünmesi

5.4.5. Endotel Hücre Kültürü

5.5. Hemotositometre ile Hücre Sayma

5.6. HUVEC'lerin Populasyonlarının İki Katına Çıkması Deneyi

5.7. İmmünohistokimya Yöntemi ile HUVEC'lerin Karakterizasyonu

5.7.1. Çözeltiler

5.7.2. Hücrelerin Ekilmesi

5.7.3. Hücrelerin Fiksasyonu

5.7.4. İmmünohistokimya Deneyinin Yapılması

5.8. Oksitosin, Östrojen Ve Progesteronun HUVEC'lerinde C Tip Natriüretik Peptit Ekspresyonu Üzerine Etkisi

5.8.1. Protein İzolasyonu

5.8.1.1.Çözeltiler

5.8.1.2. Protein İzolasyonu İşlemleri

5.8.2. Proteinlerin BCA Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

5.8.2.1.Çözeltiler

5.8.2.2. BSA Standartlarının Hazırlanması

- 5.8.2.3.BCA Ölçümünün Yapılması
- 5.8.3. Western Blot Yöntemi İle Proteinlerin PVDF Membrana Aktarılması
 - 5.8.3.1.Trisin SDS-Poliakrilamit Jelin Hazırlanması Ve Yürütülmesi
 - 5.8.3.1.1. Çözeltiler
 - 5.8.3.1.2. Trisin SDS-Poliakrilamit Jelin Dökülmesi
 - 5.8.3.1.3. Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi
 - 5.8.3.2.Western Transfer
 - 5.8.3.2.1. Çözeltiler
 - 5.8.3.2.2. Yarı Kuru Transfer
 - 5.8.3.2.3. Bloklama
 - 5.8.3.2.4. Birincil Antikor
 - 5.8.3.2.5. İkincil Antikor
 - 5.8.3.2.6. C Tip Natriüretik Peptit / Aktin Proteinlerinin Belirlenmesi
 - 5.8.3.2.6.1.Çözeltiler
 - 5.8.3.2.6.2.Karanlık Oda İşlemleri
- 5.8.4. Oksitosin, Östrojen Ve Progesteronun HUVEC'lerde C Tip Natriüretik Peptit Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde İncelenmesi
 - 5.8.4.1.Çözeltiler
 - 5.8.4.2.RNA İzolasyonunun Yapılması
 - 5.8.4.3.RNA Miktarının Nanodrop Cihazı ile Ölçülmesi
 - 5.8.4.4.RNA Kalitesinin Bioanalyzer 2100 Cihazı ile Kontrol Edilmesi
 - 5.8.4.5.cDNA Sentezinin Yapılması
 - 5.8.4.6.Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PCR) Analizinin Yapılması
- 5.8.5. ELISA Yöntemiyle Oksitosin, Östrojen Ve Progesteronun HUVEC'lerde C Tip Natriüretik Peptitin Besiyerine Sekresyonunun Ölçülmesi
 - 5.8.5.1.Çözeltiler
 - 5.8.5.2.ELISA ile C Tip Natriüretik Peptit Miktarının Ölçülmesi

6. BULGULAR

- 6.1.1. HUVEC'lerin Büyüme Eğrisinin Elde Edilmesi ve Hücre Popülasyonunun İki Katına Çıkma Süresinin Hesaplanması
- 6.1.2. HUVEC'lerin İmmünohistokimya Yöntemi ile Karakterizasyonu
- 6.1.3. Anti-CNP Antikoru ile Western Blot Analizi
- 6.1.4. Real Time PCR ile C Tip Natriüretik Peptit Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde Analizi
- 6.1.5. ELISA ile HUVEC'lerden Sekrete Olan C Tip Natriüretik Peptit Miktarının Ölçülmesi

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

8. KAYNAKLAR

9. EK-1: KULLANILAN CİHAZLARIN LİSTESİ

10.ÖZGEÇMİŞ

11.ETİK KURUL ONAYI

III. KISALTMALAR

- ANP: Atrial natriüretik peptit
APS: Amonyum persülfat
BCA: Biçinkonik asit
BSA: Sığır serum albumini (bovine serum albumin)
BH₄: Tetrahydrabiopterin
[Ca²⁺]_i: Hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonu
cDNA: Komplementer DNA
cAMP: Siklik adenzin monofosfat
cGMP: Siklik guanozin monofosfat
CNP: C tip natriüretik peptit
DAB: Diaminobenzidin
DCC: Dekstran kaplı karbon
DNA: Deoksi ribonükleik asit
EDHF: Endotel kaynaklı hiperpolarize faktör
EDTA: Etilendiamintetraasetik asit
eNOS: Endotel nitrik oksit sentaz
FAD: Flavin adenin dinükleotid
FMN: Flavin mononükleotid
FBS: Fetal sığır serumu
GPCR: G Protein ile eşleşen protein
HCl: Hidroklorik asit
HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein
HUVEC: Göbek kordonu venöz endotel hücreleri
iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LDL: Düşük dansiteli lipoprotein
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
nNOS: Nöral nitrik oksit sentaz
NO: Nitrik oksit
NOA: Nitrik oksit analizörü
NOS: Nitrik oksit sentaz

NPR-A: Natriüretik Peptit Reseptör–A
NPR-B: Natriüretik Peptit Reseptör–B
NPR-C: Natriüretik Peptit Reseptör–C
OTR: Oksitosin reseptörü
PBS: Fosfat tuz tamponu
PMSF: Fenilmetansülfonilflorid
RNA: Ribonükleik asit
SDS: Sodyum dodesil sulfat
SDS-PAGE: Sodyum dodesil sulfat poliakrilamid jel elektroforezi
sGC: Çözünür guanilat siklaz
pGC: Partikül guanilat siklaz
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamine

IV. ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTESİ

Őekiller

Şekil 1: Endotelyumdan salınan moleküller

Şekil 2. İnsan C tip natriüretik peptitinin furin ile kesilmesi

Şekil 3: cGMP aracılı düz kas gevşemesi

Şekil 4: NPs'lerin reseptörleri aracılığıyla cGMP oluşturması ve NO arttırması

Şekil 5: Endotel kaynaklı CNP'nin damar koruyucu rolü

Şekil 6: Östrojenin endotel ve düz kas hücreleri üzerine etkisi

Şekil 7: Progesteronun OTR üzerine etkisi

Şekil 8: ELISA kitinin çalışma prensibi

Şekil 9: HUVEC'lerin Büyüme Eğrisi.

Şekil 10. CNP geninin Gerçek Zamanlı PZR sonuçları

Şekil 11. CNP ELISA kiti standart grafiği

Resimler

Resim 1: İzole edilen HUVEC'lerin 100 mm çaplı kültür kaplarındaki 4. gün

Resim 2: Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı ve kullanılan çip

Resim 3: Bio-Rad IQ5 cihazı

Resim 4: HUVEC'lerin vWF antikoruna ile karakterizasyonu. A. Anti-vWF antikorunun kullanıldığı hücre grubu. B. Anti-vWF antikorunun kullanılmadığı hücre grubu.

Resim 5: Anti-CNP antikoruna ile Western Blot sonucu

Resim 6: Anti-aktin antikoruna ile Western Blot sonucu

Resim 7. Bioanalyzer 2100 ile RNA kalitesinin analizi sonucu

Resim 8. Gerçek zamanlı PZR sonuçları A: CNP sonuçları; B: GAPDH sonuçları

Tablolar

Tablo 1: Farklı boyutlardaki hücre kültür kaplarının kaplanması için gereken fibronektin hacimleri

Tablo 2: Farklı boyutlardaki hücre kültür kaplarına konulması gereken besiyeri miktarları

Tablo 3: Ayırma ve yığılama jeli için kimyasal malzemeler ve kullanılacak miktarları

Tablo 4: Ekilen HUVEC'lerin Değişik Günlerde Elde Edilen Sayıları

Tablo 5: HUVEC'lerin Sayılarının İki katına Çıkma Zamanları (PDT)

Tablo 6: Total RNA konsantrasyonu ve RIN değerleri

1.ÖZET

Amaç: Natriüretik peptitler, atrial natriüretik peptit (ANP), B-tip natriüretik peptit (BNP), ve C-tip natriüretik peptit (CNP) kalp damar sisteminde önemli rolleri olan hormonlardır. CNP başlıca endotelyumdan salınan ve vazodilatör etki göstererek damar sağlığına önemli katkıları olan antiaterosklerotik bir peptittir. ANP ve BNP'nin, CNP ekspresyonunu arttırdığı sığır aort endotel hücrelerinde *in vitro* olarak gösterilmiştir. Oksitosin ANP'nin salgılanmasını arttırarak kalp-damar sisteminde etki gösteren bir hormondur. Östrojen ve progesteron ise oksitosin ve oksitosin reseptörünün ekspresyonunun kontrolünde önemli steroid hormonlardır. Bu çalışmada amaç oksitosin, östrojen ve progesteronun endotel hücrelerinde CNP ekspresyonu üzerindeki etkilerini incelemektir.

Yöntem: İnsan umbilikal ven endotel hücre kültürleri (HUVEC) oksitosin, östrojen ve progesteronun tek başlarına ve değişik kombinasyonlar halinde 100'er nM konsantrasyonda eklenmesiyle 24 saat süreyle ile inkübe edilmiş ve hormonların CNP geninin ekspresyonu üzerindeki etkileri Taqman® probolar kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve CNP protein düzeyinde etkisi ise, Western Blot teknikleri ile araştırılmıştır.

Bulgular: Gerçek zamanlı PZR deneyleri, progesteron ve östrojenin, kontrol grubuna göre CNP ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir. Diğer hormonlarla beraber verildiğinde oksitosinin, CNP ekspresyonu üzerinde azaltıcı etkisi olduğu görülmüştür. Western blot tekniği ile hücre içi CNP düzeyleri belirlenememiştir. Bunun nedeni, CNP'nin hücre lizatında deteksiyon limitinin altında miktarlarda (<50ng) bulunması veya sinyal peptiti olduğu için sentez sonrası derhal sekrete edilmesi olabilir.

Sonuç: Bulgularımız, oksitosin ve steroid hormonların endotel hücrelerinde CNP sentezini etkileyebileceklerini ve bu hormonların damar üzerindeki etkilerinin bazılarının CNP aracılığıyla gerçekleşebileceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: C Tip Natriüretik Peptit, Gerçek Zamanlı PZR, Oksitosin, Östrojen, Progesteron

2.SUMMARY

Investigation of Oxytocin and Sex Hormones (Estrogen and Progesterone) Effects on C Type Natriuretic Peptide Synthesis in Endothelial Cells

Natriuretic peptides, atrial natriuretic peptide (ANP), B-type natriuretic peptide (BNP), and C-type natriuretic peptide (CNP) are hormones which have important roles in the cardiovascular system. C-type natriuretic peptide which is mainly produced in vascular endothelial cells has protective effects on vasculature due to its vasodilative and antiatherosclerotic properties. *In vitro* experiments have shown that CNP expression is stimulated by ANP and BNP in the bovine aortic endothelial cell culture. Oxytocin is a hormone which has effects on cardiovascular system mediated by increasing ANP secretion.

Estrogen and progesterone are steroid hormones which regulate the expression of oxytocin and its receptor. The aim of this study is to investigate the effects of oxytocin, estrogen, progesterone on the expression of CNP in endothelial cells.

Method: Human umbilical vein endothelial cell cultures (HUVEC) were incubated with 100 nM estrogen, progesterone, oxytocin alone or in various combinations for 24 hours and the effect of hormones on CNP expression were evaluated by Real Time PCR using Taqman® probes and Western Blotting techniques.

Results: Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) assays have demonstrated that estrogen, progesterone increase CNP expression in endothelial cells compared to controls. Oxytocin combined with other hormones attenuated their effect. The changes in CNP protein level could not be detected with Western Blotting. This may be due to the presence of CNP in concentration lower than the detection limit (<50 ng) or its secretion right after synthesis.

Conclusion: Our results demonstrate that oxytocin and the steroid hormones estrogen and progesterone can influence CNP synthesis in endothelial cells and can be partly responsible from the effects of these hormones on the vascular system.

Key words: C Type Natriuretic Peptide, Estrogen, Oxytocin, Progesterone, Real Time PCR

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Endotelyum, damar lümeninde lokalize olmuş çok fonksiyonlu tek katlı hücre katmanıdır. Endotelyum, nitrik oksit (NO), prostasiklin (PGI₂), natriüretik peptitler (NP) ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF; endothelium derived hyperpolarizing factor) gibi damar gevşetici ve endotelin-1 (ET-1) gibi damar kasıcı moleküller salgılayarak damar tonüsünde, kan basıncının regülasyonunda ve kalp damar sağlığında çok önemli rol oynamaktadır (Sandow 2007).

Natriüretik peptit ailesinin bir üyesi olan C Tip Natriüretik Peptit (CNP), sinir sisteminde ve özellikle endotelyumda sentezlenmektedir (Ry et al 2007, Wu et al 2003). CNP endotelyumdan salınarak düz kas hücreleri üzerinde gevşeme yapmakta ve trombositler üzerinde de antiadesiv ve antiagrega edici etki göstermektedir (Sandow and Tare 2007, Ahluwalia and Hobbs 2005). Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar CNP'nin önemli bir EDHF olabileceğini göstermektedir (Barber, Gaspari, Kairuz, Dusting and Woods 2005). Bu peptitin etkilerinin, endotel disfonksiyonunu ve enflamasyonu önleyici yönde olması damar sağlığında koruyucu bir etkisi olduğunu göstermektedir.

CNP'nin salınımı sitokinler, shear stres, TNF- α , lipopolisakkaritler varlığında artmaktadır. (Costa-e-Sousa et al 2005, Mukaddam-Daher, Jankowski, Wang, Menaouar and Gutkowska 2002). ANP ve BNP'nin, CNP sekresyonunu arttıran çok önemli uyarıcı olduğu, sığır endotel hücreleri ile yapılan çalışmada gösterilmiştir (Nazario, Hu, Pedram, Prins and Levin 1995). ANP'nin sentezinin, bir hipofiz hormonu olan oksitosin tarafından arttırıldığı bilinmektedir. Dolayısıyla oksitosinin, ANP aracılı olarak CNP ekspresyonunu arttırma olasılığı bulunmaktadır.

Oksitosin, doğum ve laktasyonda görevi olduğu bilinen bir nonapeptittir. Bu hormonun sentezinin ve reseptörlerinin vasküler sistemde de olması, bu hormonun bilinen etkisi olan üreme haricinde de damar üzerine de etkilerinin olduğunu düşündürmektedir (Jankowski et al 2000).

Östrojenler ise, oksitosin sisteminin (oksitosis ve oksitosin reseptörlerinin) en önemli düzenleyenlerinden biridir (Fang, Wong and Mitchell 1996). Östrojenin, damarlarda vazodilatasyona neden olması, düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmesi, yaralanma sonrası endotelyumun tekrar yapılanmasını sağlanması, apoptozu engellemesi, lökosit adezyonunu inhibe etmesi gibi pek çok olumlu etkileri bulunmaktadır. Östrojen, damar sağlığı üzerindeki bu etkilerinden çoğunu nitrik oksit aracılı gerçekleştirir (Kim and Bender 2005).

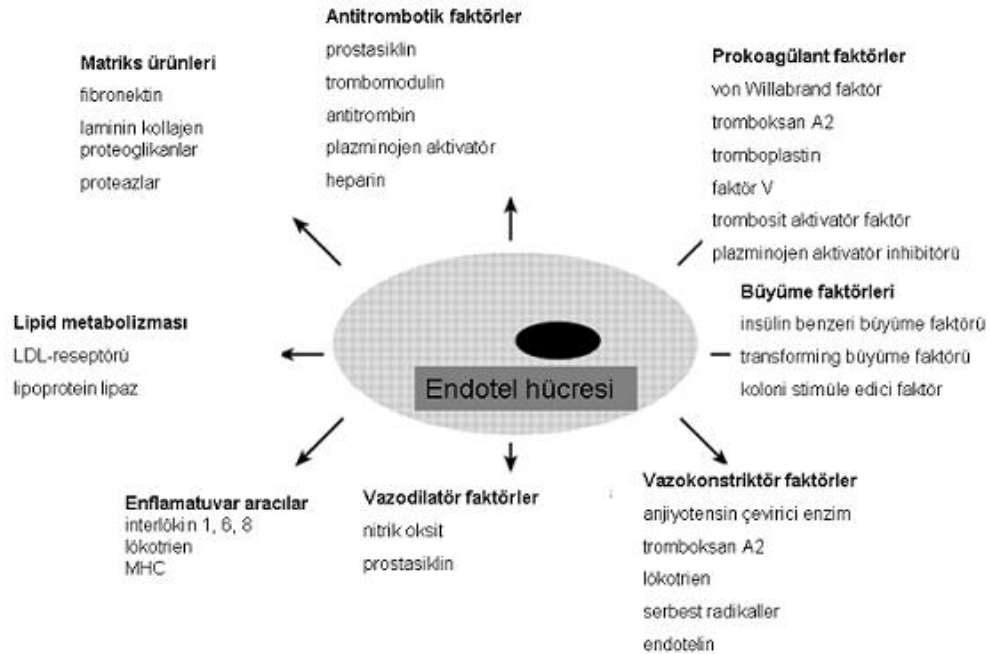
Progesteron, östrojene göre damar etkileri çok daha az bilinen bir hormondur. Progesteronun tek başına vazokonstriksiyon, fakat östrojenle birlikte vazodilatasyon yaptığı bilinmektedir. Progesteronun fizyolojik konsantrasyonları oksitosin reseptörünün sinyalini ve dolayısıyla oksitosin sistemini inhibe etmektedir (Edwards 2005).

Bu tez çalışmasında amacımız, oksitosin, östrojen ve progesteronun, endotel hücrelerinde CNP ekspresyonu üzerinde etkilerinin araştırılmasıdır. Östrojen ve progesteronun ve de oksitosinin damar sistemindeki etkilerinde CNP'nin muhtemel katkılarını belirlemektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1.Endotelyum

Endotelyum tanımı 1856 yılında yapılırken sadece pasif bir bariyer olduğu düşünülmiştir. Endotelyumun son derece aktif bir hücre tabakası, hatta bir organ olduğu, son kırk yılda yapılan yoğun araştırmalarla anlaşılmıştır (Mas 2009, Vanhoutte, Shimokawa, Tang and Feletou 2009). Endotelyum, kan ve lenf damarlarının cidarında tek katlı bir şekilde bulunan hücreler topluluğudur. Endotelyum, salgıladığı pek çok moleküller ile trombozu, fibrinolizi, vasküler tonüsü ve kan akımını düzenlemekte ve çevresindeki diğer hücrelerle haberleşerek sağlıklı bir damarın devamlılığını sağlamaya çalışmaktadır (Sprague and Khalil 2009). Ateroskleroz, hipertansiyon, sepsis ve enflamatuvar hastalıklarda endotelyumdan salgılanan bu moleküllerin salgılanmasında bozukluklara rastlanmaktadır (Valbuena and Walker 2006).



Şekil 1. Endotelyumdan salınan moleküller (Galley and Webster 2004)

Endotelyumun en önemli fonksiyonlarından biri, damar tonüsünü salgıladığı vazoaaktif maddelerle düzenlemektir (Coats, Johnston, MacDonald, McMurray, Hillier 2001). Endotelyum, nitrik oksit (NO), prostasiklin (PGI_2), EDHF gibi vazodilatörler aynı zamanda ET-1, anjiyotensin çevirici enzim (ACE), tromboksan A2, lökotrienler gibi vazokonstriktif moleküller salgılamaktadır (Şekil 1).

Endotel kaynaklı vazoaaktif maddelerden NO bilinen en potent vazodilatördür. Eksikliği damar sağlığının bozulmasına neden olur. NO, endotelden salınarak düz kas hücrelerinde bulunan çözünebilen guanilat siklazı (sGC) aktive eder ve siklik GMP (cGMP) oluşturarak düz kaslarda gevşeme meydana gelir (Alderton et al 2001).

Prostasiklin, enflamatuvar ajanlara cevap olarak, araşidonik asitin siklooksijenaz enzimi ile reaksiyonu sonucunda meydana gelen, damar gevşemesinde rolü olan bir moleküldür (Radomski, Palmer, Moncada 1987).

Vazokonstriktif maddelerin başında gelen ET-1, düz kas hücreleri üzerinde kasıcı etkisiyle, NO ve prostasikline karşı bir rol oynamaktadır (Lavallee, Takamura, Parent, Thorin 2001).

Ancak, kan damarlarının çoğunda NO ve prostasiklin sentezi baskılandığında, damarlarda gevşemenin devam ettiği görülmüştür. Bu gevşemenin, endotel kaynaklı bir madde veya elektriksel bir sinyal tarafından damarlardaki düz kas hücrelerini etkilemesi sonucunda meydana geldiği anlaşılmıştır. Bu madde veya elektriksel sinyal için endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF) kavramı ortaya atılmıştır. EDHF yapısı tam olarak anlaşılmamış olsa da, eikosatrienoik asit, potasyum iyonları, H_2O_2 , CNP ve endokannabinoid en güçlü EDHF adaylarıdır (Mas 2009).

Yapılan pek çok çalışmayla CNP'nin, NO ve PGI_2 'den bağımsız olarak düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon etkisi gerçekleştirerek damarlarda gevşeme yaptığı görülmüştür. Kobaylardan alınan arterlerde yapılan çalışmada endotel kaynaklı CNP

salımı ile düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon meydana geldiği görülmüştür (Fe'le'tou and Vanhoutte 2006).

Endotel hücreleri bir uyaran sonucunda, hücre içi iyonlarındaki değişmelere bağlı olarak bazı maddeler veya elektriksel bir sinyal üreterek düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon meydana getirir. Hiperpolarizasyon etkisi, K⁺ kanallarının blokasyonu ile azaldığından, bu kanalların hiperpolarizasyonda çok önemli görevi olduğu anlaşılmıştır (Luksha, Agewall and Kublickiene 2009).

4.2.C-Tip Natriüretik Peptit

4.2.1. Natriüretik Peptit Ailesi ve Reseptörleri

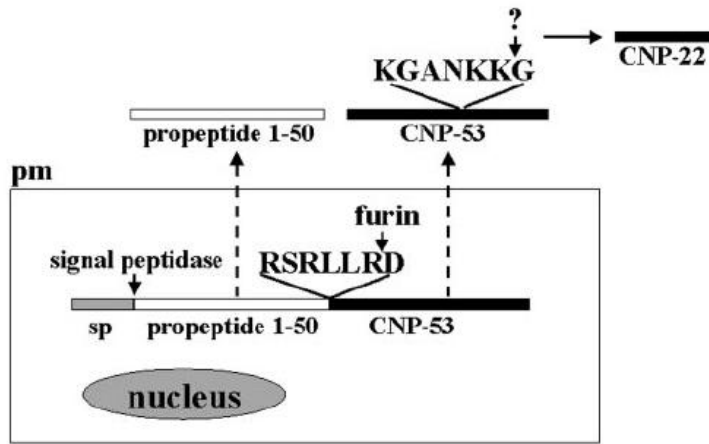
Natriüretik peptit ailesi, atrial natriüretik peptit (ANP), B tip (veya brain) natriüretik peptit (BNP), C tip natriüretik peptit, dendrosis natriüretik peptit (DNP) ve ürodilatin olmak üzere beş üyeden oluşmaktadır. ANP ve BNP'nin bilinen en önemli etkisi natriürez ve diürezdir. Ayrıca bütün natriüretik peptitler, kardiyomiyositlerin ve vasküler sistemdeki düz kasların büyümelerini düzenlerler. Natriüretik peptitlerin, ekstraselüler matriks birikmesini engelleyerek ateroskleroza karşı koruyucu etkiler gösterdiği bilinmektedir. Bu görüşü destekleyen en önemli kanıt, CNP ekspresyonu ve NPR-A, NPR-B, NPR-C reseptör ekspresyonu susturulmuş farelerde ateroskleroz gelişiminin artmasıdır (Peltonen et al 2007).

ANP ve BNP kardiyomiyositlerde sentezlenmektedir. ANP, sol ve sağ atrial basınca ve hacim artmasına cevap olarak atriumdan salınarak natriürez ve diürez etki ile kas gevşemesini sağlar. BNP, sağ ve sol ventriküler basınca ve hacim artmasına cevap olarak salınır, kalp büyümesi ve fibrosisi inhibe etmeye çalışır. ANP ve BNP preprohormon olarak sentezlenip endopeptitazlarla kesilerek aktif şekline dönüşerek sekrete edilen hormonlardır. ANP ve BNP için reseptör, Natriüretik Peptit Reseptör–A (NPR-A)'dır (Nir 2007, Munagala, Burnett and Redfield 2004).

CNP, başta endotel hücrelerde olmak üzere, beyinde, kondrositlerde, uterus ve ovaryumlarda eksprese edilmektedir. Diğer natriüretik peptitlerin natriürez ve diürez

etkileri olmasına karşın CNP'nin natriüretik etkileri bulunmaz ancak damar üzerinde gevşetici bir rolü bulunur. Yapılan pek çok araştırma, CNP'nin en fazla endoteliumdan salındığını ortaya koymuştur (Sandow and Tare 2007).

CNP, 103 aminoasitlik proCNP olarak sentezlenir. ProCNP, 50-51 ve 81-82. aminoasitlerinden kesilerek aktif formları olan sırasıyla CNP-53 ve CNP-22 olarak peptitler meydana gelir. CNP prekürsör halinin, furin ile kesildikten sonra meydana gelen NT-proCNP seviyesi serumda ve hücre kültürü besiyerinde ölçülmektedir. NT-proCNP yarı ömrü biyolojik olarak aktif olan CNP-22 yarı ömründen daha fazladır. NT-proCNP moleküler ağırlığı 8.7 kDA'dur (Pricket, Yandle, Nicholls, Espiner, and Richards 2001). CNP, Golgide furin ile kesilerek hücre dışına sekrete olur (Şekil 2) (Wu, Wu, Pan, Morser and Wu, 2003).



Şekil 2. İnsan C tip natriüretik peptininin furin ile kesilmesi (Wu, Wu, Pan, Morser and Wu, 2003)

4.2.2. C-Tip Natriüretik Peptitlerin Vasküler Etkileri

Kan damarlarının sağlıklı olması, gevşek olmasına bağlıdır. CNP'nin vasküler düz kas hücreleri üzerinden damarlar üzerinde gevşetici etkisinin olduğuna dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır.

CNP'nin, damar gevşemesi üzerine iki şekilde etkisi olduğu düşünülmektedir. Birincisi, kendi reseptörü olan partikül guanilat siklaz (pGC) ile eşleşmiş Natriüretik Peptit Reseptör-B (NPR-B) ile etkileşerek 3',5'-siklik guanozin monofosfat (cGMP) meydana getirir. cGMP ise, Ca^{2+} 'un hücre içerisinden uzaklaştırılmasını sağlayarak

bir gevşeme etkisi yapar. İkincisi ise, CNP bir EDHF olarak düz kas hücrelerinde gevşeme meydana getirir (Pagel-Langenickel, Buttgerit, Bader and Langenickel 2007).

Hiperpolarizasyon, hücrenin uyarılar neticesinde hücre içinde kalsiyum artması ile hücrenin pozitif yüklenmesi ve aşırı pozitif yüklü hale gelen hücrenin, G protein-kapılı içeri doğru destekleyici K^+ (GIRK) kanallarını açarak hücre dışına potasyum atması, kalsiyum seviyesini de düşürmesiyle hücre içinin tekrar negatif hale gelmesidir (Griffith 2004). Domuzlardan arter alınarak organ banyolarında inkübe edilmiş ve CNP verilmiştir. CNP'nin düz kas ve endotel hücreleri membran potansiyelinde hiperpolarizasyon etkisi gösterdiği ve damarlar vazodilatör etki gösterdiği izlenmiştir (Barton et al 1998). İnsan, kemirgen, fare gibi pek çok canlıda, CNP infüzyonu sonucunda vazodilatasyon gözlenmiştir (Honing, Smits, Morrison, Burnett and Rabelink 2001).

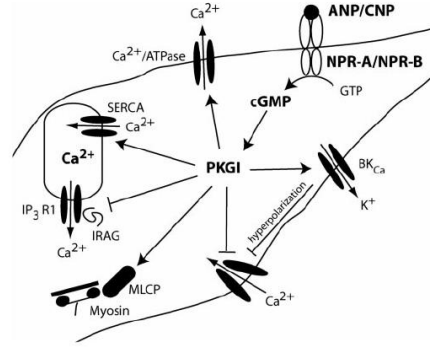
Vasküler düz kas hücreleri üzerinde hiperpolarizasyondan bağımsız olarak CNP'nin, pGC reseptörü ile etkileşerek oluşturduğu cGMP aracılı diğer bir gevşeme mekanizması bulunmaktadır. Bu etki ile NO gibi cGMP oluşturarak düz kaslarda gevşeme meydana getirmektedir. NO ile benzer mekanizmayla etki etmesi, NO biyoyararlanımının düşük olduğu endotelial disfonksiyonunda bir kompensatuvar mekanizma olabileceğini düşündürmektedir (Kone 2001).

CNP'nin düz kas üzerinde gevşetici etkisini, reseptörü NPR-B ile etkileştikten sonra pGC'ı aktivasyonu sonucunda oluşan cGMP meydana getirir. cGMP, "cGMP tarafından aktiflenen protein kinazı" (PKG) aktifler ve aşağıdaki etkiler ile düz kaslarda gevşeme meydana getirir (Şekil 3). Gevşeme etkisi, çeşitli mekanizmalarla hücre içinde artan Ca^{2+} 'ün sitoplazmadan uzaklaştırılması ve potasyumun hücre dışına atılmasıyla, hücrenin tekrar negatif yüklü hale geçmesiyle gerçekleşir.

cGMP:

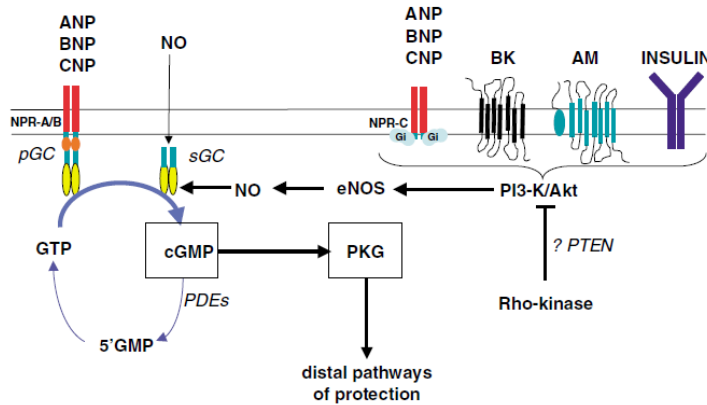
1. PKG, fosfolamban proteinini fosforilleyerek, Ca^{2+} /ATPase pompasını aktive ederek Ca^{2+} 'in hücre dışına atılmasını sağlar.

2. Sarkoplazmik retikulum üzerinde bulunan Ca^{2+} pompasını aktive ederek, Ca^{2+} 'un sarkoplazmik retikulum tarafından alınmasını sağlar.
3. Sarkoplazmik retikulundan Ca^{2+} 'un hücre dışına atılmasını sağlayan IP_3R_1 reseptörünü inaktive eder ve hücre dışına Ca^{2+} 'un atılmasını engeller.
4. Miyozin hafif zincir fosfotazı aktive ederek miyozin ve aktinin birbiri üzerinde kayması engellenir (Potter, Abbey-Hosch and Dickey 2006).



Şekil 3. cGMP aracılı düz kas gevşemesi (Potter et al 2006)

CNP'nin vazodilatör etkisine NO'nin de aracılık ettiği düşünülmektedir. CNP, temizleyici reseptör olarak bilinen NPR-C ile etkileşerek PI3K/Akt yolağını uyararak eNOS enzimini aktifler ve NO salınımını artırır (Şekil 4) (Burley, Ferdinandy and Baxter 2007).

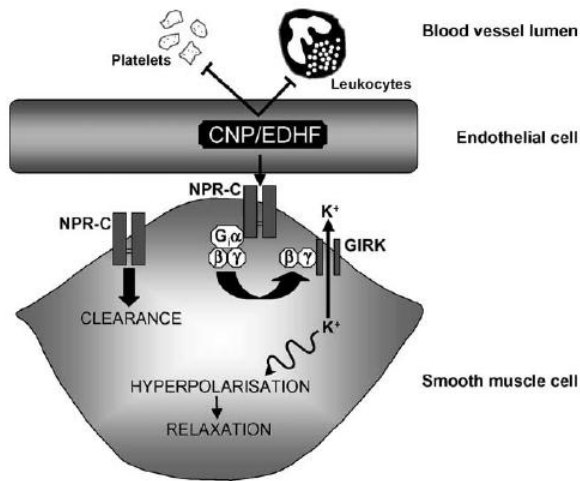


Şekil 4. NPs'lerin reseptörleri aracılığıyla cGMP oluşturması ve NO salınımını artırması (Burley et al 2007)

Ayrıca, plazmada Ang II ve ET-1 miktarları arttığında CNP'nin de artması, CNP'nin bu iki vazokonstriktör üzerinde bir modülatör olabileceğini düşündürmektedir.

Başka bir çalışmada da, CNP infüzyonu yapıldığında ACTH, vazopressin ve aldosteronun kandaki konsantrasyonlarında azalmalar gözlenmiş ve paralel olarak natriürez ve diürez meydana gelerek kan basıncı düşmüştür. CNP, değişik etki yollarıyla damar sağlığı üzerinde olumlu etkiler meydana getirmektedir (Han and Hasin 2003).

Bunlara ilaveten, CNP'nin antienflamatuvar etkileri bulunmaktadır. Endotel hücrelerinden salınan CNP, trombosit agregasyonunu ve lökositlerdeki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu baskıladığı (Şekil 4) ve IL-1, TNF- α ve LPS gibi enflamatuvar ajanlar, CNP ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Scotland, Ahluwalia and Hobbs 2005, Piechota, Banach, Jacon and Rysz 2007). Köpek arterleri kısıkaç ile sıkılarak iskemik bir durum oluşturulmuş ve CNP infüzyonunun doku hasarını önemli şekilde önlediği görülmüştür (Ahluwalia et al, 2005). Bütün bu çalışmalar, CNP'nin anti-aterosklerotik etkisinin olduğuna dair kanıtlardır.



Şekil 4. Endotel kaynaklı CNP'nin damar koruyucu rolü (Scotland et al 2005).

Sığır aort hücreleri ile yapılan çalışmalarda, ANP ve BNP, CNP'nin ekspresyonu 400 kata kadar arttırmaktadır. BNP'nin, ANP'den daha güçlü bir CNP uyarmanı olduğu görülmüştür. (Ry, Passino, Emdin, Giannesi 2006).

4.3.Oksitosin

4.3.1. Oksitosin ve oksitosin reseptörü

Oksitosin, dokuz peptitden oluşan, ana üretim yeri hipotalamus olan bir hormundur. Oksitosin ayrıca, kalp, plasenta, ovaryum, testis, hipofiz bezi, pankreas gibi dokularda da eksprese olmaktadır. Doğumda ve laktasyonda görevli olduğu bilinen bu hormonun, vücuttaki sıvı dengesi üzerinde de önemli etkilerinin olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu hormonun reseptörü, GPCR ailesine bağlıdır ve vücutta endotel hücreleri dahil pek çok yerde bulunmaktadır (Gimpl and Fahrenholz 2001).

Oksitosinin, damarlar üzerinde önemli etkilerinin olduğu, damarlardaki kan hacminin artışına cevap olarak salgılanan oksitosinin, kalpteki reseptörleri aracılığıyla ANP ile BNP salınımını uyarak natriüretik, diüretik etkiler yaptığı bilinmektedir (Burbach, Young and Russel 2006, Gutkowska, Jankowski, Mukaddam-Daher and McCann 2000).

Ekstrasellüler sıvı artışlarının, oksitosin salgılanmasına ve oksitosinin ise kalpten ANP salgılanmasına neden olduğu bilinmektedir. Oksitosinin ana üretim yeri olan nörohipofizin çıkarılması ile yapılan deneylerde, sıvı artışına rağmen ANP salgılanmasının engellenmesi, oksitosinin ANP salgılanmasında rolü olduğunu kanıtlamaktadır (Baek et al 1996).

4.3.2. Oksitosinin Damar Sistemi Üzerine Etkileri

Oksitosin, kalpten ANP salınımını arttırarak natriüretik ve diüretik etki yapmaktadır. Bu etkiler ile kan hacmi azalmakta ve dolayısıyla damar basıncı azalmaktadır. Farelere oksitosin infüzyonunun izole kalplerin oksitosin ile perfüzyonunun ANP miktarını arttırdığı görülmüştür. Oksitosinin, ANP aracılı damar sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Oksitosinin aynı zamanda HUVEC kültürlerinde NO salınımını uyardığı da bilinmektedir (Pournajafi-Nazarloo et al 2007).

Oksitosin, etkisini GPCR ailesine bağı reseptörü etkisi ile gerçekleştirir (Pournajafi-Nazarloo et al 2007). Oksitosin, G_{q11} ve G_{i3} proteinleri ile eşleşmiş olan reseptörüne bağlandıktan sonra fosfolipaz C (PLC) aktive olur ve fosfoinozotidi, IP_3 'e hidroliz eder. IP_3 ise, Ca^{2+} 'un hücre içi depolardan ve hücre dışından alınmasını sağlar. OT aynı zamanda L-tip kanallardan da Ca^{2+} girişini sağlayarak hücre içi serbest Ca düzeylerini artırır ve Ca, CaM'i aktifler. Uterusta ve meme düz kas hücreleri üzerinde, CaM aktive olduğunda, miyozin hafif zincir kinazı fosforilleyerek aktin-miyozin etkileşimini gerçekleştirir ve sonucunda da kas kasılması meydana gelir (Burbach, Young. and Russell 2006). Ayrıca hücre içi artan Ca^{2+} , hücrenin ekzositoz yapmasını sağlayarak kalpten ANP, endotel hücrelerinden NO gibi moleküllerin sekresyonunu sağlar. Oksitosin, ANP ve NO aracılı olarak damarlar üzerinde gevşeme etkisi meydana getirir (Nazarloo et al 2007).

4.4.Östrojen

4.4.1. Östrojenler ve östrojen reseptörleri

Östrojen, başlıca ovaryumda sentezlenen steroid yapılı bir hormondur. Kadınlarda üreme sistemi üzerinde önemli etkilere sahiptir. Erkeklerde de çok az üretilerek sperm olgunlaşmasında görevleri bulunmaktadır (Hess, Bunick, Lee, Bahr, Taylor, Korach and Lubahn 1997). Östrojenin α ve β olmak üzere iki reseptörü (ER) bulunmaktadır (Koledova and Khalil 2007). ER α 'nın üremede, ER β 'nin ise kardiyovasküler sistemde daha etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca hücre membranında bulunan bir üçüncü reseptörü aracılığıyla da eNOS enziminin aktivitesini arttırdığı bilinmektedir (Orshal and Khalil 2004).

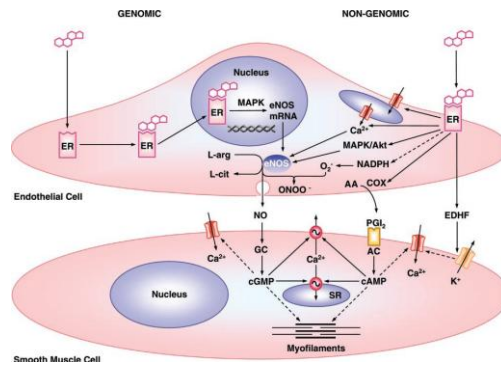
Östrojenin, vasküler tonüs ve lipid metabolizması üzerindeki olumlu etkileriyle, kardiyovasküler sistemde koruyucu etkisi bulunmaktadır (Prossnitz, Arterburn, Smith, Oprea, Sklar, and Hathaway, 2008). Kanda, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) seviyesini düşürdüğü, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyesini yükselttiği pek çok çalışmayla gösterilmiştir (Mattiasson, Rendell, Törnquist, Jeppsson and Hulthén 2002).

Östrojen, dolaşımdaki lipoproteinlerin oksidasyonunu engelleyerek, aterosklerotik lezyonun küçülmesini sağlayarak, homosistein miktarını normal seviyelere indirerek, kollajen birikmesini önleyerek kardiovasküler sistemde olumlu etkilerini gerçekleştirmektedir (Koledova and Khalil 2007).

4.4.2. Östrojenin damar sistemi üzerine etkileri

Östrojen, endotel hücrelerinde NO miktarını arttırarak vazodilatasyon gerçekleştiren bir hormondur (Baker et al 2003). Östrojen endotel hücrelerinde eNOS enziminin ekspresyonunu ve aktivitesini arttırmaktadır. Östrojen, endotel hücrelerinde, endoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınmasını sağlar, MAPK/Akt yolağıyla eNOS aktivitesini arttırır ve nükleer reseptörü ile eNOS ekspresyonu meydana getirir. Oluşan NO, VSMC üzerinde etkisini göstererek vazodilatasyon meydana getirir. Östrojen, endotel hücrelerinde siklooksijenaz enziminin aktivitesini arttırarak prostasiklinleri meydana getirir. Prostrasiklinler, VSMC üzerinde bulunan reseptörleriyle PKC, MAPK inhibisyonu yapar ve VSMC kasılmasını durdurur (Şekil 6) (Koledevo et al 2007).

Östrojen, oksitosin ve reseptörünün ekspresyonunu arttırarak, oksitosin sistemini uyarmaktadır. Östrojen, oksitosin sistemini aktive ederek ANP miktarını arttırmaktadır ve dolayısıyla natriürez ve diürez yaparak, damar sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır (Wang et al 2003, Bold 1999). Ovarioktemize farelerle yapılan çalışmada östradiol verildiğinde, kalp dokusunda CNP'nin, mRNA ve protein düzeyindeki artışları kaydedilmiştir (Acuff, Huang and Steinhelper 1997).



Şekil 6. Östrojenin endotel ve düz kas hücreleri üzerine etkisi (Orshal et al 2004).

Östrojenin enflamasyonda bilinen etkilerini, özellikle sitokinlerin, adezyon moleküllerinin, C- reaktif proteinin, TNF- α ve ET-1 plazma konsantrasyon seviyelerini düşürerek meydana getirir. Ayrıca tromboksan, endotelin-1 gibi damar kasıcı moleküllerin postmenapoz dönemde arttığının görülmesi, östrojenin damar açısından olumsuz olan bu moleküllerin seviyesini düşürdüğü ve prostasiklin seviyesini arttırdığını düşündürmektedir. Bu görüşü, bu moleküllerin seviyelerinin postmenoposal dönemdeki kadınlarla aynı yaşdaki erkeklerin aynı olması da desteklemektedir (Koh 2002).

4.5.Progesteron

4.5.1. Progesteron ve reseptörleri

Progesteron steroid yapılı bir hormondur ve hamilelik boyunca sentezi artmakta olup doğumun başlamasında önce düşmektedir. Progesteronun hücreler üzerinde A ve B olmak üzere iki tane reseptörü vardır ve üreme sisteminde, VSMC'de, endotel hücrelerinde bulunmaktadır (Edwards 2005).

4.5.2. Progesteronun damar sistemi üzerindeki etkileri

Progesteronun damarlar üzerinde etkisi genel olarak gevşetici kabul edilmektedir. Progesteron, damar segmentleri ile yapılan çalışmalarda ilk 5 saniyede $[Ca]_i$ miktarını arttırsa da 15 saniye sonra normal seviyesine getirdiği görülmektedir (Bishop and Stormshak 2007). Damarlar üzerindeki gevşetici etkisini Ca^{2+} 'ın hücre içine alınmasını engelleyerek veya $[Ca]_i$ konsantrasyonunu azaltarak yaptığı düşünülmektedir. Östrojenden daha az damar gevşetici etkisi bulunmaktadır (Koledova et al 2007). Progesteron, VSMC ve endotel hücrelerinin migrasyonunu ve proliferasyonunu engellemektedir (Va'zquez, Manzaneque, Lydon, Edwardsi, O'Malley, and Arispe 1999). Progesteronun, damar sağlığı açısından son derece önemli olan eNOS enziminin de ekspresyonunu arttırdığı ve artan NO'nun da damarlar üzerinde gevşetici bir etki yaptığı bilinmektedir (Koledova et al 2007).

5.GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemelerin Temizlik İşlemleri

Şişeler: Hücre kültüründe vidalı kapaklı, otoklava dayanıklı Pyrex camdan yapılmış şişeler kullanıldı. Şişelerin temizliğinde, hücrelerin büyümeleri üzerine olumsuz etkileri olabileceği nedeniyle deterjan kullanılmadı, distile su ile 3 kez çalkalanarak, gözle de herhangi bir maddenin kalmadığına dikkat edilerek kurumaları sağlandı.

Cam Pipetler: Cam pipetler, kullanılmalarından hemen sonra kurumadan % 10 olarak seyreltilmiş ticari çamaşır suyuna alındı. Arkasından potasyum kromik asit çözeltisinde en az 2 saat bekletilerek kalan partiküllerden temizlendi. Bu pipetler büyükçe bir kaba alınarak 5 defa distile su ile durulandı ve kurumalarından sonra ağız kısımları filtre görevi görmesi için pamuk ile tıkandı. Kapalı metal kaplarda otoklavda sterilize edildi.

Potasyum Bikromat Çözeltisi: 100 g potasyum bikromat ısıya dayanıklı bir balonjojede üzerine yaklaşık 50 ml distile su ile çözüldü, üzerine 950 ml sülfirik asit eklendi ve kullanıldı.

Filtre Sistemi: Plastik malzemelerden oluşan filtre sistemi distile su ile yıkandı ve kurutuldu. Filtre sistemine Millipore marka 0,22 µm porlara sahip PVDF filtre kağıdı (Millipore, Durapore membrane filters, 0,22 µm, #GVWP04700) konuldu ve aliminyum folyo ile sarılarak otoklav ile sterilize edildi ve besiyeri süzmek amacıyla kullanıldı.

Kültür Kapları: Hücre kültürü çalışmalarında (Greiner BioOne, Avusturya) 100 mm çaplı tek kullanımlık plastik hücre büyütme kapları kullanıldı. Bu kaplara 10 ml besiyeri konulduğunda yeterli olmaktadır.

5.2. Sığır Beyninden Ekstrakte Edilen Büyüme Faktörlerinin Elde Edilişi (Maciag, Cerundolo, Ilsley, Kelley and Forand 1979)

5.2.1. Çözeltiler

0.1 M NaCl + 10 mM HEPES Çözeltisi: 0.1 M NaCl ve 10 mM HEPES, ultra saf dH₂O içerisinde çözüldü ve +4°C sıcaklığında pH değeri 7.00'a ayarlandı.

5.2.2. Sığır Beynindeki Büyüme Faktörlerinin Eldesi

- Öncelikle pH Metre +4 °C'de kalibre edildi.
- Mezbahadan alınan bir adet taze sığır beyni soğuk PBS içinde ve buz üzerinde alındı.
- Sığır beyninin üzerinde kan toplanan bölgeler bir makas yardımı ile temizlendi, tartıldı (yaklaşık 100- 200 g gelmektedir).
- Temizlenen beyin bir beher içerisinde HEPES-NaCl (10 mM-100 mM) solüsyonda küçük parçalara ayrıldı. Bu işlem + 4°C'de yapıldı.
- İçerisinde beyin parçaları bulunan HEPES-NaCl tamponu tamamen homojenize oluncaya kadar her defasında 5 defa olmak üzere homojenizatörde (6 ayarında, IKA marka RW 20 model homojenizatör) homojenize edildi.
- Total hacim buz üzerindeki bir beherde toplanır, pH: 7.00'ye 1 N NaOH kullanılarak getirildi. Ölçülen pH:7.2, Hacim 260 ml olarak not edildi ve 300 ml'ye HEPES-NaCl tampon ile tamamlandı.
- Beherde toplanmış olan homojenat + 4°C'deki soğuk odada 2 saat karıştırılarak bekletildi (son hacim 375 ml olarak not edildi).
- Bu sürenin sonunda + 4°C'de GSA rotorunda 40 dk 9200 rpm'de santrifüj edildi.
- Tüplerin dibindeki pellet kaldırılmadan süpernatant bir mezüre alınarak ölçüldü, hacim 172 ml olarak not edildi, pH:7.2.

- Elde edilmiş süpernatant son konsantrasyonu % 0.5 olacak şekilde olacak şekilde streptomisin sülfat eklendi ve lipid materyallerini ekstre edebilmek için 2saat + 4°C’de soğuk odada karıştırılarak inkübe edildi. Çözeltinin pH:7.00 olmalıdır.
- Karışım 40 dk 13 800 g’de (9200 rpm)’de (SS-34 rotor) santrifüj edildi. -2. süpernatant
- Süpernatant tekrar 45 dk 19 000 rpm’de (SS-34 rotor) santrifüj edildi. -3. süpernatant
- Elde edilen süpernatantlar (-80°C’ dondurularak) liyofilize edildi ya da hemen liyofilizasyon yapılamayacak ise -80°C’de saklandı.
- Liyofilize edildiklerinde yaklaşık her bir 50 ml tüplerde birer gram kadar Growth Factor elde edildi.
- HUVEC hücreleri için yaklaşık besiyerlerinde 125 µg/ml konsantrasyonunda kullanıldı.

5.3. İnsan Göbek Kordonu Endotel Hücrelerinin (HUVEC) İzolasyonu

5.3.1. Çözeltiler

Kordon Çözeltisi: 2.2831 g HEPES, 0.2882 g KCl, 1.9822 g D-Glukoz ve 8.1816 g NaCl 800 ml ultrasaf dH₂O içerisinde çözüldü ve 1 L’ye tamamlandı. +4°C’de pH’sı 7.3’e ayarlandı. Otoklavlanarak sterilize edildi.

Serumsuz M-199: M-199 (Sigma #M5524) besiyeri içerisine serum konulmadan kullanıldı.

Kollejenaz Çözeltisi: Collagenase hazırlanması: 5 mg Collagenase (Sigma #C-2674), 5 ml serumsuz M-199 içerisinde çözüldü ve taze olarak kullanıldı.

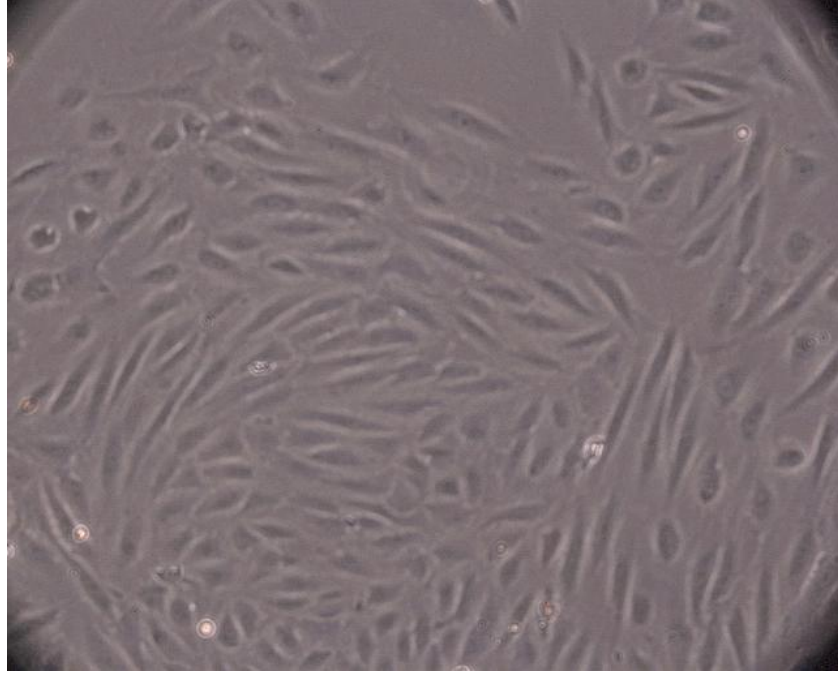
5.3.2. HUVEC'lerin İzolasyonu İşlemleri

Zeynep Kamil Doğum servisinden sezeryan ameliyatları sırasında alınan 20-50 cm uzunluğundaki göbek kordonları steril kordon çözültisi içeren şişelere alındı.

Ameliyat sırasında zedelenen veya mekonyumlu olan kordonlar çalışmaya alınmadı. Alınan kordonlar en geç 12 saat içerisinde çalışıldı.

Kordonlar, steril şişeden laminar flow altında çıkarıldıktan sonra yırtık ve pıhtılı olanlar elendi, sağlam kordonların uçları makas ile dissekte edildi ve venöz ağızdan 5 ch beslenme sondası seti takıldı. Önce kordon 40 ml 37 °C sıcaklığında bulunan steril kordon çözültisi ile beslenme sondası aracılığıyla yıkandı.

Yıkanan kordonlar 37 °C' de 10 ml M-199 Medium (Biological Industries #11-080-1G) + Penisilin (100 U/ml) / Streptomisin (100 µg/ml (Biological Industries #03-031-5C) içinde çözülmüş 10 mg kollajenaz (Sigma #C-2674) ile dolduruldu ve uçları klemlenerek 37 °C' lik su banyosu içinde ultrasaf dH₂O içeren beherde 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda damar yüzeyinden sökülen hücreler infüzyon setinin ucundan verilen 50 ml M-199 Medium + % 2 FBS + Heparin + Penisilin Streptomisin yardımı ile steril tüpler içinde toplandı ve 1000 g'de oda sıcaklığında, 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant dikkatle, vakum sistemi ile çekilerek alındı ve atıldı. Endotel hücrelerden oluşan pellet 1 ml medyum içinde süspanse edildikten sonra aynı şekilde iki kez daha santrifüj edildi. Süpernatant atılıp kalan hücre pelleti üzerine % 20 FBS , penisilin/streptomisin içeren M-199 medyum eklendi. 100 mm çaplı hücre büyütme kaplarına ekim yapıldı. Kaplar 37 °C'lik % 5 'lik CO₂ inkübatörüne konuldu ve besiyerleri 2 günde bir değiştirildi.



Resim 1: İzole edilen HUVEC'lerin 100 mm çaplı kültür kaplarındaki 4. gün

5.4. Hücre Kültür Kaplarının Jelatin ile Kaplanması ve İnsan Göbek Kordonu Endotel Hücrelerinin (HUVEC) Beslenmesi ve Bölünmesi

5.4.1. Çözeltiler

Fötal Sığır Serum (FBS): (Biochrom # S0115, İsviçre) 55°C'de 30 dk sıcaklık ile içinde bulunan enzim ve proteinlerin biyolojik aktivitelerini engellemek amacıyla inaktive edildi. Küçük hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.

Penisilin Streptomisin Çözeltisi: (Biological Industries #03-053-1C, İsrail) Penisilin 10 000 ünite/ml, streptomisin 10 mg/ml konsantrasyonlarında bulunan bu çözeltiden, hücre kültüründeki etkili dozunda kullanabilmek için, besiyerinde 1000 defa seyreltilildi ve küçük hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.

Tripsin EDTA Solüsyon C: (Biochrom # L2143, İsviçre) Küçük hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.

Fibronektin (1 mg/ml): (Biological Industries #03-090-1, İsrail) Deneylerde kullanılmak üzere 20 µg/ml konsantrasyonuna steril PBS ile sulandırılarak +4°C’de saklandı.

dH₂O: Çözeltilerin hazırlanmasında PureLab Plus (USF Elga, Almanya) sisteminden geçirilene 0.055 µS/cm olan en yüksek saflıktaki su kullanıldı.

10 X Fosfat Tamponlu Tuzlu Su Çözletisi (PBS): 80 g NaCl (1.36 M), 2 g KCl (20 mM), 18.5 g Na₂PO₄ (100 mM), 2.4 g KH₂PO₄ (17 mM) tartılarak 1000 ml dH₂O içerisinde çözüldü. Otoklav ile steril edilerek saklandı ve 10 kere seyreltilerek kullanıldı.

% 20 FBS içeren M-199 Besiyeri (250 ml): _Hücre kültür çalışmalarında fenol kırmızısı içeren 1.99 g M-199 (Biological Industries #11-080-1G) içerisine 0.44 g sodyum bikarbonat ve 0.95 g HEPES eklendi ve 200 ml saf su içerisinde çözüldü ve pH 7.4 ‘e ayarlandı. % 20 fetal sığır serumu (FBS), 250 µl Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, #03-031-5C) eklendikten sonra 0.22 µm por genişliğindeki filtreden geçirilerek steril edildi ve +4°C’de saklandı. Bu besiyeri, hücrelerde kullanılırken % 01 oranında büyüme faktörü eklenerek kullanıldı.

HUVEC’lerin, Steroid Hormonlar ve Oksitosin Verilerek Yapılan Deneylerinde Kullanılan Steroidlerce Fakirleştirilmiş Besiyeri (1 L): 9.4 g Fenol kırmızısı içermeyen M-199 (Sigma, #M 3769) tartıldı, 897 ml ultra saf dH₂O içerisinde çözüldü ve 3 ml 200 mM L-Glutamin (Biochrom #K0283) eklendi ve pH 7.4’e ayarlandı. İçerisine 100 ml DCC ile işleme tabi tutulmuş fetal sığır serumu (FBS), 1 ml Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, #03-031-5C) eklendikten sonra 0.22 µm por genişliğindeki filtreden geçirilerek steril edildi. Bu besiyeri, hücrelerde kullanılırken % 0.1 oranında büyüme faktörü eklenerek kullanıldı.

Dekstranla kaplı aktif kömür (DCC: Dextran coated chacoal) ile Steroidlerce Fakirleştirilmiş FBS Hazırlanması: Dekstran kaplı karbon, % 0.5 aktif karbon (Sigma #C-9157) ve % 0.05 dekstran (Sigma #D-4751) tartılır ve % 8 olacak şekilde

otoklavlanmış 0.15 M NaCl pH:7.4 içerisinde ve 4°C'de 18 saat karıştırıldı. Daha sonra +4°C'de 4500 rpm'de RC-5C Sorvall santrifüjde GSA rotorda 10 dk santrifüj edilerek çökelti elde edildi. Bu çökelti 1 g/1.25 ml olacak şekilde ddH₂O içerisinde çözüldü ve bu çözültiden 7.5 ml alınıp, 150 ml FBS üzerine konuldu. Bu karışım 55 °C'de 45 dk karıştırılarak inkübe edildi ve bu karışım inkübasyon sonunda 800 g'de RC-5C Sorvall santrifüjde GSA rotorda + 4°C'de 20 dk santrifüj edildi, üst faz alınarak ikinci defa aynı şartlarda santrifüj edildi. Elde edilen üst faz steroidlerce fakirleştirilmiş FBS olarak kullanıldı (Cho, Ziats, Pal, Utian and Gorodeski 1999). Bu işlemlerden sonra alınan FBS örneğinde, östrojen ve progesteron miktarları RIA temelli olarak ölçülmüş olup, içerisinde 6.7 x 10⁻¹⁰ M östradiol ve 2.5 x 10⁻⁸ M progesteron bulunduğu tespit edildi ve besiyerinde ise 10 kere daha seyreltik olduğundan, deneylerde kullanılan hormonlara olan katkı miktarı çok düşük olduğundan önemsenmedi.

Oksitosin, Östrojen ve Progesteron Maddeleri ile Hazırlanan Steroidlerce Fakirleştirilmiş M-199 Besiyerleri: Bu besiyerleri için kullanılan hormonlar, Oksitosin Asetat (Sigma #O6379, Lot: 103K08181, MW: 1007 g/mol), Östrojen, Beta Östradiol (Sigma #E4389, 024K0839, MW: 272 g/mol), Progesteron (Sigma #P7556, Lot: 77H1244, MW: 372 g/mol), olmak üzere 100'er nM olarak bu hormonlar değişik kombinasyonlarla, steroidlerce fakirleştirilmiş besiyerleri içerisinde kullanıldı. Bu hormonlar ultra saf dH₂O içerisinde çözülerek, 0.22 µm steril enjektör ucu filtreden geçirilerek sterilize edildi.

Kontrol Besiyeri: Dekstran kaplı aktif kömür ile işleme tabi tutulmuş FBS, Fenol Kırmızısı içermeyen M-199 (Sigma M-3769)'a herhangi bir hormon eklenmeden hazırlandı. Bu besiyeri, hücrelerde kullanılırken % 0.1 oranında büyüme faktörü eklenerek kullanıldı.

100 nM 17 β-östradiol İçeren Besiyeri: Dekstran kaplı aktif kömür ile işleme tabi tutulmuş FBS, Fenol Kırmızısı içermeyen M-199 (Sigma M-3769)'a son

konsantrasyonu 100 nM olacak şekilde 17 β -östradiol eklendi. Bu besiyeri, hücrelerde kullanılırken % 0.1 oranında büyüme faktörü eklenerek kullanıldı.

100 nM Oksitosin İçeren Besiyeri: Dekstran kaplı aktif kömür ile işleme tabi tutulmuş FBS, Fenol Kırmızısı içermeyen M-199 (Sigma M-3769)'a son konsantrasyonu 100 nM olacak şekilde oksitosin eklendi. Bu besiyeri, hücrelerde kullanılırken % 0.1 oranında büyüme faktörü eklenerek kullanıldı.

100 nM Progesteron İçeren Besiyeri: Dekstran kaplı aktif kömür ile işleme tabi tutulmuş FBS, Fenol Kırmızısı içermeyen M-199 (Sigma M-3769)'a son konsantrasyonu 100 nM olacak şekilde progesteron eklendi. Bu besiyeri, hücrelerde kullanılırken % 0.1 oranında büyüme faktörü eklenerek kullanıldı.

100 nM Oksitosin ve 100 nM 17 β -östradiol İçeren Besiyeri: Dekstran kaplı aktif kömür ile işleme tabi tutulmuş FBS, Fenol Kırmızısı içermeyen M-199 (Sigma M-3769)'a son konsantrasyonu 100'er nM olacak şekilde oksitosin ve 17 β -östradiol eklendi. Bu besiyeri, hücrelerde kullanılırken % 0.1 oranında büyüme faktörü eklenerek kullanıldı.

100 nM 17 β -östradiol ve 100 nM Progesteron İçeren Besiyeri: Dekstran kaplı aktif kömür ile işleme tabi tutulmuş FBS, Fenol Kırmızısı içermeyen M-199 (Sigma M-3769)'a son konsantrasyonu 100'er nM olacak şekilde 17 β -östradiol ve progesteron eklendi. Bu besiyeri, hücrelerde kullanılırken % 0.1 oranında büyüme faktörü eklenerek kullanıldı.

100 nM Oksitosin ve 100 nM Progesteron İçeren Besiyeri: Dekstran kaplı aktif kömür ile işleme tabi tutulmuş FBS, Fenol Kırmızısı içermeyen M-199 (Sigma M-3769)'a son konsantrasyonu 100 nM olacak şekilde oksitosin ve progesteron eklendi. Bu besiyeri, hücrelerde kullanılırken % 0.1 oranında büyüme faktörü eklenerek kullanıldı.

% 20 FBS İçeren Besiyeri: % 20 oranında FBS ile Fenol Kırmızıısı içeren M-199 ile hazırlandı. Bu besiyeri, hücrelerde kullanılırken % 0.1 oranında büyüme faktörü eklenererek kullanıldı.

Endotel Hücresi Büyüme Faktörü: Liyofilize edilmiş olan Growth Factor hücre kültüründe kullanılırken 125 mg/ml konsantrasyonunda dH₂O ile üzülerek ve 0.22 μm steril enjektör ucu filtreler kullanılarak sterilize edilip -20°C’de saklandı.

5.4.2. Hücre Kültür Kaplarının Fibronektin ile Kaplanması

Fibronektin zltisi 20 μg/ml olarak kullanıldı. Deneylerde değişik hacimlerde ve boyutlarda hücre kültür kapları kullanıldığından, hangi hacimlerde fibronektin zltisi ile bu kapların kaplandığı Tablo 1’de belirtilmiştir. Bu uygun miktarlarda alınan fibronektin zltisi kaplara konulduktan sonra steril kabin içinde bir saat bekletildi. Bu sürenin sonunda fibronektin zltisi vakum altında steril bir pastör pipetiyle çekildi ve PBS ile bir kere yıkandı.

Hücre Kültür Kapları	Kullanılan Fibronektin (20 μg/ml) Hacmi (ml)
100 mm çaplı (60.00 cm ²)	2.0
6 kuyulu (9.03 cm ²)	1.0
12 kuyulu (3.66 cm ²)	0.5
24 kuyulu (1.91 cm ²)	0.2

Tablo 1: Farklı boyutlardaki hücre kültür kaplarının kaplanması için gereken fibronektin hacimleri

5.4.3. HUVEC’lerin Beslenmesi:

Hücreler, % 20 FBS içeren M-199 besiyeri ile büyütüldü. Bu hücreler 3-4 günde bir beslenmeleri amacıyla öncelikle üzerlerindeki besiyeri vakuma bağlanmış steril pastör pipetleriyle çekildi. Oda sıcaklığında bulunan 10 ml steril PBS ile yıkandı. Üzerlerine hücre büyüme kaplarının büyüklüklerine göre aşağıda belirtilen miktarlarda % 20 FBS içeren M-199 eklendi (Tablo 2).

Hücre kültür kapları (yüzey alanı)	Konulması gereken besiyeri (ml)
100 mm çaplı (60.00 cm ²)	10
6 kuyulu (9.03 cm ²)	2.0
12 kuyulu (3.66 cm ²)	1.0
24 kuyulu (1.91 cm ²)	0.5

Tablo 2: Farklı boyutlardaki hücre kültür kaplarına konulması gereken besiyeri miktarları

5.4.4. HUVEC'lerin Bölünmesi:

Endotel hücreleri, kültür şartları altında yaklaşık 36 saatte bir bölünerek çoğalmaktadırlar. Kültür kaplarını kaplayan bu hücreler yapışarak büyüdüklerinden, tripsin enzimi ile kaldırılarak 1:3 gibi bir oranla bölünerek tekrar çoğaltıldılar. Bu işlem için, kültür kapları steril PBS ile yıkandı. 100 mm çaplı 60 cm² alanı olan kap için 1.5 ml tripsin/EDTA C çözeltisi eklendi ve 37 °C'de yaklaşık 5 dk tutuldu. Ters tip biyolojik mikroskop ile hücrelerin kalkması takip edildi, hücre kapları kontrollü bir şekilde uygun bir kenara çarptırıldı, mekanik olarak hücrelerin tamamen kalkmaları sağlandı. Hücrelerin tamamen kalkmasından sonra, tripsinin hücre membranındaki diğer serin zengin proteinlere zarar vermemesi amacıyla hızlı bir konulan tripsin/EDTA C çözeltisinin üç katı hacminde % 20 FBS içeren M-199 besiyeri konuldu. Endotel hücreleri, tripsin ve besiyeri içeren karışım, steril bir cam pipet yardımıyla kültür kabından alınarak steril 15 ml hacmindeki polipropilen tüpe konuldu ve 200 g'de 5 dk santrifüj edildi. Sıvı kısmı vakum sistemine bağlanan steril pastör pipetiyle çekilerek, çökelek kısmı yaklaşık bir ml % 20 FBS içeren M-199 ile çözüldü. Bu hücre çözeltisinden uygun miktar alınarak fibronektin ile kaplanmış olan hücre büyütme kaplarına alındı ve üzerine besiyeri konuldu. % 0.1 oranında olacak şekilde büyüme faktörü ilave edilerek, % 5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edildi.

5.4.5. HUVEC'lere Oksitosin, Östrojen ve Progesteron Hormonlarının Kültür Şartlarında Verilmesi:

HUVEC'leri kültür kaplarında % 80 oranında kapladıklarında, besiyerleri steril pastör pipetler ile vakum ile çekildi ve yerine steroidlerce fakirleştirilmiş % 10 FBS ile hazırlanan besiyeri konularak 24 saat inkübe edildi. Bu 24 saat süre sonunda, aşağıda belirtilen kontrol ve deney besiyerleri 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra bu besiyerleri vakum ile çekilerek aşağıdaki şekilde steroid hormon kombinasyonları bulunan ve bulunmayan medyumları içeren dokuz grup besiyerlerinde 24 saat daha inkübe edildi.

1- Kontrol	6 X 100 mm hücre büyütme kabı
2- Oksitosin 100 nM	6 X 100 mm hücre büyütme kabı
3- Östradiol 100 nM	6 X 100 mm hücre büyütme kabı
4- Progesteron 100 nM	6 X 100 mm hücre büyütme kabı
5- Östradiol 100 nM + Oksitosin 100 nM	6 X 100 mm hücre büyütme kabı
6- Progesteron 100 nM + Oksitosin 100 nM	6 X 100 mm hücre büyütme kabı
7- Östradiol 100 nM + Progesteron 100 nM	6 X 100 mm hücre büyütme kabı

Aynı anda 54 tane 100 mm çaplı kültür kaplarındaki HUVEC'lerden protein, RNA ve besiyeri örnekleri alma zorluğu düşünülerek her bir 12 kültür kabı yani 2 deney grubuna aynı saatte besiyeri eklenerek diğer 12 kültür kabı ile arasında 3 saat zaman aralığı bırakıldı. Bu şekilde verilen üçer saatlik aralar ile protein ve RNA izolasyonu çalışma zamanı olarak planlandı. İnkübasyon sonunda medyumlar 15 ml'lik steril polipropilen tüplere toplandı.

Protein izolasyonu yapılacak olan tüm kültürlere hücre patlatma solusyonu eklendi ve her deney grubundan 4 tanesi kazıyıcı yardımıyla kazımak yoluyla hücreler patlatıldı ve +4 °C santrifüjde, 30 dk 13000 rpm'de santrifüj edilen protein içeren süpernatant kısmı alikotlanarak -80 °C'ye kaldırıldı. RNA izolasyonu için kullanılacak olan 2 adet 100 mm çaplı hücre büyütme kabı kazıyıcı yardımıyla RNA izolasyon kiti (Macherey Nagel, #MN 740.955.50) kullanılarak izole edilmiş olup ayrıca protein izolasyonu için kullanılan tripsin ile kaldırılan hücrelerinde yarısından da RNA izolasyonu yapıldı.

5.5. Hemotositometre ile Hücre Sayma:

Hematositometre distile su ile iyice temizlendi ve üzerine lamel kapatıldı. Hücre süspansiyonu içerisinde 12 µl alınarak bu hemotositometre lamel arasına konuldu. Biyolojik ters mikroskopun 10 X objektif ile hematositometrenin 16 tane büyük kare alanı görüldü. Buradaki hücrelerden, sol ve üst kare çeperine değenlerin sayılması esasına göre tüm karedeki hücreler sayıldı sonuç 16'ya bölündü ve elde edilen sayı 10 000 ile çarpılarak ml'de bulunan hücre sayısı bulundu. Gerekli durumlarda dilüsyonlar yapılarak sayım işlemi yapıldı ve dilüsyon faktörü hesaplamalarda kullanıldı.

5.6. HUVEC'lerin Populasyonlarının İki Katına Çıkma Deneyi

HUVEC'lerin büyüme eğrisinin elde edilmesi ve hücre popülasyonunun iki katına çıkma süresi (Population Doubling Time: PDT), 12 kuyulu hücre kültür kaplarına 10 000, 20 000 ve 40 000 sayılarındaki miktarlarda ekilen hücreler belirli bir süre sonunda sayılarak yapıldı. Bu deneyler için 3. pasaj HUVEC kullanıldı. Hücreler 12 kuyuluk hücre büyütme kaplarına ekildi.

Hücreler tripsinize edilerek, 4. saat, 47. saat, 95. saat, 169.5. saat sonunda hücreler sayıldı ve aşağıdaki denkleme konularak PDT hesaplandı.

$$t_D = \frac{0.693}{\ln \frac{X}{X_0}} \cdot V_t$$

t_D : Hücre popülasyonunun iki katına çıkma süresi
 X_0 : 1. noktadaki hücre sayısı
 X : 2. noktadaki hücre sayısı
 V_t : İki nokta arasındaki saat farkı

Her bir veri noktası için 4 kuyudan elde edilen sonuçların ortalaması standart sapmalarla beraber beraber kullanıldı.

5.7. İmmünohistokimya Yöntemi ile HUVEC'lerin Karakterizasyonu

5.7.1. Çözeltiler

Permeabilizasyon Çözeltisi: PBS içerisine % 0.2 (v/v) Triton X-100 ilave edildi.

Mounting Medium: PBS içerisinde % 50'si gliserol olacak şekilde hazırlandı.

Primer Antikor, Anti-von Willebrand (Factor VIII Related Antigen), Rabbit Polyclonal Antibody, Neomarkers USA, Labvision #RB-281-A1

İmmünohistokimya Kiti, UltraVision LP Value Detection System HRP Polymer & DAB (Diaminobenzidin) Plus Chromogen, Labvision #TL-015-HD

İmmünohistokimya Kiti Bileşenleri

Hidrojen Peroksit Blok (Hydrogen Peroxide Block #TA-015-HP)

Ultra V Blok (Ultra V Block # TA-015-UB)

Sekonder Antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent # TP-015-BN)

Streptavidin Peroksidaz (Streptavidin Peroxidase # TS-015-HR)

DAB Substrat (DAB Plus Substrate #TA-015-HSX)

DAB Kromojen (DAB Plus Chromogen #TA-001-HCX)

Hematoksilen Mayer (Fluka #51260)

5.7.2. Hücrelerin Ekilmesi

Hücreler 24 kuyulu hücre büyütme kaplarında, fibronektin kaplı 12 mm çaplı saat camları üzerinde her bir kuyuda 50 000 hücre olacak şekilde ekilerek çoğaltıldı. Hücrelerin % 80 oranında kapları doldurduklarında fiksasyon işlemi yapıldı.

5.7.3. Hücrelerin Fiksasyonu:

Hücrelerin çoğalmaları tamamlandığında, üzerlerindeki besiyeri çekildi, oda sıcaklığındaki PBS ile yıkandı ve kuyulara 1.5 ml -20°C'de soğutulmuş metanol konuldu ve derin dondurucuda 20 dk tutuldu. Metanol çekilerek PBS ile yıkandı ve PBS içerisinde deney yapılana kadar bekletildi.

5.7.4. İmmünohistokimya Deneyinin Yapılması

Fiksasyonu gerçekleştirilen hücrelerin bulunduğu saat camları alınarak 100 mm çaplı hücre büyütme kapları gibi daha geniş bir alana alındı ve kurumamaları amacıyla

üzerlerine PBS konuldu. Hücrelerde bulunan hidrojen peroksidaz enziminin vereceği sinyalleri azaltmak amacıyla hidrojen peroksit çözeltisinden 100 µL konuldu, 15 dk oda sıcaklığında bekletildi ve vakum ile çekilerek 4 kere PBS ile yıkandı. Camların üzerine 100 µL Ultra V Blok eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi, vakum ile çekildi ve 1 kere PBS ile yıkandı. Primer antikör olarak seçilen, HUVEC'lerin spesifik olan Faktör VIII ilişkili antikör/VonWillebrand Faktör, 1:100 oranında % 1 BSA içeren PBS içerisinde hazırlandı ve 1 saat oda sıcaklığında her bir saat camı üzerine 100 µL konularak inkübe edildi. Buharlaşma nedeniyle saat camlarının kurumaması için bir nemli ortam içerisinde inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra antikör vakum ile çekildi ve 4 kere PBS ile yıkandı. Sekonder antikordan 100 µL konuldu ve 10 dk oda sıcaklığında tutuldu ve vakum ile çekilerek 4 kere PBS ile yıkandı. Streptavidin peroksidazdan 100 µL konuldu ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra vakum ile çekilerek 4 kere PBS ile yıkandı. 1 ml DAB substrat içerisine 1-2 damla DAB kromojen konuldu ve bu karışımdan 100 µL cam üzerine konularak 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu çözelti kanserojen olduğu için dikkatle alında ve özel atığa atıldı. PBS ile 4 kere yıkandı ve hematoksilen mayer çözeltisinden 100 µL cam üzerine konuldu 5 dk oda sıcaklığında tutulduktan sonra çeşme suyu bulunan bir beher içerisinde yıkandıktan sonra, üzerine 1:1 Gliserol:PBS bulunan lam üzerine hücreler lama kapanacak şekilde yerleştirildi. Bir yapıştırıcı ile bu camlar lama yapıştırıldı. Yapıştırıcı kurduktan sonra mikroskop altında 10 X objektif ile boyanan hücrelerin boyanmayana hücrelere oranı hesaplandı.

5.8. Oksitosin, Östrojen ve Progesteronun HUVEC'lerde C tip Natriüretik Peptit Ekspresyonu Üzerine Etkisi

5.8.1. Protein İzolasyonu

5.8.1.1.Çözeltiler

Hücre Patlatma Çözeltisi (100 ml) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, %1 Triton X-100, 1 mM EDTA buz soğukluğunda pH=8.0): 0.88 mg NaCl tartıldı ve 1 ml Triton X-100, 5 ml 1M Tris HCl, 1 ml 100 mM EDTA eklendi, ultra saf dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı, pH:8.0 ayarlandı ve + 4° C'de saklandı.

1 M Tris Çözeltisi (50 ml): 6.057 g Tris tartılarak 50 ml ultrapure su içinde çözüldü ve pH: 8.0 ayarlandı.

100 mM EDTA (100 ml): 3.72 g EDTA tartılıp 100 ml ultra saf dH₂O içinde çözüldü.

Hücre Patlatma Çözeltisine Eklenen Protease İnhibitörlerinin Hazırlanması:

Pepstatin (1mg/ml) : 10 mg pepstatin tartılıp 10 ml metanol içinde çözüldü.

Leupeptin (1mg/ml): 10 mg leupeptin (Sigma, #L-2884) tartılıp 10 ml ultra saf dH₂O içinde çözüldü.

PMSF (0.1 M): 0.0174 g PMSF tartılıp 1 ml metanol içinde çözüldü.

5.8.1.2. Protein İzolasyonu İşlemleri

1 ml hücre patlatma solüsyonu alınır. İçine;

-1µl pepstatin (1mg/ml) (son konsantrasyon 10µg/ml)

-1µl leupeptin (1mg/ml) (son konsantrasyon 10µg/ml)

-10µl PMSF (0.1M) (son konsantrasyon 1mM) eklendi.

-Hücre kültür ortamı çekilmiş ve PBS ile yıkanmış olan hücrelerin üzerine 200 µl proteaz inhibitörü içeren hücre patlatma solüsyonu eklendi.

-Hücreler buz içeren bir kabın üzerinde, kazıyıcı yardımı ile hücre kültür kabından kaldırıldı ve hücre lizatı buz üzerinde bekleyen bir eppendorf tüpe aktarıldı.

-Tüpler, 11000 g'de + 4° C'de 30 dk çevrildi ve süpernatant alınıp eppendorf tüplere paylaştırıldı ve kullanılmayacaksa -80° C'ye kaldırıldı.

5.8.2. Proteinlerin BCA Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

5.8.2.1.Çözeltiler

BCA Compat-Able Protein Assay Kit (Pierce #23223)

Bovine Serum Albumin (BSA) Standartları

5.8.2.2.BSA Standartlarının Hazırlanması

BCA ile protein miktarlarını ölçebilmek için sığır serumu albumini (BSA) proteininden değişik konsantrasyonlarda hazırlanarak bir standart bir eğri grafiği çizildi. 25 µl'sinde 30, 25, 20, 15, 10, 5 ve 2.5 µg BSA bulunan standartlar hazırlandı.

5.8.2.3.BCA Ölçümünün Yapılması

Biçinkonik asit (BCA) protein tayin yönteminde Bakır Sülfat, BCA solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk alır. Bu solüsyon protein solüsyonuna ilave edildiğinde, proteinin peptit bağları ile etkileştiğinde Cu^{++} iyonları Cu^{+} iyonlarına dönüşür ve kompleksin rengini mora çevirir. Bu yöntem hızlı, hassas ve kesindir ancak deterjan ve organik solventlerle etkileşimlerine dikkat etmek gerekir.

-Ölçüm için Pierce marka BCA Compat-Able Protein Assay Kit ve 96 kuyuluk mikropate kullanıldı.

-Her bir kuyuya 25 µl standart veya bilinmeyen örnek pipetlendi. Bilinmeyen örneklerde bulunan hücre patlatma çözeltisi, BCA ile etkileşime girerek yanlış

sonuçlar verdiğinden örnekler 10 kere ultrasaf dH₂O ile seyreltilerek ölçüm yapıldı ve bu seyreltme katsayısı hesaplamalarda dikkate alındı.

-Kuyuların zerine 200 μ l çalışma ayıracı pipetlenir ve plate karıştırıcıda 30 sn tutuldu.

-Plate 37°C hava ısıtmalđ etüve, içinde yaklaşık 100 ml su bulunan bir kap içerisinde yerleştirilerek 30 dk inkübe edildi.

-15 dk oda sıcaklığına ulaşması için beklendi.

-A₅₄₀ nm'de okundu.

5.8.3. Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin PVDF Membrana Aktarılması

5.8.3.1.SDS-Poliakrilamid Jelin Hazırlanması ve Yürütülmesi

5.8.3.2.zelteler

%10'luk SDS zeltisi: 10 g SDS 100 ml ultra saf dH₂O su içinde üzüldü.

%10'luk Amonyum persülfat (APS): 0.5 g APS 5 ml ultra saf dH₂O içinde üzüldü.

N,N,N'N'- tetrametil-etildiamin (TEMED): Sigma #T-1233.

Elektroforez Yürütme zelteleri: Elektroforez işleminde anot ve katot kısmında ayrı tamponlar kullanıldı.

10X Anot Yürütme zeltisi (1 M Tris, 0.255 M HCl, pH:8.9): 100 ml hazırlamak için, 12.1 g Tris tartıldı, 97.9 ml ultra saf su eklendi ve üzerine 2.1 ml

HCl konuldu, karıştırıldı ve pH değeri 8.9'a ayarlandı. Kullanılırken, 10 kere seyreltilerek kullanıldı.

10X Katot Yürütme Çözeltisi (1 M Tris, 1 M Tricine, % 1 SDS, pH:8.25): 100 ml hazırlamak için, 12.1 g Tris, 17.92 g Tricine, 1 g SDS tartıldı, ve 100 ml ultra saf suya tamamlandı, karıştırıldı ve pH değerinin 8.25 olduğu görüldü. pH değeri protokolda de belirtildiği üzere ayarlanmadı. Kullanılırken, 10 kere seyreltilerek kullanıldı.

10 X Transfer Çözeltisi-Towbin Tamponu (25 mM Tris, 192 M Glisin, pH:8.3): 100 ml hazırlamak için, 3.03 g Tris, 14.4 g glisin tartıldı 100 ml ultra saf su ile tamamlandı, pH değeri 8.3'e ayarlandı. Kullanılırken, 10 kere seyreltilerek kullanıldı ve % 10 metanol eklendi.

AB-6 Solusyonu: 46.5 g akrilamid, 3 g bisakrilamid tartıldı, 100 ml ultrasaf suya tamamlandı.

3 X Jel Tamponu (3 M Tris, 1 M HCl, % 0.3 SDS) : 100 ml hazırlamak için, 36.3 g Tris tartıldı, 97.9 ml ultra saf su eklendi ve üzerine 8.26 ml HCl konuldu, karıştırıldı ve pH değeri 8.45'e ayarlandı.

5.8.3.3.Tris-tricine SDS-Poliakrilamid Jelin Dökülmesi

Proteinlerin negatif yüklü SDS molekülleri ile kaplandıktan sonra molekül ağırlıklarına göre poliakrilamid jel ortamında elektrik alan içinde göç etmesi ve boya maddesi ile bantların görünür hale getirilmesi prensibine dayanan elektroforez işlemi için jel ayırma ve yığınlama olmak üzere iki kısım olarak hazırlandı.

	Ayırma jeli %16	Yığınlama Jeli % 4
AB-6 (ml)	10	1
3 X Jel Tamponu (ml)	10	3
Gliserol (ml)	3	-
Su ile tamamlanacak son hacim (ml)	30	12
APS % 10 (µl)	100	90
TEMED (µl)	10	10

Tablo 3. Ayırma ve yığınlama jeli için kimyasal malzemeler ve kullanılacak miktarlar

-10X elektroforez yürütme çözeltilerinden 1X yürütme çözeltisi yapıldı. Anot ve katot boşluklarına uygun çözeltiler konuldu.

-Hazırlanan jel üzerindeki kuyular bir enjektör yardımıyla 1 X katot yürütme çözeltisi ile iyice yıkandı.

5.8.3.4. Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi

-Örnekler istenen hacimlerde toplam protein miktarı BCA yöntemiyle belirlenerek eppendorf tüplere pipetlendi ve 5:1 oranında yükleme tamponu eklenip 5 dk kaynatıldı.

-Daha sonra bu örnekler enjektör yardımıyla kuyulara 20 µl 'lik miktarlarda kuyulara yüklenip boş kuyulara aynı miktar yükleme tamponu eklendi.

-Örnekler yığınlama jelinde 30 V'da ve ayırma jelinde 100 V'da yürütüldü.

5.8.3.5. Western Transfer

5.8.3.5.1. Çözeltiler

Membran: Immobilon PVDF Membran 0,22 µm, Millipore #ISEQ00010

Western Blot Detection Kit: Super Signal West Pico Chemiluminescent, Pierce #34080

X-Ray Film: Fuji Film, XR-exposure Film,

X-Ray Film Banyoları:

Developer Banyosu: 1.5 g metol, 25 g sodyum sülfat, 0.25 g sodyum karbonat, 3 g hidrokinon tartıldı ve 1 L distile su içerisinde çözüldü.

Fiksatif Banyosu: 62.5 g sodyum tiyosülfat, 5 g potasyum metabisülfat tartıldı ve 1 L distile su içerisinde çözüldü.

TBS (20 mM Tris-HCL, 154 mM NaCl), 1 L: 2.42 g Tris-HCl ve 9 g NaCl tartılıp 1 L ultrasaf su içinde çözüldü ve pH:7.4'e ayarlandı.

Bloklama Solusyonu: TBS içerisinde % 3 oranında BSA eklendi ve iyice çözünmesi sağlandı.

Birincil Antikor Hazırlanması: TBS içerisinde % 0.5 oranında BSA, % 0.1 olacak şekilde Tween -20, % 0,02 NaN₃ ve antikor konuldu.

İkincil Antikor Hazırlanması (1:5000): TBS içerisinde % 0.5 oranında BSA, % 0.1 olacak şekilde Tween -20, 1 µL Anti-Goat Mouse (Santa Cruz #SC-2354) antikorunu konuldu ve son hacim 5 ml'ye ayarlanarak hazırlandı.

5.8.3.5.2. Yarı Kuru Transfer

Yarı kuru transfer işlemi için Towbin tamponu 10 kere seyreltildi ve % 10 metanol eklenerek kullanıldı. 2 kat Whatman 3 MM filtre kağıdı ve PVDF membran kağıdı jel boyutunda kesildi. PVDF membran kağıdı metanolla 15 saniye kadar ıslatılarak 3 MM Whatman kağıtları ile birlikte hazırlanan metanollü Towbin tamponu içerisinde 15 dk oda sıcaklığında çalkalandı. Proteinlerin PVDF membrana aktarılması için yarı kuru transfer sisteminde, alta 2 kat 3 MM Whatman kağıdı, jel, PVDF membran ve tekrar 2 kat 3 MM Whatman kağıdı ile sandviç benzeri olarak hazırlandı. Bio-Rad

Semi Dry transfer aleti (Bi-Rad #170-3940) ile 15 volt'da 45 dakika (dk) oda sıcaklığında transfer işlemi gerçekleştirildi.

5.8.3.5.3. Bloklama

TBS içerisinde % 3 BSA çözüldü ve 1 saat oda sıcaklığındak, bir çalkalayıcı üzerinde çalkalanarak inkübe edildi.

5.8.3.5.4. Birincil Antikor

Anti-Aktin antikor: Actin (I-19), Santa Cruz # SC-1616, Lot: L1307, 1:1000 olacak şekilde TBS içerisinde çözüldü, 10 ml antikor çözeltisine koruyucu olarak 50 µL % 2 NaN₃ eklendi.

Anti-CNP antikor: CNP (C tip natriüretik peptit), SC # 20371, Lot: L1345, 1:400 olacak şekilde TBS içerisinde çözüldü, 10 ml antikor çözeltisine koruyucu olarak 100 µl % 2 NaN₃ eklendi.

5.8.3.5.5. İkincil Antikor

Anti-Goat Mouse, Santa Cruz #SC-2354, Lot: B0547, 1:5000 olacak şekilde TBS içerisinde çözüldü.

5.8.3.5.6. C Tip Natriüretik Peptit / Aktin Proteinlerinin Belirlenmesi

Bu yöntem ile SDS-PAGE ile protein bantları halinde ayrılmış olan lizatlar elektrik akımı ile bir matriks membrana aktarıldı. Membrana aktarılmış proteinlerden araştırılmak istenene karşı antikorlar ve anti-antikorlar ile bir deteksiyon yapıldı. Bu deteksiyon ile ilgilenilen protein semi kantitatif olarak tespit edildi (Manchenko 2003).

5.8.3.5.6.1. Karanlık Oda İşlemleri

PVDF üzerine transfer edilmiş olan proteinler karanlık odada, kemiluminesans kit (Super Signal West Pico Chemiluminescent, Pierce #34080) kullanılarak oluşan ışığa X-ray filmlere aktarıldı. Kemiluminesans kit protokolünde belirtildiği gibi, bu kitin iki bileşeninden de birer birim alınarak her bir membran için 4 ml kullanıldı ve membran bu kit ile iyice ıslatıldı. Membranın altına üstüne asetat film konuldu. Asetatların üzerinde su kalmamasına dikkat edilerek bir X-ray film kasetine yerleştirildi. X-ray film ile 1, 5, 10, 30 ve 60 dk sürelerle membran ile film bekletildi. Kırmızı ışık altında 6 dk developer ve 1 dk fiksatif solusyonunda tutuldu.

5.8.4. Oksitosin, Östrojen ve Progesteronun HUVEC’lerde C Tip Natriüretik Peptit Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde İncelenmesi

5.8.4.1.Çözeltiler

Scraper (Hücre Kazıyıcı)

Total RNA İzolasyonu Kiti: Macherey Nagel: MN #740955.50

Total RNA İzolasyon Kiti Bileşenleri

RA1 Tamponu

RA2 Tamponu

RA3 Tamponu

MDB Tamponu (Membrandan Tuz Uzaklaştırıcı Tampon)

rDNase (Rekombinant DNase)

rDNase için Tampon

H₂O

Nucleospin® Filter L Units Plus Collecting Tubes (Nucleospin® Filtre L Ünitesi)

Nucleospin® RNA L Columns Plus Collecting Tubes (Nucleospin® RNA L Kolunu)

1.5 ml Elüsyon Tüpleri

5.8.4.2.RNA İzolasyonunun Yapılması

RNA izolasyonu, 100 mm çaplı hücre büyütme kaplarından elde edilen endotel hücrelerinden Total RNA İzolasyonu kiti ile yapıldı.

- RA1 patlatma tamponundan 350 µl alınıp üzerine 3.5 µL β-merkaptoetanol konularak bir karışım hazırlandıktan sonra bu karışım 100 mm çaplı hücre büyütme kaplarının üzerine konularak bir kazıyıcı yardımıyla hücreler parçalandı ve lizat elde edildi.

- Bu lizat, NucleoSpin® Filter Column üzerine konuldu ve 1 dk 11 000xg'de 1 dk santrifüj edildi.

- Kolondan tüpe geçen lizat üzerine 350 µl % 70 etanol konuldu ve 2 defa 15'er saniye vorteks yapıldı.

- Lizat, NucleoSpin® RNA II Column üzerine konuldu ve 30 saniye 11 000xg'de santrifüj edildi. Bu durumda, RNA kolona bağlandı.

- Kolona 350 µl MDB tamponu konul ve 1 dk 11 000xg'de santrifüj edildi.

- Kolondan DNA'ları uzaklaştırmak ve parçalamak amacıyla 95 µl DNase (10 µl DNase + 90 µl DNase tampon karışımından) eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Üzerine 200 µl RA2 yıkama solusyonunda konuldu ve 30 saniye 11 000xg'de santrifüj edildi.

- Kolona 600 µl RA3 yıkama solusyonundan konuldu 30 saniye 11 000xg'de santrifüj edildi. Kolona tekrar 250 µl RA3 yıkama solusyonu konuldu ve 2 dk 11 000xg'de santrifüj edildi.

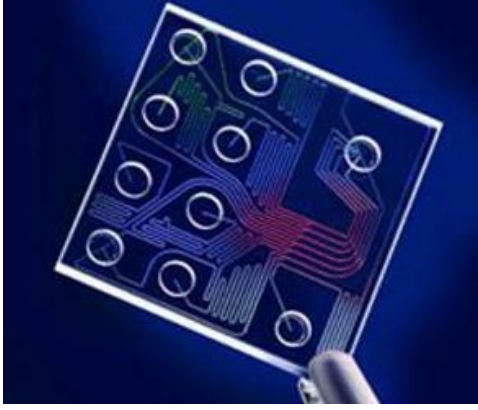
- Kolona 40 µl su konuldu ve 1 dk 11 000xg'de santrifüj edilerek bir tüp içerisinde toplandı ve -80°C'de saklandı.

5.8.4.3.RNA miktarının Nanodrop Cihazı ile Ölçülmesi

İzole edilen RNA'ların miktarı Nanodrop™ ThermoScientific cihazı ile ölçüldü. DEPC ile işlem görmüş su ile 1:10 sulandırılan RNA örneklerinden 2 µl alındı ve suya karşı kör alınan cihaz ile ölçümler yapıldı. RNA miktarları 50 ng/µl ile 600 ng/µl arasında bulundu.

5.8.4.4.RNA Kalitesinin Bioanalyzer 2100 Cihazı ile Kontrol Edilmesi

RNA kalitesini gösteren bir tanım olan RIN (RNA integrity number), gen ekspresyonunun kantitatif olarak ölçülmesi işlemlerinde ölçülmesi gerekmektedir (Fleige and Pfaffl 2006). Bu tez çalışmasında RIN değerine Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı ile bakıldı. Bu cihaz, 28 S ve 18 S ribozomal RNA miktarlarını mikroludik sistem ile ölçerek 2 ile 10 arasında RIN değeri vermektedir. Cihazın ölçüm yapabilmesi için 1 µl total RNA gerekmektedir.



Resim 2. Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı ve kullanılan çip

5.8.4.5.cDNA Sentezinin Yapılması

Elde edilen total RNA örnekleri, kullanıla Bio-Rad iscript cDNA sentez kiti (Bio-Rad # 170-8090) ile cDNA'ya çevrilmiştir.

Bio-Rad cDNA Sentez kiti içeriği:

Reverse transkriptaz enzimi

Reverse transkriptaz enzim tamponu

dNTP karışımı

Rastlantısal hekzamer

1 µg total RNA alınmış ve DNase ile işleme tabi tutularak DNA'dan arınmış RNA elde edildi. 1 µg RNA hacmi DEPC ile işleme tabi tutulmuş su ile 15µl'ye getirildi.

4µl 5X iscript tamponu ve 1 µl iscript transkriptaz enzimi eklenen örnekler sıcaklık döngü cihazı ile aşağıdaki sıcaklık dereceleri ve zamanlarıyla cDNA'lar elde edildi.

5x iScript Reaction Mix	4µl
iScript Reverse Transcriptase	1µl
DEPC ile işleme tabi tutulmuş su	xµl
RNA kalıp	xµl
Toplam hacim	20 µl

Sıcaklık dereceleri ve zamanları:

5 dk	25°C
30 dk	42°C
5 dk	85°C

5.8.4.6.Real Time PCR Analizinin Yapılması

Kullanılan kimyasal malzeme ve kitler:

IQ supermix, Bio-Rad #170-8860

PCR plate, Greiner #652201

IQ SYBR Green supermix, Bio-Rad #170-8882

Real Time PCR için gerekli olan kimyasal malzemeleri içeren bir karışımdır ve iki kere konsantre şekildedir. Kullanımında 12.5 µl bu karışımdan alınır ve 12.5 µl'de kalıp cDNA, su, primerler, Taqman® prob olacak şekilde toplam 25 µl hacim ile PCR yapılır. Real Time PCR cihazı olarak Bio-Rad IQ5 kullanılmıştır (resim 2).



Resim 3. Bio-Rad IQ5 cihazı.

C Tip Natriüretik Peptit Ekzon Dizisi

Gen Numarası: : NM_024409.1

Exon 1:

ATGCATCTCTCCCAGCTGCTGGCCTGCGCCCTGCTGCTCACGCTGCTCTCC
CTCCGGCCCTCCGAAGCCAAGCCCGGGGCGCCGCCGAAG

Exon 2:

GTCCCGCAACCCCGCCGGCAGAGGAGCTGGCCGAGCCGCAGGCTGCGG
GCGGCGGTCAGAAGAAGGGCGACAAGGCTCCCGGGGGCGGGGGCGCCA
ATCTCAAGGGCGACCGGTCGCGACTGCTCCGGGACCTGCGCGTGGACAC
CAAGTCGCGGGCAGCGTGG**GCTCGCCTTCTGCAAGAGCACCCCAACGCG**
CGCAAATACAAAGGAGCCAACAAGAAGGGCTTGTTCAAGGGCTGCTTCG
GCCTCAAGCTGGACCGAATCGGCTCCATGAGCGGCCTGGGATGTTAG

CNP Primeri Forward: 0.3 μ M olarak kullanılmıştır.
5'-GCTCGCCTTCTGCAAGAGC-3'

CNP Primeri Reverse: 0.3 μ M olarak kullanılmıştır.
5'-CGAAGCAGCCCTTGGACA-3'

CNP Taqman Prob: 0.2 μ M olarak kullanılmıştır.
FAM 5'-CCCAACGCGCGCAAATACAAA-3' TAMRA

Glikoz 6 Fosfat Dehidrojenaz Geninin Ekzon Dizisi:

Gen numarası: NM_001042351.1

Exon 1:

CGAGAACTCGGGAAGCCGGCGAGAAGTGTGAGGCCGCGGTAGGGCCGC
ATCCCGCTCCGGAGAGAAGTCTGAGTCCGCCAGGCTCTGCAGGCCCGCG
GAAGCTCG

Exon 2:

AGGGACAGCCCAGAGGAGGCGTGGCCACGCTGCCGGCGGAAGTGGAGC
CCTCCGCGAGCGCGCGAGGCCGCCGGGGCAGGCGGGGAAACCGGACAGT
AGGGGCGGGGCCTGGCCGGCGATGGGGATTCTGGGAGCACTACGCGGAGC
TGCACCCGTGCCCGCCGGAATTGGGGATGCAGAGCAGCGGCAGCGGGTA
TGGCAGGCAGCCGGCGGGCCGGCCTCCAGCGCAGGTGCCCGAGAGGCAG
GGGCTGGCCTGGGATGCGCGCGCACCTGCCCTCGCCCCGCCCCGCCCCGA
CGAGGGGTGGTGGCCGAGGCCCGCCCCGCACGCCTCGCCTGAGGCGGG
TCCGCTCAGCCCAGGCGCCCGCCCCGCCCCGCCGATTAATGGGCCGG
CGGGGCTCAGCCCCGAAACGGTCGTACACTTCGGGGCTGCGAGCGCG
GAGGGCGACGACGACGAAGCGCAG

Exon 3:

ACAGCGTCATGGCAGAGCAGGTGGCCCTGAGCCGGACCCAGGTGTGCGG
GATCCTGCGGGAAGAGCTTTTCCAGGGCGATGCCTTCCATCAGTCGGATA
CACACATATTCATCATCATGGGTGCATCG

Exon 4:

GGTGACCTGGCCAAGAAGAAGATCTACCCACCATCTG

Exon 5:

GTGGCTGTTCCGGGATGGCCTTCTGCCCCGAAAACACCTTCATCGTGGGCT

ATGCCCGTTCCCGCCTCACAGTGGCTGACATCCGCAAACAGAGTGAGCCC
TTCTTCAAG

Exon 6:

GCCACCCAGAGGAGAAGCTCAAGCTGGAGGACTTCTTTGCCCGCAACT
CCTATGTGGCTGGCCAGTACGATGATGCAGCCTCCTACCAGCGCCTCAAC
AGCCACATGAATGCCCTCCACCTGGGGTCACAGGCCAACCGCCTCTTCTA
CCTGGCCTTGCCCCGACCGTCTACGAGGCCGTCACCAAGAACATTCACG
AGTCCTGCATGAGCCAGAT

Exon 7:

AGGCTGGAACCGCATCATCGTGGAGAAGCCCTTCGGGAGGGACCTGCAG
AGCTCTGACCGGCTGTCCAACCACATCTCCTCCCTGTTCCGTGAGGACCA
GATCTACCGCATCGACCACTACCTGGGCAAGGAGATGGTGCAGAACCTC
ATGGTGCTGAG

Exon 8:

ATTTGCCAACAGGATCTTCGGCCCCATCTGGAACCGGGACAACATCGCCT
GCGTTATCCTCACCTTCAAGGAGCCCTTTGGCACTGAGGGTCGCGGGGGC
TATTTGATGAATTTGGGATCATCCG

Exon 9:

GGACGTGATGCAGAACCACCTACTGCAGATGCTGTGTCTGGTGGCCATGG
AGAAGCCCCTCCACCAACTCAGATGACGTCCGTGATGA

Exon 10:

GTCAAGGTGTTGAAATGCATCTCAGAGGTGCAGGCCAACAATGTGGTCCT
GGGCCAGTACGTGGGGAACCCCGATGGAGAGGGCGAGGCCACCAAAGG
GTACCTGGACGACCCACGGTGCCCCGCGGGTCCACCACCGCCACTTTTG
CAGCCGTCGTCTCTATGTGGAGAATGAGAGG TGGGATG

Exon 11:

GGGTGCCCTTCATCCTGCGCTGCGGCAAGGCCCTGAACGAGCGCAAGGC
CGAGGTGAGGCTGCAGTTCCATGATGTGGCCGGCGACATCTTCCACCAGC
AGTGCAAGCGCAACGAGCTGGTGATCCGCGTGCAGCCCAACGAGGCCGT
GTACACCAAGATGATGACCAAGAAGCCGGGCATGTTCTTCAACCCCGAG
GAGTCGGAGCTGGACCTGACCTACGGCAACAGATAACAAG

Exon 12:

AACGTGAAGCTCCCTGACGCCTACGAGCGCCTCATCCTGGACGTCTTCTG
CGGGAGCCAGATGCACTTCGTGCGCAG

Exon 13:

CGACGAGCTCCGTGAGGCCTGGCGTATTTTCACCCCACTGCTGCACCAGA
TTGAGCTGGAGAAGCCCAAGCCCATCCCCTATATTTATGG CAG

Exon 14:

CCGAGGCCCCACGGAGGCAGACGAGCTGATGAAGAGAGTGGGTTTCCAG
TATGAGGGCACCTACAAGTGGGTGAACCCCCACAAGCTCTGAGCCCTGG
GCACCCACCTCCACCCCGCCACGGCCACCCTCCTTCCCGCCGCCCGACC
CCGAGTCGGGAGGACTCCGGGACCATTGACCTCAGCTGCACATTCCTGGC
CCCGGGCTCTGGCCACCCTGGCCCGCCCTCGCTGCTGCTACTACCCGAG
CCCAGCTACATTCCTCAGCTGCCAAGCACTCGAGACCATCCTGGCCCCCTC
CAGACCCTGCCTGAGCCCAGGAGCTGAGTCACCTCCTCCACTCACTCCAG
CCCAACAGAAGGAAGGAGGAGGGCGCCCATTCGTCTGTCCCAGAGCTTA
TTGGCCACTGGGTCTCACTCCTGAGTGGGGCCAGGGTGGGAGGGAGGGA
CAAGGGGGAGGAAAGGGGCGAGCACCCACGTGAGAGAATCTGCCTGTG
GCCTTGCCCGCCAGCCTCAGTGCCACTTGACATTCCTTGTCACCA
GCAACATCTCGAGCCCCCTGGATGTCCCCTGTCCCACCAACTCTGCACTC
CATGGCCACCCCGTGCCACCCGTAGGCAGCCTCTCTGCTA
TAAGAAAAGCAGACGCAGCAGCTGGGACCCCTCCCAACCTCAATGCCCT
GCCATTAAATCCGCAAACAGCC

G6PDH Primeri Forward: 5'-TGCCCCCGACCGTCTAC-3' 0.3 µM olarak kullanıldı.

G6PDH Primeri Reverse: 5'-ATGCGGTTCCAGCCTATCTG-3' 0.3 µM olarak kullanıldı.

G6PDH Taqman prob: Cy5 5'-ACTCGTGAATGTTCTTGGTGACGGCC-3' BH₄ 0.2 µM kullanıldı.

http://medgen.ugent.be/rtpimerdb/assay_report.php?assay_id=1031

Su: Real Time PCR deneylerinde kullanılan su, nükleazdan arındırılmış özelliindedir.

Primerlerin Hazırlanması:

Alınan primerler Operon firmasından F ve R primerle 100 nmol, prob ise 50 nmol olacak şekilde satın alınmıştır. Laboratuara geldiğinde liyofilize halde olan primerler kendi bilgi dosyalarında bulunan şekilde sulandırıldı.

5.9.ELISA Yöntemiyle Oksitosin, Östrojen ve Progesteronun HUVEC'lerden C Tip Natriüretik Peptitin Besiyerine Sekresyonunun Ölçülmesi

Çözeltiler:

NT-proCNP ELISA Kiti, Biomedica #BI-20872

Kit bileşenleri:

Antikor kaplı plate

Yıkama tamponu, 20 kere konsantre

Standartlar (0, 2.5, 5, 10, 20, 40 pmol/l)

Kontrol örneği

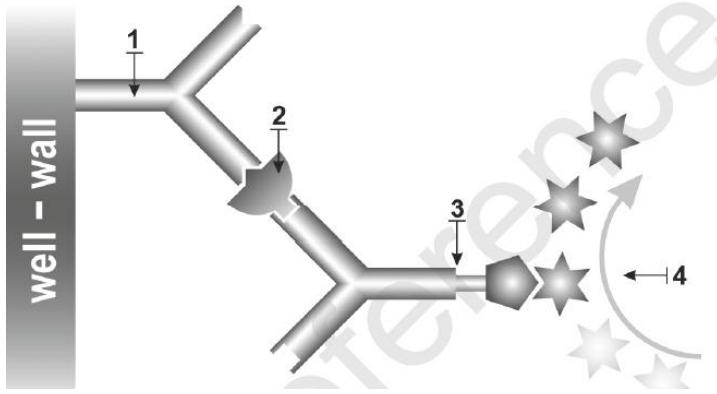
Konjugat, anti NT-proCNP-HRPO

Substrat, TMB çözeltisi

Durdurucu çözelti

Bu kitin çalışma prensibi şekil 8'de de görüldüğü gibi antikor kaplı kuyulara örnek, standart ve kontrol eklenerek bir antikor antijen etkileşimi meydana gelir. HRP

enzimi konjugat olarak eklenir ve TMB solusyon ile bir renk meydana gelir. Bu oluşan renkte spektrofotometrede absorbansı ölçülerek standart grafiği yardımıyla örneklerdeki NT-proCNP konsantrasyonu pikomolar olarak ifade edilebilir.



Şekil 8 : ELISA kitinin çalışma prensibi

- 1: ELISA plate kaplı antikor
- 2: Örnek, standart veya kontrol
- 3: HRP enzimi bağlı konjugat
- 4: TMB çözeltisi

Deneyin yapılışı:

- Her bir antikor kaplı kuyuya, standartlardan, kontrolden ve örneklerden duplike olarak 50'şer µl konuldu, fakat kör olarak oluşturulan iki kuyuya konulmadı.
- Kör hariç, her bir kuyuya 200'er µl konjugat konuldu.
- Kuyuların üzeri kitten çıkan bir band ile kapatıldı, oda sıcaklığında ve karanlıkta dört saat inkübasyona bırakıldı.
- Kuyular beş kere yıkama çözeltisi ile yıkandı.
- Sert bir biçimde bir havlu kağıda vurularak kuyularda sıvı kalmaması sağlandı.
- Tüm kuyulara 200'er µl substrat eklendi.
- Yarım saat oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.

- Üzerine 50 µl durdurma solusyonu eklendi ve ELISA okuyucuda A₄₁₅ ve A₆₅₅ nm'de okundu.

6. BULGULAR

6.1. HUVEC Büyüme Eğrisinin Elde Edilmesi ve ve Hücre Popülasyonunun İki Katına Çıkma Süresinin Hesaplanması

HUVEC'lerin büyüme eğrisinin elde edilmesi ve hücre popülasyon sayısının iki katına çıkması süresi farklı miktarlarda ekilen hücrelerin belirli süreler sonunda sayılarak yapıldı. 12 kuyulu hücre büyüme kaplarında yapılan deneylerde her bir nokta için 4'er tekrar kuyu çalışılmış olup, hücreler 3. pasaj olarak kullanıldı. Yapılan deneylerin sonuçları Tablo 4'de gösterildi. Elde edilen veriler hem büyüme eğrisinin çiziminde (Şekil 9) hem de popülasyonun ne kadar sürede iki katına çıktığının bulunmasında kullanıldı (Tablo5). Büyüme eğrisinden beklenen, hücrelerin sayısının artması ile buldukları kapta daha fazla büyüyemeyerek eğrinin plato konumuna gelmesidir.

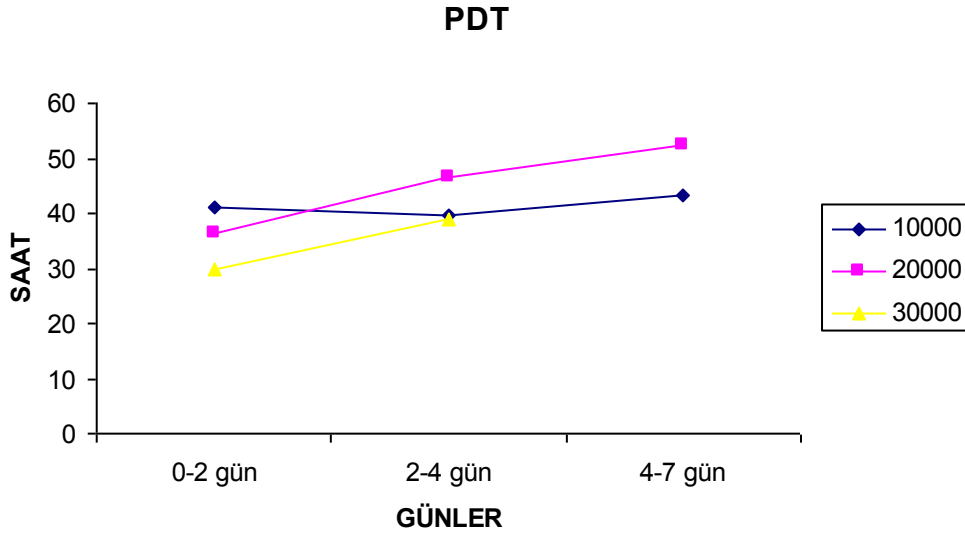
HÜCRE PASAJI 3				
EKİLEN HÜCRE SAYISI	0. GÜNDE SAYILAN HÜCRE SAYISI	2. GÜNDE SAYILAN HÜCRE SAYISI	4. GÜNDE SAYILAN HÜCRE SAYISI	7. GÜNDE SAYILAN HÜCRE SAYISI
10 000	9 205 ± 751	19 031 ± 1 735	44 126 ± 7 704	123 708 ± 33 219
20 000	19 870 ± 1 357	45 185 ± 2 482	92 276 ± 21 556	216 368 ± 10 640
40 000	36 100 ± 2 458	97 887 ± 7 232	230 521 ± 22 151	119 437 ± 29 770

Tablo 4: Ekilen HUVEC'lerin Değişik Günlerde Elde Edilen Sayıları

HÜCRE PASAJI 3			
EKİLEN HÜCRE SAYISI	0-2 GÜN PDT (saat)	2-4 GÜN PDT (saat)	4-7 GÜN PDT (saat)
10 000	41.02	39.55	43.35
20 000	36.27	46.58	52.45
40 000	29.87	38.83	Populasyon yoğunluğu kuramı nedeniyle hesaplanamamıştır.

Tablo 5: HUVEC'lerin Sayılarının İki katına Çıkma Zamanları s (PDT)

Yapılan deneyler sonucunda hücre sayılarının iki katına çıktığı sürenin 36 saat olduğu bulunmuştur. 10 000 olarak ekilen hücrelerin, kuyuya seyrek yerleştiğinden büyümelerinin yavaş olduğundan dolayı PDT değerinin büyük olduğu, 40 000 ekilen hücrenin ise çabuk bir şekilde kuyuyu doldurduğundan 7. günde hücre sayısı çok düştüğü bulundu.



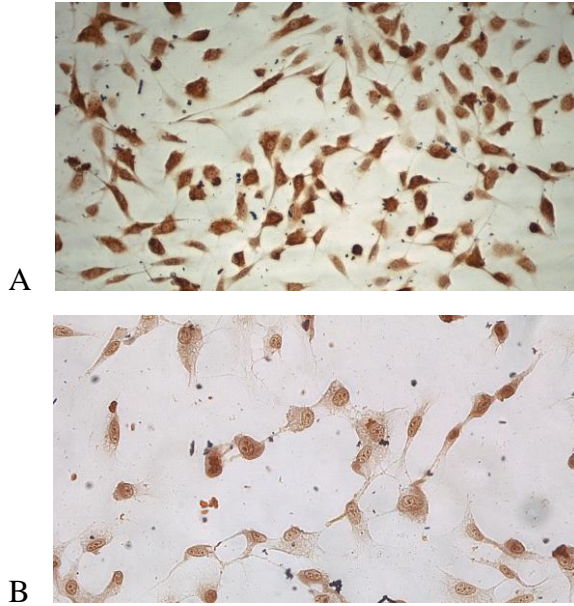
Şekil 9: HUVEC'lerin Büyüme Eğrisi.

6.2. HUVEC Kùltürlerinin İmmünohistokimya Yöntemi ile Karakterizasyonu

HUVEC'ler için von Willebrand faktör bir belirteç olarak kullanıldı (Pusztaszeri, Seelentag and Bomsan 2006). HUVEC'lerde bu proteinin varlığı immünohistokimyasal yöntem ile araştırıldı ve ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

İmmünohistokimya yöntemi için anti-von Willebrand antikoru, HUVEC'lerdeki von Willebrand proteinine bağlandı ve ikincil antikor bu birincil antikora bağlandı. Bu ikincil antikora bağlı olan horseradish peroksidaz enzimi ile ortama konulan DAB (3-3' Di amino benzidine) kimyasalı ile kahverengi bir renk oluştu ve bu HUVEC'ler bu renk ile karakterize edildi.

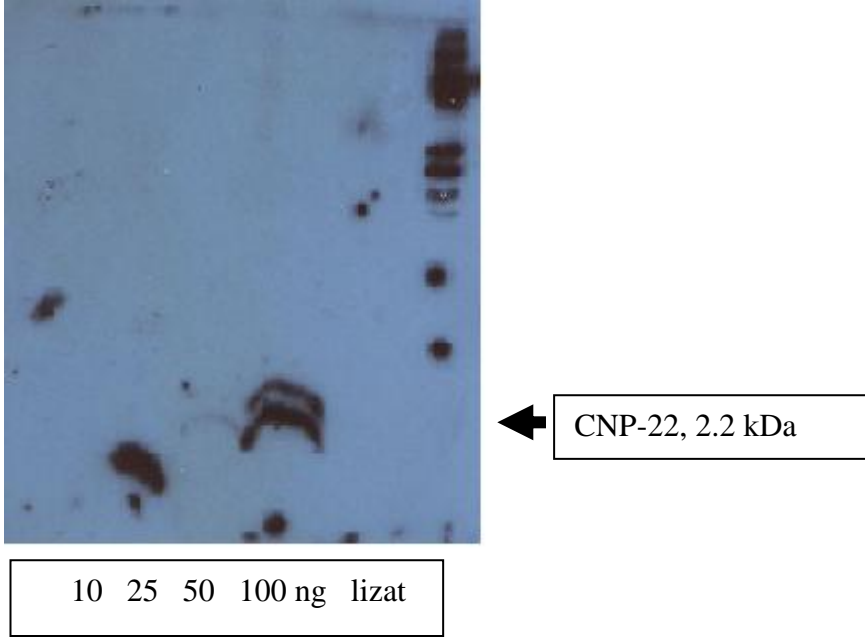
İmmünohistokimya deneyi sonucunda, bu tez çalışmalarında kullanılan HUVEC'lerin vWF ile boyandığı görülmüştür.



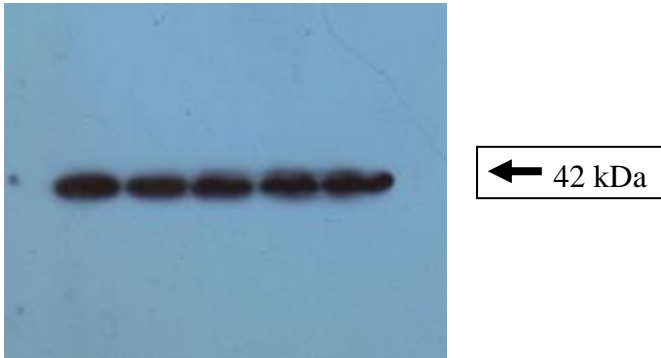
Resim 4: HUVEC'lerin vWF antikoru ile karakterizasyonu. A. Anti-vWF antikorusunun kullanıldığı hücre grubu. B. Anti-vWF antikorusunun kullanılmadığı hücre grubu

6.3. Anti-CNP Antikoru ile Western Blot Analizi

Western blot analizi, 40 µg protein lizatı ve kontrol olarak da Bachem firmasından satın alınan CNP-22 peptidi ve Anti-CNP ve Anti-Aktin antikoru kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan deney sonucunda CNP-22 antikoru ile 50 ng miktarında band görünmüştür. Lizatta CNP bandı görünmezken, aktin bandı görüldü.



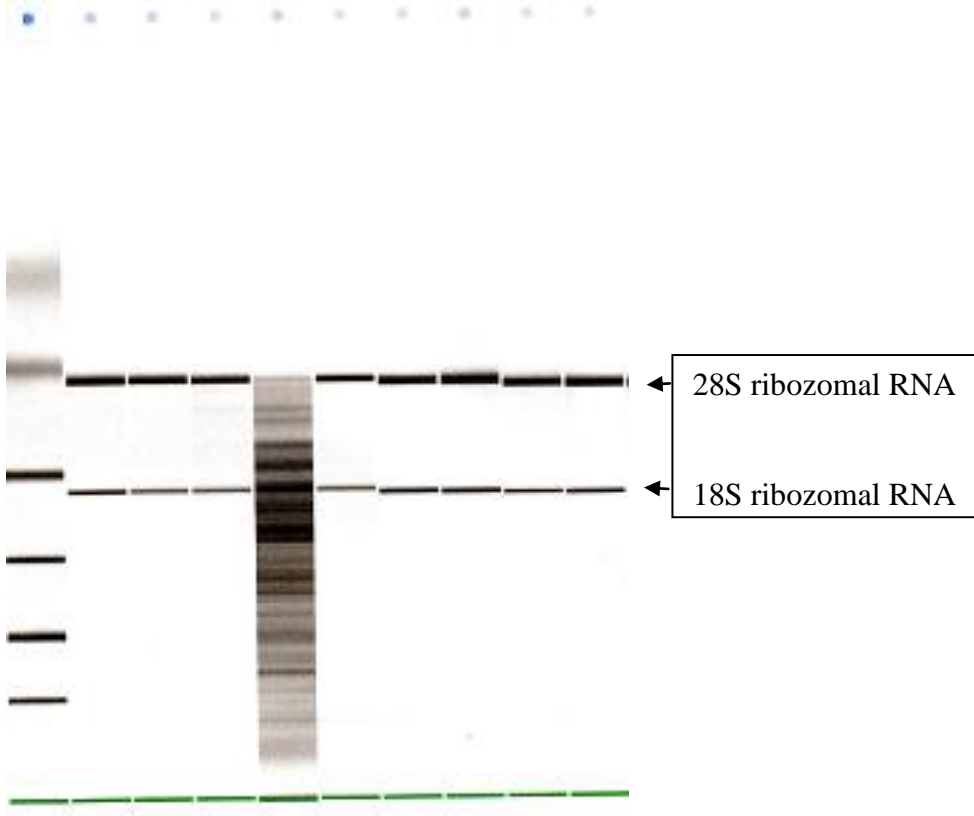
Resim 5. Anti CNP antikoru ile Western Blot Sonucu



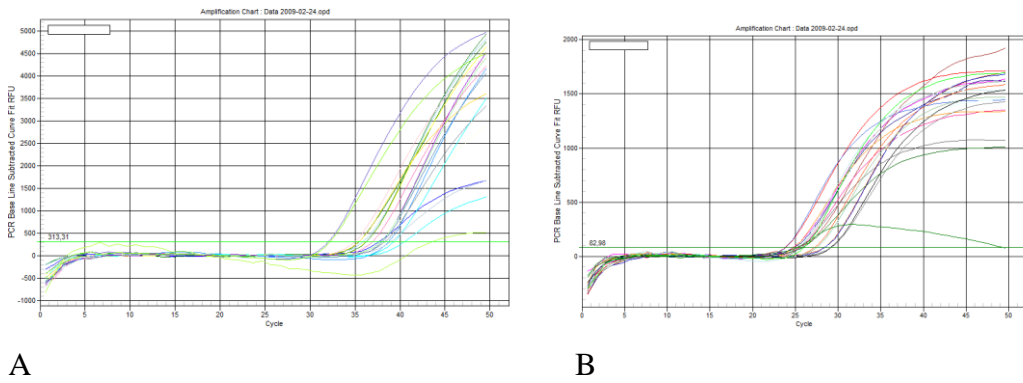
Resim 6. Anti Aktin antikoru ile Western Blot sonucu

6.4. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı PZR) ile C Tip Natriüretik Peptit Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde Analizi

Elde edilen total RNA miktarları Nanodrop™ cihazıyla ve RIN numaraları ise; Bioanalyzer 2100 cihazıyla ölçüldü ve sonuçları tablo 6'da görülmektedir. Gerçek zamanlı PZR sonuçları $2^{-\text{deltadelta Ct}}$ yöntemiyle gen ekspresyonu sonuçları elde edildi.



Resim 7. Bioanalyzer 2100 ile RNA kalitesinin analizi sonucu

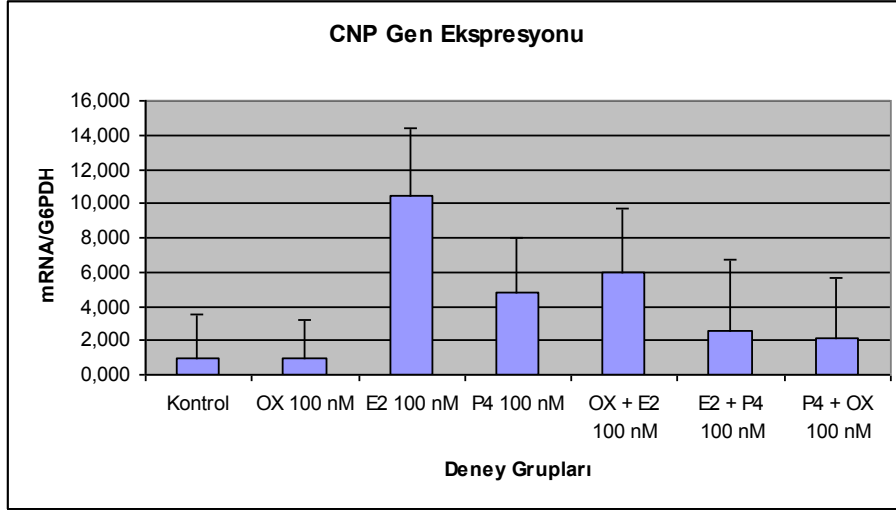


Resim 8. Gerçek zamanlı PZR sonuçları. A: CNP sonuçları; B: GAPDH sonuçları

Deney Grupları	RNA C. (ng/ul)	RIN
K1 12/07/08	195	9.2
K5 12/07/08	314	9.5
K6 12/07/08	167	9.2
Ox1 12/07/08	203	9.5
Ox5 12/07/08	228	8.6
Ox6 12/07/08	187	9.5
E(2) 1 12/07/08	230	8.8
E(2) 5 12/07/08	59	9.0
E(2) 6 12/07/08	238	9.8
P(4) 1 12/07/08	239	8.9
P(4) 5 12/07/08	228	9.7
P(4) 6 12/07//08	94	9.6
Ox + E(2) 1 12/07/08	191	6.6
Ox + E(2) 5 12/07/08	294	9.7
Ox + E(2) 6 12/07/08	322	6.7
E(2) + Prg 1 12/07/08	117	9.7
E(2) + Prg 5 12/07/08	383	7.8
E(2) + Prg 6 12/07/08	397	8.9
P(4) + Ox 1 12/07/08	335	9.2
P(4) + Ox 5 12/07/08	446	9.2
P(4) + Ox 6 12/07/08	502	10.0
E(2) + P(4) + Ox 1 12/07/08	143	9.8
E(2) + P(4) + Ox 5 12/07/08	309	10.0
E(2) + P(4) + Ox 6 12/07/08	415	9.8

Tablo 6. Total RNA konsantrasyonu ve RIN değerleri, K:Kontrol, (E2): Östrojen, Ox: Oksitosin, P(4): Progesteron

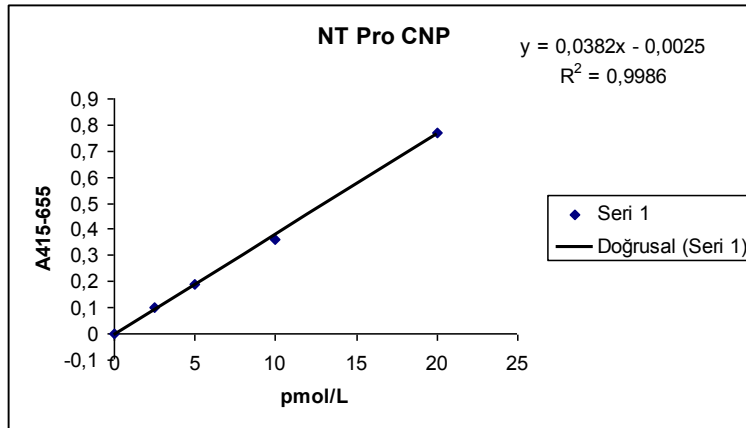
Elde edilen bu total RNA'lar cDNA'ya çevrilip, Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PCR) tekniği ile mRNA düzeyindeki ekspresyonlar ölçüldü. Bu deneyler triplike olarak büyütülen hücre büyütme kaplarından alınan hücrelerden elde edilen total RNA'lar ile elde edilen cDNA'lar duplike olarak çalışıldı.



Şekil 10. CNP geninin Gerçek Zamanlı PZR sonuçları

6.5. ELISA ile HUVEC'lerden Sekrete Olan C Tip Natriüretik Peptit Miktarının Ölçülmesi

ELISA kiti üçe bölünerek çalışmaya alındı. İlk çalışmada düzgün bir standart grafik elde edildi ve yapılan denemelerde östrojen ile 2 pmol/L, diğer hormonların kombinasyonlarında ise 0.5 pmol/L konsantrasyonlarında CNP peptidi tespit edildi. Fakat, kitin tamamı anlaşılamayan teknik sorunlar nedeniyle çalışmadığından, düzgün bir veri elde edilememiştir.



Şekil 11. CNP ELISA kiti standart grafiği

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda yapılan çalışmalarla CNP'nin, kan damarında bulunan düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon yaparak veya reseptörü aracılığıyla vazodilatasyona neden olduğu görülmüştür. CNP'nin, ayrıca trombosit agregasyonunu engelleyerek, NO salınımını arttırarak, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu baskılayarak enflamasyonda durdurucu etkisi bulunmaktadır (Qian et al 2002). Bu etkileriyle CNP, endotel kaynaklı anti aterosklerotik bir hormon olarak önem kazanmaktadır.

Bu araştırmada, Western blot yöntemiyle, östrojen, progesteron ve oksitosin gibi hormonların endotel hücre kültürlerinde, CNP'nin protein düzeyinde ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmak istenmiştir. Western blot deneylerinde, Bachem marka CNP peptidi için en düşük tayin edilebilir düzey 50 ng olarak tespit edilmiştir. Araştırmamızda 40 µg total proteini içeren hücre lizatlarında yapılan Western blot çalışmasında CNP bantları gözlenememiştir. Bunun nedeni CNP miktarının 40 µg hücre total lizatında 50 ng altında bulunması veya sentezlendiğinde depo edilmeden derhal salınması olabilir.

Endotel kültür ortamlarında ELISA yöntemi ile CNP düzeyleri ölçülmeye çalışılmış nedeni anlaşılamayan teknik sorunlar nedeniyle sonuç alınamamıştır.

Araştırmamızda, endotel hücrelerinde CNP ekspresyonundaki değişiklikler, gerçek zamanlı PZR tekniği kullanılarak ölçülebilmıştır. Östrojen ve progesteronla inkübe edilen HUVEC'lerde CNP ekspresyonunda artışlar tespit edilmiştir. Ancak oksitosin ile inkübasyon sonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Endotel hücre kültürlerinde, CNP transkriptlerinin kopya sayısı çok az olduğu için, standart sapma değerlerimiz yüksek bulunmuştur. Peltonen ve arkadaşları, CNP'nin 2007 yılında aort kapaklarında mRNA ekspresyonunu inceledikleri çalışmalarında standart sapma değerlerini yüksek bulmuşlardır. Araştırmamız, gerçek zamanlı PZR tekniği kullanılarak CNP ekspresyonu düzeylerinin endotel hücrelerinde ölçüldüğü ilk çalışmadır. Ayrıca östrojen, progesteron ve oksitosin gibi hormonların CNP sentezi üzerindeki etkilerini araştıran ilk çalışmadır.

HUVEC kültürlerine uygulanan hormonlar içerisinde östrojenin CNP ekspresyonunu arttırıcı etkisi, progesterona göre yüksek bulunmuştur. Daha önce fare uterusunda yapılan bir araştırmada, östrojenin CNP ekspresyonunun arttırdığı gösterilmiştir. Östroza girmeyen farelerde ise, CNP transkriptleri uterusunda bulunamamıştır (Acuff et al 1997). Östrojenin natriüretik peptitler üzerine etkisinin gösteren bir başka çalışmada, postmenapoz dönemde, östrojen replasman tedavisi uygulanan kadınlarda NT-proBNP seviyesinin yükseldiği görülmüştür. Ancak, CNP üzerindeki etkileri incelenmemiştir. (Karjalainen et al 2004).

Östrojenin, *in vivo* ve *in vitro* olarak NO'yu arttırdığı bilinmektedir. Östrojenin damar sağlığı üzerinde etkilerini NO üzerinden yaptığı düşünülmektedirken, bu araştırmamızla östrojenin CNP'yi arttırıyor olması, östrojenin NO'den başka, CNP aracılığı ile de damar sağlığı üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir (Goligorsky 2000).

Progesteron, yaptığımız bu çalışmada CNP ekspresyonunu arttırmıştır fakat östrojene göre etkisi daha azdır. Progesteronun, koyun endometrium kesitlerinde yapılan deneylerde vazokonstriktör olarak bilinen prostaglandin 2 α 'nın salınımının azaltması (Bishop and Stormshak 2006), sıçan aorta kesitlerinde NO seviyesini arttırması (Cutini, Sellés, Massheimer 2009) ve sığır aortik endotel hücrelerinde ET-1 salınımını azaltması (Morey, Razandi, Pedram, Prins and Levin 1998) bu hormonun, damar üzerinde vazodilatör etkisi olduğunu göstermektedir. Progesteronla inkübe edilen Chinese Hamster Ovary (CHO) hücrelerinde NO artması, bu hücrelerde meydana gelen $[Ca^{2+}]_i$ artışının NO salgıladığına dair bir kanıt olarak sunulmuştur (Ashley, Clay, Farmerie, Niswender and Nett 2006). Progesteron, hamilelikte uterus kaslarının kasılmasını durdurarak erken doğumu engellemekte ve hamileliğin sağlıklı olarak devam etmesine yardımcı olmaktadır. Progesteron, oksitosinin reseptörüne bağlanmasını engelleyerek gebelik boyunca uterus kasılmasını durdurmakta, gebelik süresinin sonunda progesteron seviyesinin düşmesiyle doğum başlamaktadır. Progesteron, bu yolla da kaslar üzerinde bir gevşeme etkisi yapmaktadır (Omar, Ramirez, Tracy, Glover and Gibson 1998). Bizim çalışmamızda, progesteronun

CNP'yi arttırması, bu hormonun vazodilatatif etkisine CNP'nin de katkıda bulunabileceğini göstermiştir.

Oksitosin damarlardaki sıvı artışına bağlı olarak ve hipotalamustan salınarak kalpten ANP üretimi arttıran, natriüretik etki yapan bir nörohipofiz peptittir. Oksitosinin ANP salınımından sorumlu olduğu, oksitosin verilen perfüze sıçan kalplerinde gösterilmiştir. Bu deneyde, oksitosin reseptörü antagonistleri kullanılığında ANP salınımında azalma görülmesi, kalp içi bir oksitosin sisteminin olduğunu göstermiştir (Costa-e-Sousa et al 2005). ANP ve BNP'nin de natriüretik ve diüretik etkilerle kan hacmini azaltarak tansiyon üzerinde olumlu etkileri vardır. Sığır aort hücre kültüründe yapılan çalışmada, ANP ve BNP'nin CNP ekspresyonunu 400 kata kadar arttırdığı görülmüştür (Nazarino et al 1995). Oksitosinin, endotel hücrelerinde ANP ve BNP üretimini arttırıp arttırmadığı bilinmemektedir. Dolayısıyla bu hormonların da endotelyumda CNP ekspresyonu üzerinde etkilerinin olup olmadığı veya oksitosinin direk olarak CNP ekspresyonu üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında oksitosinin, HUVEC kültüründe CNP ekspresyonu üzerinde etkisi araştırılmıştır. Kısıtlı sayıdaki deneyler sonunda, oksitosinin CNP ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmadığı görülmüştür. Fakat, yapılan bu kültürlerde eşzamanlı olarak ANP ve BNP miktarlarına bakılmadığı için oksitosinin ANP ve BNP üzerindeki etkileri de bu çalışmada incelenmemiştir.

Literatürde, CNP'nin ekspresyonunun, LPS, TNF- α , IL-1 gibi enflamatuvar ajanlar ve iskemi, shear stres gibi patolojiler tarafından arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, aynı natriüretik peptit aile üyesi olan ANP ve BNP'de CNP ekspresyonunu endotelde arttırdığı bildirilmiştir. Yaptığımız bu araştırmayla, oksitosinin ANP aracılı olarak beklenen CNP ekspresyonunu artırması gözlenmemiştir. Ancak östrojen ve progesteronun CNP ekspresyonu üzerinde arttırıcı etkisi olduğunu gösterilmiştir.

Bu tez araştırmasında, östrojen, progesteron ve östrojen tek tek verilmesinin yanında kombinasyonlar halinde de verilmiştir. Bulgularımız hormon kombinasyonlarının tek başına hormonlara göre CNP ekspresyonunu daha az etkilediğini göstermektedir. Yani sinerjik bir etki gözlenmemiştir. Örneğin, oksitosin östrojen ile beraber

verildiğinde tek başına östrojene göre daha az CNP ekspresyonu artışı gözlenmiştir. Aynı şekilde oksitosinin varlığı progesteronun tek başına uyardığı CNP artışını baskılamış görünmektedir. Literatürde gerek östrojenin oksitosin etkilerini, gerekse oksitosinin östrojen etkileri modüle ettiğine dair bulgular bulunmaktadır. Benzer şekilde progesteron ve oksitosin arasındada etkileşimlerin bulunduğu dair bulgular vardır. Ama henüz bu etkileşimler net olarak anlaşılmış değildir.

Östrojen, oksitosin sisteminin en önemli uyarandır. Ovaryumu alınan farelerde oksitosin reseptörünün seviyesinin uterusda düştüğü ve östrojen takviyesi ile oksitosin reseptörünün seviyesinin yükseldiği görülmüştür (Ivell, Walther 1999). Bu deney östrojenin oksitosin sistemi üzerinde bir modülatör olduğunu göstermektedir. Endotel hücrelerine oksitosin verildiğinde, NO ürettiği ve damarlarda gevşeme meydana getirmektedir (Thibonnier et al 1999). Östrojende, oksitosin sistemi tarafından üretilen NO miktarını arttırabilir ve oksitosinin vazodilatatif etkisine katkıda bulunabilir.

Östrojen verilerek yapılan *in vivo* damarlarda oksitosin ve oksitosin reseptörünün ekspresyonunda artışlar kaydedilmiştir (Gutkowska et al 2000).

MCF-7 hücrelerinde, oksitosin verildiğinde östrojenin mitozu uyarıcı etkisini durdurduğu ve reseptörlerinin sayısını azalttığı gösterilmiştir (Yamamoto, Carter and Cushing 2006).

Progesteronun da oksitosin sistemini uyardığı, sığır granulaza hücre kültüründe yapılan çalışmayla anlaşılmıştır. Progesteron verilen bu hücrelerde oksitosin salınımının arttığı tespit edilmiştir (Voss and Fortune 1993). Buna mukabil progesteronun oksitosinin etkilerini reseptörüne bağlanmasını engelliyerek baskıladığına dair de bulgular bulunmaktadır.

Bizim sonuçlarımızda bu hormonların birbirini etkilediğini ispatlamaktadır. Oksitosinin, östrojen ve progesteronun CNP ekspresyonu üzerindeki uyarıcı etkisini baskıladığını göstermektedir. Ancak bu etkileşimin mekanizmasının aydınlatılması için daha çok deneylere gerek vardır. Literatürde bulunan kısıtlı sayıdaki

araştırmalarla bu konuda yorum yapmak mümkün değildir. Bu konunun aydınlatılması ve CNP sentezinin ve salgılanmasının mekanizmasının anlaşılması damar sağlığı açısından çok önem taşımaktadır.

8. KAYNAKLAR

Abassia Z, Karramb T, Ellahamc S, Winavera J, Hoffmanb A. (2004). Implications of the natriuretic peptide system in the pathogenesis of heart failure: diagnostic and therapeutic importance. *Pharmacology & Therapeutics*, 102:223– 241.

Acuff CG, Huang H and Steinhelper ME. (1997). Estradiol induces C-type natriuretic peptide gene expression in mouse uterus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 273:2672-2677.

Ahluwalia A and Hobbs AJ. (2005). Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 26(3):162-67.

Alderton WA, Cooperton CE and Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 357:593-615.

Ashley RL, Clay CM, Farmerie TA, Niswender GD, and Nett TM. (2006). Cloning and characterization of an ovine intracellular seven transmembrane receptor for progesterone that mediates calcium mobilization. *Endocrinology*, 147(9):4151–4159.

Baek KJ, Kwon NS, Lee HS, Kim MS, Muralidhar P and Im MM. (1996). Oxytocin receptor couples to the 80 kDa G α family protein in human myometrium. *Biochem. J.*, 315:739-744.

Baker L, Meldrum KK, Wang M, Sankula R, Vanam R, Raiesdana A, Tsai B, Hile K, Brown JW and Meldrum DR. (2003). The role of estrogen in cardiovascular disease. *Journal of Surgical Research*, 115:325–344.

Barber MN, Gaspari TA, Kairuz EM, Dusting GJ and Woods RL. (2005). Atrial natriuretic peptide preserves endothelial function during intimal hyperplasia. *J. of Vascular Research*, 42:101-110.

- Barton M, Bény JL, d'Uscio LV, Wyss T, Noll G and Lüscher TF. (1998). Endothelium-independent relaxation and hyperpolarization to C-type natriuretic peptide in porcine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 31:377–383.
- Bishop CV and Stormshak. (2007). Non-genomic actions of progesterone and estrogens in regulating reproductive events in domestic animals. *The Veterinary J*, 176(3):270-280.
- Bishop CV and Stormshak F. (2006). Nongenomic Action of Progesterone Inhibits Oxytocin-Induced Phosphoinositide Hydrolysis and Prostaglandin F2 Secretion in the Ovine Endometrium. (2006). *Endocrinology*, 147(2):937–942.
- Bold MLK. (1999). Estrogen, natriuretic peptides and the renin–angiotensin system. *Cardiovascular Research*, 41:524-531.
- Burley DS, Ferdinandy P and Baxter GF. (2007). Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *British Journal of Pharmacology*, 152:855–869.
- Burbach JPH, Young LJ and Russell JA. (2006). Oxytocin: synthesis, secretion, and reproductive functions. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Third Edition, Edited by Jimmy D. Neill, Elsevier.
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP and Weiner CP. (2000). Molecular mechanism of cGMP-Mediated Smooth Muscle Relaxation. *Journal of Cellular Physiology*, 184:409-420.
- Cattaneo MG, Chini B and Vicentini LM. (2008). Oxytocin stimulates migration and invasion in human endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*, 153:728-736.

Cho MM, Ziats NP, Pal D, Utian WH and Gorodeski GI. (1999). Estrogen modulates paracellular permeability of human endothelial cells by eNOS- and iNOS-related mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*, 276:337-349.

Coats P, Johnston F, MacDonald J, McMurray JJV and Hillier C. (2001). Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor identification and mechanisms of action in human subcutaneous resistance arteries. *Circulation*, 103:1702-1708.

Costa MA, Elesgaray R, Canifi C, Fellet A and Arranz C. (2007). Role of cardiovascular nitric oxide system in C-type natriuretic peptide effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359:180-186.

Costa-e-Sousa RH, Pereira-Junior PP, Oliveira PF, Olivares EL, Werneck-de-Castro JPS, Mello DB, Nascimento JHM and Campos-de-Carvalho AC. (2005). Cardiac effects of oxytocin: Is there a role for this peptide in cardiovascular homeostasis?. *Regulatory Peptides*, 132(1-3):107-112.

Cutini P, Sellés J and Massheimer V. (2009). Cross-talk between rapid and long term effects of progesterone on vascular tissue. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 115(1-2):26-43.

Edwards PD., (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu. Rev. Physiol.*, 67:335-76.

Fang X, Wong S and Mitchell BF. (1996). Relationships among sex steroids, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation and at parturition. *Endocrinology*, 137(8):3213-3219.

Fischer-Rusmussen W. (1971). Plasma oestone (and oestradiol) in normal pregnancy. *J Steroid Biochem*, 2:371.

Fe'le'tou M. and Vanhoutte M. (2006). Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor where are we now?. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26:1215-1225.

Fleige S and Pfaffl MW. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27:126–139.

Galley HF and Webster NR. (2004). Physiology of endothelium. *British Journal of Anaesthesia*, 93(1):105-13.

Geisler J. (2003). Breast cancer tissue estrogens and their manipulation with aromatase inhibitors and inactivators. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86(3-5):245-253.

Gimpl G, Wiegand V, Burger K and Fahrenholz F. (2002). Cholesterol and steroid hormones: modulators of oxytocin receptor function. *Progress in Brain Research*, 139:43-54)

Gimpl G and Fahrenholz F. (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*, 81(2): 629-683.

Goligorsky MS. (2000). Endothelial cell dysfunction and nitric oxide synthase. *Kidney International*, (58):1360–1376.

Grazzini E, Guillon G, Mouillac B and Zingg HH. (1998). Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature*, 392(2):509-512.

Griffith TM. (2004). Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis?. *British Journal of Pharmacology*, 141:881–903.

Gutkowska J, Jankowski M, Mukaddam-Daher S and McCann SM. (2000). Oxytocin is a cardiovascular hormone. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, 33: 625-633

Han B and Hasin Y. (2003) . Cardiovascular effects of natriuretic peptides and their interrelation with endothelin-1. *Cardiovasc Drugs Ther*, 17(1):41–52.

Hess RA, Bunick D, Lee K, Bahr J, Taylor JA, Korach KS and Lubahn DB. (1997). Arole for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, 390(4):509-12.

Honing MLH, Smits P, Morrison PJ, Burnett JC and Rabelink TJ. (2001). C-type natriuretic peptide–induced vasodilation is dependent on hyperpolarization in human forearm resistance vessels. *Hypertension*, 37:1179-1183.

Ivell R and Walther N. (1999). The role of sex steroids in the oxytocin hormone system. *Mol and Cel Endocrinoloji*, 151:95-101.

Jankowski M, Wang D, Hajjar F, Mukaddam-Daher S, McCann SM and Gutkowska J. (2000). Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11):6207–6211.

Karjalainen AH, Ruskoaho H, Vuolteenaho O, Heikkinen JE, Bäckström A, Savolainen MJ and Kesäniemi YA. (2004). Effects of estrogen replacement therapy on natriuretic peptides and blood pressure. *Maturitas*, 47:201-208.

Kim KH and Bender JR. (2005). Rapid, Estrogen Receptor–Mediated Signaling: Why Is the Endothelium So Special? *Science*, 288:pe28.

Koh KK. (2002). Effects of estrogen on the vascular wall: vasomotor function and inflammation. *Cardiovascular Research*, 55:714-26.

Koledova VV and Khalil RA. (2007). Sex hormone replacement therapy and modulation of vascular function in cardiovascular disease. *Expert Rev. Cardovasc. Ther.*, 5(4):1-13.

Kone BC. (2001). Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*, 51:429-41.

Lavallee M, Takamura M, Parent R, Thorin E. (2001). Crosstalk between endothelin and nitric oxide in the control of vascular tone. *Heart Fail Rev*, 6: 265-76.

Luksha L, Agewall S and Kublickiene K. (2009). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 202:330-334.

Manchenko GP. (2003). Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels. 2nd ed, CRC Pres, Florida, USA, s. 16.

Manuel Mas. (2009). A close look at the endothelium:its role in the regulation of vasomotor tone. *European Association of Urology*, 48-57.

Mattiasson I, Rendell M, Törnquist C, Jeppsson S and Hulthén UL. (2002). Effects of estrogen replacement therapy on abdominal fat compartments as related to glucose and lipid metabolism in early postmenopausal women. *Horm Metab Res*, 34: 583-588.

Maciag T, Cerundolo J, Ilsley S, Kelley PR and Forand R. (1979). An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (76): 5674-5678.

Morey AK, Razandi M, Pedram A, Hu R, Prins BA and Levin ER. (1998). Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. *Biochem J.*, 330, 1097-1105.

Moro C and Berlan M. (2006). Cardiovascular and metabolic effects of natriuretic peptides. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 20: 41-49.

Mukaddam-Daher S, Jankowski M, Wang D, Menaouar A and Gutkowska J. (2002). Regulation of cardiac oxytocin system and natriuretic peptide during rat gestation and postpartum. *J. of Endocrinology*, 211-16.

Munagala VK, Burnett JC and Redfield MM. (2004). The natriuretic peptides in cardiovascular disease. *Curr Probl Cardiol*, 29:707-769.

Murad F. (2006). Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *The New England Journal of Medicine*, 355 (19):2003-2011.

Nazario B, Hu RM, Pedram A, Prins B and Levin ER. (1995). Atrial and Brain natriuretic peptides stimulate the production and secretion of C-type natriuretic peptide from bovine aortic endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 95:1151-1157.

Nir A. (2007). ABCs of natriuretic Peptides: Cardiac Aspects. *Hormone Research*, 67:77-80.

Omar HA, Ramirez R, Tracy JAT, Glover D and Gibson M. (1998). Reduction of the human placental vascular relaxation to progesterone by gestational diabetes. *J Matern Fetal Invest*, 8:27–30.

Orshal JM and Khalil RA. (2004). Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 286:233-249.

Pagel-Langenickel I, Buttgerit J, Bader M and Langenickel TH. (2007). Natriuretic peptide receptor B signaling in the cardiovascular system: protection from cardiac hypertrophy. *J Mol Med*, 85:797–810.

Parmar KM, Nambudiri V, Dai G, Larman HB, Gimbrone MA and Carden GG. (2005). Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(29):26714–26719.

Peltonen TO, Taskinen P, Soini Y, Rysä J, Ronkainen J, Ohtonen P, Sata J, Juvonen T, Ruskoaho H and Leskinen H. (2007). Distinct downregulation of C-type natriuretic peptide system in human aortic valve stenosis. *Circulation*, 116:1283-1289.

Piechota M, Banach M, Jacon A and Rysz J. (2007). Natriuretic peptides in cardiovascular diseases. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 13(2):155-181.

Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TJ, Sklar LA and Hathaway HJ. (2008). Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu. Rev. Physiol*, 70:165-90.

Potter LR, Abbey-Hosch S and Dickey DM. (2006). Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocrine Reviews*, 27(1):47-72.

Pournajafi-Nazarloo H, Perry A, Partoo L, Papademetriou E, Azizi F, Carter CS and Cushing BS. (2007). Neonatal oxytocin treatment modulates oxytocin receptor, atrial natriuretic peptide, nitric oxide synthase and estrogen receptor mRNAs expression in rat heart. *Peptides*, 28:1170-1177.

Prickett TCR, Yandle TG, Nicholls MG, Espiner EA and Richards AM. (2001). Identification of Amino-Terminal Pro-C-Type Natriuretic Peptide in Human Plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286, 513-517.

Pusztaszeri M, Chaubert P and Bomsan FT. (2006). Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and FLI-1 in normal human tissues. *J. of Histochemistry & Cytochemistry*, 54 (4): 385-395.

Radomski MW, Palmer RM and Moncada S. (1987). The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 92: 639-46.

- Qian J, Haruno A, Asada Y, Nishida T, Saito Y, Matsuda T and Ueno H. (2002). Local expression of C-type natriuretic peptide suppresses inflammation, eliminates shear stress–induced thrombosis, and prevents neointima formation through enhanced nitric oxide production in rabbit injured carotid arteries. *Circulation Res.*, 91:1063-1069.
- Ry SD, Passino C, Emdin M, Giannessi D. (2006). C-type natriuretic peptide and heart failure, *Pharmacological Res.*, 54:326-333.
- Ry SD, Giannessi D, Maltinti M, Prontera C, Iervasi A, Colotti C, Emdin M, L'Abbate A and Neglia D. (2007). Increased levels of C-type natriuretic peptide in patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Peptides*, 28:1068-73.
- Sandow SL and Tare M. (2007). C-Type natriuretic peptide: A new endothelium-derived hyperpolarizing factor? *TRENDS in Pharmacological Sciences*, (28) 2: 61-67.
- Schagger H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, (1) 1: 16-22.
- Scotland RS, Ahluwalia A and Hobbs AJ. (2005). C-Type Natriuretic Peptide in vascular physiology and disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 105:85-93.
- Sprague AH and Khalil RA. (2009). Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, baskıda.
- Şahin Ahmet. Gebelik Döneminde Laboratuvar Testleri, GVNTIP Laboratuvarları Hizmetiçi Eğitim Notları, 2008.
- Thibonnier M, Conarty D, Preston JA, Plesnicher C, Dweik RA and Erzurum SC. (1999). Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. *Endocrinology*, 140: 1301–1309.

Valbuena G and Walker DH. (2006). The endothelium as a target for infections. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1:171–98.

Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC and Feletou M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica*, baskıda.

Vázquez F, Manzanique JC, Lydon JP, Edwards DP, O'Malley BW and Arispe ML. (1999). Progesterone Regulates Proliferation of Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(4):2185-2192.

Voss AK and Fortune JE. (1993). Estradiol-17 beta has a biphasic effect on oxytocin secretion by bovine granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 48:1404-1409.

Wang D, Gutkowska J, Marcinkiewicz M, Rachelska G and Jankowski M. (2003). Genistein supplementation stimulates the oxytocin system in the aorta of ovariectomized rats. *Cardiovascular Research*, 57:186-194.

Wu C, Wu F, Pan J, Morser J and Wu Q. (2003). Furin-mediated Processing of Pro-C-type Natriuretic Peptide. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(28):25847-25852.

Yamamoto Y, Carter S and Cushing S. (2006). Neonatal manipulation of oxytocin affects expression of estrogen receptor alpha. *Neuroscience*, 137 157–164.

9. EK-1:

KULLANILAN CİHAZLARIN LİSTESİ

Real Time PCR Cihazı (IQ5 Biorad, USA), Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA), Ters mikroskop (Nikon Japonya), Laminar flow (Labconco, USA), CO₂ İnkübatör, Nuair (USA), Su Saflaştırma Cihazı (PureLab Plus USF Elga, Almanya), Santrifüj (Heraeus-Biofuge), Su banyosu (Techne, Almanya), pH metre (Corning, USA), Hassas Terazî (Sartorius, Japonya), Manyetik karıştırıcı (Elektro-Mag, Türkiye) Otoklav (SİGMA, Almanya), Vortex (Elektro-mag, Türkiye), Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, USA), NOA Sievers 280i, (USA) Buzdolabı, Arçelik (Türkiye), Derin Dondurucu (- 20⁰ C, Bosch, Türkiye), Derin Dondurucu (-80⁰ C, Snijders, Hollanda), Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA), PCR Cihazı (Techne, USA)

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ömer	Soyadı	Kaçar
Doğum Yeri	Sincanlı	Doğum Tarihi	29.01.1977
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	22306177682
E-mail	kacaromer@yahoo.com	Tel	0 555 647 38 45

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Önlisans : Marmara Üniversitesi SHMYO Tıbbi Lab (1996) / Lisans : Anadolu Üniversitesi İktisat Fakültesi (2002)	2002
Lise	Pendik Lisesi	1993

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Teknisyen	TÜBİTAK MAM	12
2.	Teknisyen	International Hospital	1
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	Orta

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	75							

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS:

International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	74	72	71
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows	İyi
Microsoft Office	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer

11. ETİK KURUL ONAYI

EK 3

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ömer Kaçar

EK 2

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : Biyokimya (Tıp Fakültesi)

Tez Sahibi : Ömer Kaçar

Tez Başlığı : Endotel Hücrelerde Oksitosinin ve Seks Hormonlarının (Östrojen, Progesteron) C Tip Natriüretik Peptid Sentezi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD

Sınav Tarihi : 12 Ağustos 2009 Saat: 10:00

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Kurumu	İmza
Prof. Dr. A. Serpil Bilsel	Biyokimya ABD (Tıp Fakültesi)	
Sınav Jüri Üyeleri		İmza
Prof. Dr. Ayşe Özer	Tıbbi Biyoloji ABD (Tıp Fakültesi)	
Doç. Dr. Kemal Baysal	TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Sevim ROLLAS

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

THESIS APPROVAL

Institute: Marmara University Institute of Health Sciences

Level of Programme: Master (X) Doctorate ()

Department: Faculty of Medicine, Dept. of Biochemistry

Student: Ömer Kaçar

Title of the Thesis: Investigation of Oxytocin and Sex Hormones (Estrogen and Progesterone) Effects on C Type Natriuretic Peptide Synthesis in Endothelial Cells

Examination Place: University of Marmara, Faculty of Medicine, Dept. Of Biochemistry

Examination Date: 12th August 2009

We have investigated the present thesis by means of content and quality and have approved as a master/doctorate thesis.

Supervisor	Institution	Signature
Prof. Dr. Serpil Bilsel	University of Marmara, Faculty of Medicine, Dept. of Biochem.	

Members of Examination Jury	Institution	Signature
Prof. Dr. Ayşe Özer	University of Marmara, Faculty of Medicine, Dept. of Biochem. Medicinal Biology	
Assoc. Prof. Dr. Kemal Baysal	TUBITAK, Genetic Engineering and Biotechnology Inst.	

The above examining jury decision have been approved by Institute of administrative board decision withdated and numbered.

Prof. Dr. Sevim ROLLAS

Director of Institute of Health Sciences