

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOTEL HÜCRE HATTINDA HOMOSİSTEİN HASARINA
KARŞI MELATONİN VE ALFA TOKOFEROLÜN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gürkan AYKUTOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ekrem ATALAN

BİNGÖL-2017

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOTEL HÜCRE HATTINDA HOMOSİSTEİN HASARINA
KARŞI MELATONİN VE ALFA TOKOFEROLÜN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI


YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gürkan AYKUTOĞLU

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 03.01.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

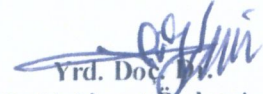
Prof. Dr.
Ekrem Atalan
Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr.
Bülent Kaya
Üye



Yrd. Doç. Dr.
Fethi Ahmet Özdemir
Üye



Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim Y. ERDOĞAN

Enstitü Müdürü



ÖNSÖZ

Tez çalışmaları süresince yardımlarını ve bilgi birikimini esirgemeyen, çalışmaların tamamlanabilmesi için gerekli desteği veren önceki danışmanım Prof. Dr. Gıyasettin Baydaş'a, tez çalışmamı tamamlamamda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ekrem Atalan'a, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Bülent Kaya'ya, Yrd. Doç. Dr. Fethi Ahmet Özdemir'e, bölüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Ayşe Aykutoğlu'na teşekkür ederim.

Gürkan AYKUTOĞLU

Bingöl 2017

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	5
3.1. Materyal.....	
3.2. Yöntem.....	5
3.2.1. Hücre Kültürü.....	5
3.2.2. Ajan Uygulama.....	5
3.2.3. WST-1 assay ile hücre canlılığı analizi.....	6
3.2.4. Lipid Peroksidasyonu Analizi.....	6
3.2.5. Reaktif Oksijen Türevleri Analizi.....	6
3.2.6. Hücre Göçü Analizi.....	7
3.2.7. In Situ Apoptoz Deteksiyonu: TUNEL Assay.....	7
3.2.8. DNA Fragmentasyonu Analizi.....	7
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	8
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	16
KAYNAKLAR.....	17
ÖZGEÇMİŞ.....	20

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Mel	: Melatonin
Vit E	: Vitamin E
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	: Ribo Nükleik Asit
m RNA	: Mesajcı RiboNükleikAsit
HUVEC	: İnsan Umbilikal kord endotel hücreleri
LPO	: Lipid Peroksidasyonu
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
Hcy	: Homosistein
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
EBM	: Endotel Büyüme Medyumu
PBS	: Fosfat Tampon Salin Solusyonu
WST-1	: Suda Çözünebilen Tetrazolyum Tuzu
DCFH-DA	: 2'-7' - Diklorodihidrofloresin diasetat
FKF	: Fetal Kalf Serummu
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
EtBr	: Etidyum Bromür
UV	: Ultra Viole
μ M	: Mikro molar
mM	: Mili molar
OD	: Optical density
FI	: Florasan şiddeti
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
RFU	: Relatif florasan ünit
TdT	: Terminal deoxynucleotidyl transferase
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Homosistein	2
Şekil 1.2.	Homosistein yolağı.....	2
Şekil 1.3.	Melatonin hormonunun yapısı.	3
Şekil 1.4.	Alfa tokoferolün yapısı.....	4
Şekil 4.1.1.	WST-1 assay grafiğı.....	9
Şekil 4.1.2.	LPO grafiğı.....	10
Şekil 4.1.3.	ROS grafiğı.....	10
Şekil 4.1.4.	Hücre göçü grafiğı.....	11
Şekil 4.1.5.1.	TUNEL assay grafiğı.....	11
Şekil 4.1.5.2.	Kontrol grubu TUNEL assay görüntüsü.....	12
Şekil 4.1.5.3.	Hcy grubu TUNEL assay görüntüsü	12
Şekil 4.1.5.4.	Hcy+Mel grubu TUNEL assay görüntüsü.....	13
Şekil 4.1.5.5.	Hcy+Vit E grubu TUNEL assay görüntüsü.....	13
Şekil 4.1.5.6.	Hcy+Mel+Vit E grubu TUNEL assay görüntüsü.....	14
Şekil 4.1.6.	Genomik DNA agaroz jel görüntüsü.....	14

ENDOTEL HÜCRE HATTINDA HOMOSİSTEİN HASARINA KARŞI MELATONİN VE ALFA TOKOFEROLÜN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada *in vitro* koşullarda homosistein kullanılarak oluşturulan oksidatif hasara karşı antioksidan moleküller olan melatonin ve alfa tokoferolün ayrı ayrı ve birlikte insan umbilikal kord endotel hücreleri üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Hücre canlılığı analizi sonucuna göre 1 mM homosistein eklenmesi hücrelerin canlılık oranını azaltırken, 10 µM melatonin ve 50 µM alfa tokoferolün homosisteinle beraber eklenmesi homosisteinin etkisini azaltarak hücre canlılığını istatistiksel olarak önemli oranda arttırmıştır. Ayrıca homosistein hücrelerde oksidatif stres göstergesi olan lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen türevleri miktarını, apoptoza uğrayan hücrelerin sayısını ve DNA fragmentasyonunu istatistiksel olarak önemli oranda artırırken homosisteinle beraber melatonin ve alfa tokoferolün eklenmesi belirtilen parametleri önemli oranda düşürmüştür. Homosistein hücre göçünü azaltırken homosisteinle beraber melatonin ve alfa tokoferolün eklenmesi hücre göçünü arttırmıştır. Bu sonuçlardan melatonin ve alfa tokoferolün insan endotel hücreleri için oksidatif stresi azaltan ve apoptoza karşı koruyucu güçlü antioksidan moleküller olduğu fakat birlikte eklenmelerinin antioksidan etkilerini arttırmadığı sonucu çıkarıldı.

Anahtar Kelimeler: Homosistein, melatonin, alfa tokoferol, HUVEC, apoptoz.

INVESTIGATION OF MELATONIN AND ALPHA TOCOFEROL EFFECTS ON ENDOTHELIAL CELLS STRESSED BY HOMOCYSTEINE

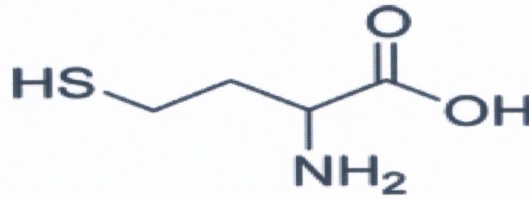
ABSTRACT

In this study, antioksidant effects of melatonin and alpha tocopherol against oxidative stress induced by homocysteine in human umbilical cord vein endothelial cells has been evaluated *in vitro* conditions. According to the results, 1 mM homocysteine decreased cell viability. Addition of 10 μ M melatonin and 50 μ M alpha tocopherol with homocysteine increased cell viability. Homocysteine addition increased lipid peroxidation, reactive oxygen species, apoptotic cell number and DNA fragmentation. Addition of melatonin and alpha tocopherol with homocysteine decreased these parameters respectively. Homocysteine decreased cell migration but melatonin and alpha tocopherol increased cell migration compared to homocysteine exposed cells. Overall, melatonin and alpha tocopherol showed significant effects against oxidative stress induced by homocysteine in endothelial cells.

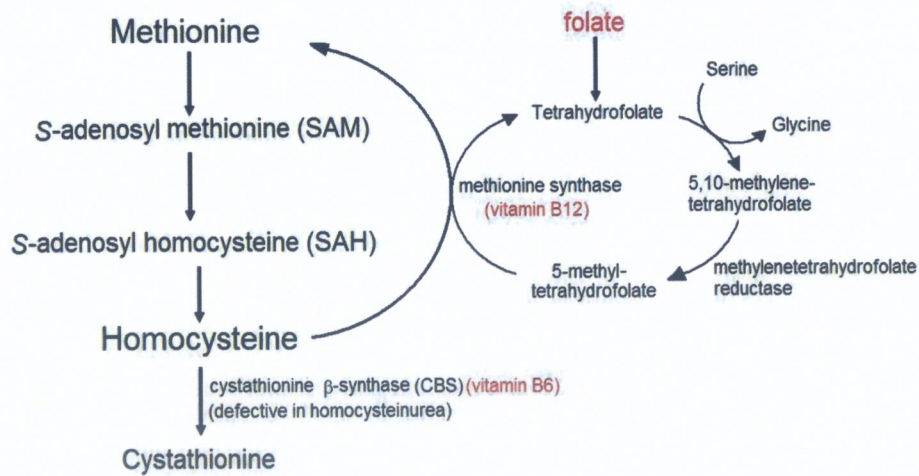
Keywords: Homocysteine, melatonin, alpha tocopherol, HUVEC, apoptosis.

1. GİRİŞ

Homosistein (Hcy) sülfür içeren bir amino asit türevidir. Hcy seviyesinin yüksek olması hiperhomosistenemi olarak adlandırılır. Hiperhomosistenemi plazmada Hcy seviyesinin yüksek olmasıdır ve kardiovasküler hastalıkların oluşmasında önemli bir sebeptir (Nehler et al. 1997; Bostom et al. 1999). Plazmada homosisteinin normal seviyesi 5-15 μM konsantrasyon düzeylerindedir. Hcy konsantrasyonunun belirtilen konsantrasyonun üzerine çıkması endotel hücrelerinde oksidatif stresi ve oluşturduğu hasarı arttırmaya başlar (Han 2013).



Şekil1.1. Homosistein



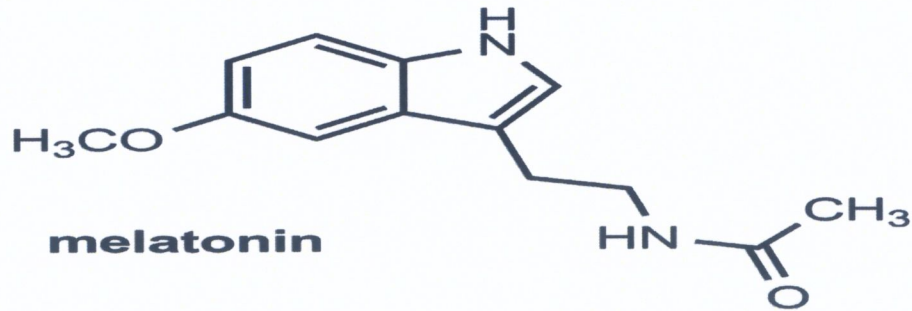
Şekil 1.2. Homosistein yolağı

Hcy seviyesinin artması oksidatif stresi arttırdığı için pro-genitör endotel hücrelerinde kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptoza yol açar (Li et al. 2011). Ayrıca vasküler endotel hücrelerine zararlı olduğu ve kardiovasküler hastalıklara yol açtığı bilinmektedir ve

aterosklerozun da en önemli sebeplerinden birisidir (Chen et al. 2012). Hcy endotel hücrelerinde reaktif oksijen türevlerini (ROS) arttırdığı için apoptozu da artırır (Shan et al. 2011).

Endotel hücreleri fizyolojik olarak yüksek konsantrasyonda homosisteine maruz bırakıldığında endotel hücrelerindeki faktör XII ve faktör V aktivasyonunun arttığı ve bu durumun endotel bariyer fonksiyon bozukluğuna yol açtığı gözlemlenmiştir (Ratnof 1968; Rodgers et al. 1986; Mayer et al. 1989). Oksidatif hasarı arttırdığı için de aynı hücre tipinde lipid peroksidasyonunu (LPO) da artırır (Loscalzo 1996). Hcy oksidasyonu süperoksit radikali ve hidrojen peroksit oluşumuna yol açtığı için sadece endotel hücrelerine değil tümör özelliği göstermeyen normal sinir hücrelerine de zarar verdiği ve hasara yol açtığı gözlemlenmiştir (White et al. 2001).

Melatonin (Mel) epifiz (pineal bez) bezinden salgılanan güçlü bir antioksidan olan bir hormondur (Hill et al. 1988; Vijayalaxmi et al. 2002). Bu özelliğinden dolayı tümör hücrelerinin büyümelerini azalttığı gözlemlenmiştir (Blask et al. 2002). Güçlü bir antioksidan ve radikal süpürücü özelliğinden dolayı anti-anjioenez etki göstererek damar oluşumunu engellediği ve tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği belirtilmiştir (Reiter 2004).

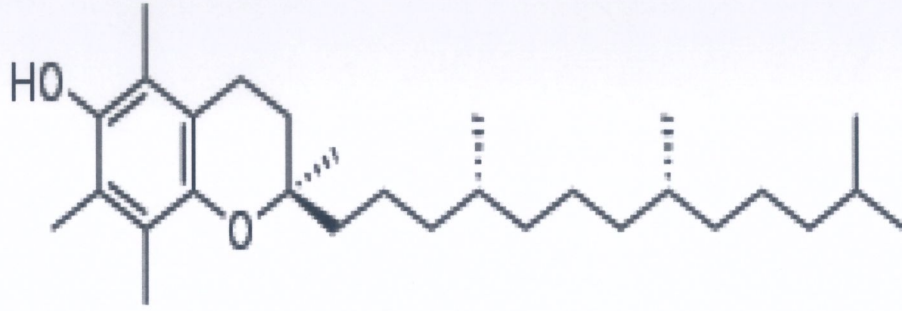


Şekil 1.3. Melatonin hormonunun yapısı

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) pro-anjiojenik bir moleküldür ve endotel hücrelerini damar yapımı için stimuli eder (Ferrara et al. 1992). Melatonin antianjiojenik etkisini VEGF'nin etkisini kırmakla gösterir (Lissoni et al. 2001). Yüksek konsantrasyonlardaki melatonin HUVEC hücrelerinde apoptozu yol açarak çoğalmalarını inhibe eder ve bu etkiyi gösterebilmesi için fizyolojik konsantrasyondan en az on kat

daha fazla konsantrasyonda melatonin uygulanması gerekir. Melatonin yüksek dozlarda HUVEC hücrelerinin çoğalma aşamasında S fazına girmesini bloke eder ve bunu p53 geninin ekspresyonunu artırarak apoptozu artırır (Cui et al. 2006).

Alfa tokoferol (Vit E) yağda çözünebilen güçlü bir antioksidan özelliği olan bir moleküldür. Bu özelliğinden dolayı reaktif oksijen türevlerine karşı hücreleri koruyucu etkiye sahiptir. Özellikle hücre membranlarını lipid peroksidasyonuna karşı korur (Hong et al. 2004).



Şekil 1.4. Alfa tokoferolün kimyasal yapısı

Apoptoz genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptotik hücre ölümü, gelişimden farklılaşmaya, homeostasin sağlanmasından hücre büyümesine ve zararlı hücrelerin kontrollü bir şekilde yok edilebilmesine kadar birçok önemli hücresel hadiselerde rol oynar (Fadeel et al. 1999). Şekil 1.5'te apoptoz mekanizmasının iş ve dış yolağı şematize olarak gösterilmiştir.

Tez çalışmasında, *in vitro* koşullarda homosistein kullanılarak insan endotel hücrelerinde (HUVEC) oluşturulan hücresel oksidatif hasara karşı melatonin ve alfa tokoferolün ayrı ayrı ve birlikte insan umbilikal kord endotel hücreleri üzerindeki etkilerine bakılması ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla oksidatif stress göstergeleri olan hücre canlılığında görülen değişim, oluşan ROS ve LPO miktarı, apoptotic hücre sayılarındaki değişim ve apoptoz göstergesi olan genomic DNA fragmentasyonu deneysel olarak gözlemlenmiş ve ifade edilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Homosistein (Hcy) hücrelerde metabolic olarak üretilen amino asit türevidir. Metabolik olarak metiyonin amino asidinden üretilir ve metabolize edilir. Hücrelerde ve plazmada homosistein konsantrasyonu normal şartlarda 5-15 μM arasındır. Homosistein yolağındaki homosisteini sistationine dönüştüren enzim eksikliğine bağlı olarak plazmadaki konsantrasyonu 15 μM üzerine çıkabilir. Hcy konsantrasyonunun artması çeşitli hastalıklara sebebiyet verir. Bu durum hiperhomosistenemi olarak adlandırılır. Çünkü Hcy reaktif tiol grubu içerir ve buna bağlı olarak miktarının artmasıyla Hcy'nin normal hücrelerde oluşturduğu oksidatif hasar artar. Oksidatif hasar hücrelerde reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin (ROS ve RNS) artmasıyla tetiklenir. Reaktif oksijen türevlerinin artması hücrelerde oluşan lipid peroksidasyonunu tetikler. Bunun sebebi oluşan ROS'un hücrelerdeki makromoleküllerle reaksiyona girmesi ve hücrenin normal yaşam döngüsünü olumsuz etkilemesidir.

Hcy konsantrasyon artışının birçok hücre tipinde özellikle nöron ve endotel hücrelerinde oluşan ROS miktarını arttırarak oksidatif hasarı arttırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Oksidatif stresin artması hücrelerde apoptotic hücre ölümlerini arttırır. Bazı çalışmalarda Hcy'nin endotel hücrelerinde apoptozun iç yolağını tetikleyerek hücre ölümlerini arttırdığı ve kardiovasküler hastalıklara yol açtığı gözlemlenmiştir.

Melatonin epifiz bezinden salgılanan bir hormondur. Geceleri salgılanarak vücut hücrelerinin kendini yenilemesinde önemli bir rol oynar. Güçlü bir antioksidant olmasından dolayı normal hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Bunu hücrelere zarar veren serbest radikalleri yok ederek yapar. Bazı çalışmalarda melatoninin plazmadaki Hcy seviyesini dengeli seviyede tuttuğu ve Hcy'nin oluşturduğu hasarı azalttığı tespit edilmiştir. Alfa tokoferol bir tokoferol türevidir ve E vitamini olarak da bilinir. Hücreleri koruyucu antioksidant özelliği vardır. Özellikle hücrede bulunan lipidleri oksidatif hasara ve onun yol açtığı lipid peroksidasyonuna karşı korur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Endotel büyüme medyumunu (EBM), EBM büyüme faktörleri hidrokortison, askorbik asit, fetal kalf serumu (FKS), insan fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve penisilin streptomisin solusyonu Lonza'dan alınmıştır. Tripsin-EDTA (% 0,25), tripan blue (% 4), fosfat salin tamponu (PBS) ve mikoplazma deteksiyon kiti Biological Industries firmasından alınmıştır. Melatonin, alfa tokoferol, trikloroasetik asit, tiobarbitürik asit, etidyum bromür (EtBr), agaroz, tris ve etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) Sigma firmasından alınmıştır. Genomik DNA izolasyon kiti Intron firmasından, 100 bp DNA markörü Solis Biodyne firmasından alınmıştır..Cell Migration Assay Kiti ve ApopTag® Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kiti Millipore firmasından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

HUVEC (ATCC® CRL-1730™) hücreleri Eskişehir Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezinden temin edildi. Bingöl Üniversitesi Merkez Laboratuvarında saklandı. Hücreler, hidrokortison, askorbik asit, fetal kalf serumu (FKS), insan fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) içeren EBM kullanılarak pasajlanarak çoğaltıldı.

3.2.2. Ajan Uygulaması

HUVEC hücreleri çoğaltılarak beş gruba ayrıldı. Kontrol grubunda herhangi bir ajan uygulanmayarak hücreler sadece hücre besiyerinde 24 saat bekletildi.. Hcy grubunda hücelere 1 mM hcy 24 saat boyunca uygulandı. Hcy+Mel grubunda 1 mM Hcy ile beraber 10 µM Mel, Hcy+vit E grubunda 1 mM Hcy ile birlikte 50 µM Vit E,

Hcy+Melatonin+Vit E grubunda ise 1 mM Hcy ile birlikte 10 μ M Mel ve 50 μ M Vit E 24 saat boyunca uygulanmıştır.

3.2.3. WST-1 Assay Hücre Canlılığı Analizi

WST-1 hücre canlılık kiti protokolüne göre yapıldı. HUVEC hücreleri her bir kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde ekildi ve ajan uygulama bölümünde belirtildiği gibi Hcy, Mel ve Vit E belirtilen konsantrasyonlarda eklenerek 24 saat % 5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de bekledikten sonra her bir kuyucuğa 5 μ l WST-1 maddesi eklendi. Hücreler 4 saat inkübe edildi. 4 saat inkübasyondan sonra ELISA reader cihazı (SpectraMax Plus 384 Microplate Reader) kullanılarak her bir örneğin 450 ve 630 nm'deki optical density (OD) değerleri alındı ve canlılık analizi yapıldı.

3.2.4. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Analizi

Lipid peroksidasyonu malondialdehitten (MDA) oluşan tiobarbitürik asit reaktif türleri (TBARS) ölçümüne dayalı yöntemle yapıldı. Hücreler ekildikten sonra ajan uygulama bölümünde belirtildiği gibi Hcy, Mel ve Vit E ile belirtilen konsantrasyonlarda eklenerek 24 saat sonra hücreler alınarak 250 μ l trichloroacetic acid (% 7 w/v) 1 mL of thiobarbituric acid (0.8% w/v) ile reaksiyona sokulup 95°C'de kaynayan su banyosunda 30 dakika boyunca tutuldu. Sonra buza konularak 5 dk beklendi. 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra ELISA reader kullanılarak 532 nm'de OD değerleri ELISA reader (SpectraMax Plus 384 Microplate Reader) ile alındı ve her bir örneğin MDA seviyeleri hesaplandı. Malondialdehid bis standart olarak kullanıldı. Sonuçlar μ M cinsinden ifade edildi (Smith et al. 1982; Maruf and O'Brien 2014).

3.2.5. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Analizi

ROS analizi 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) kullanılarak yapıldı. HUVEC hücreleri ajan uygulama kısmında belirtildiği gibi Hcy, Mel ve Vit E eklendikten 24 saat sonra hücreler santrifüjle toplandı. Herbir örnekte 1×10^6 hücre için 2 μ M DCFH-DA eklendi ve karanlık ortamda 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Spektroflorometre kullanılarak 485 eksitasyon ve 525 emisyon değerlerinde floresan şiddeti (FI) ölçümü yapıldı (Shen et al. 1996).

3.2.6. Hücre Göçü Analizi

Hücre göçü analizi 24-well cell migration assay kit (colorimetric) protokolüne göre yapıldı. Hücreler kit protokolüne göre çoğaltılıp 24 kuyucuklu plakaya ekildi. Hcy, Mel ve Vit E kit protokolüne göre hücrelere 24 saat uygulandıktan sonra ELISA reader (SpectraMax Plus 384 Microplate Reader) kullanılarak 560 nm’de OD değerleri alındı.

3.2.7. *In Situ* Apoptoz Deteksiyonu: Tünel Assay

In situ Apoptoz deteksiyonu terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick end labeling (TUNEL) yöntemiyle ApopTag® Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kiti protokolüne göre yapıldı. Bunun için hücreler 6 kuyucuklu plakaya ekildi ve çoğaltıldı. Daha sonra hücrelere belirtilen konsantrasyonlarda Hcy, Mel ve Vit E eklendikten sonra 24 saat bekletildi. Hücreler % 1 paraformaldehid ile sabitlendi. Kit protokolüne göre hücreler boyandıktan sonra ışık mikroskopunda her bir örnek için en az üç fotoğraf alınarak apoptotik indeks hesaplandı. Apoptotik indeks, her bir fotoğraftaki apoptotik hücre sayısının toplam hücre sayısına bölünmesiyle bulundu.

3.2.8. DNA Fragmentasyonu Analizi

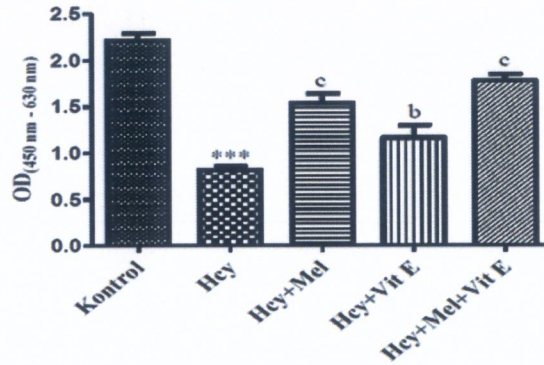
Hücreler çoğaltıldıktan sonra hücrelere ajan uygulama bölümünde belirtildiği gibi ajan uygulaması yapıldı. Daha sonra hücrelerden genomik DNA izolasyonu yapmak için hücreler PBS ile yıkandı ve santrifujlenerek DNA izolasyonuna hazır hale getirildi. Sonrasında DNA izolasyon kitinde belirtilen protokole göre DNA izolasyonu sağlandı ve deney için bir miktarı alındı. Deneysel DNA, etidyum bromür içeren % 0.8’lik agaroz jelde yürütüldü. Daha sonra jelin ultra viole (UV) ışık altında görüntüsü alınarak DNA’da meydana gelen fragmentleşme GelDoc EZ görüntüleme cihazıyla tespit edildi ve kayıt altına alındı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. WST-1 Assay Hücre Canlılığı Analizi

Hücre canlılığı analizi WST-1 assay ile yapılmıştır. Şekil 4.1.1.'de gözlemlendiği üzere 1 mM Hcy hücre canlılığını önemli oranda azaltırken ($p<0,001$) Hcy ile birlikte 10 μ M mel ve 50 μ M vit E uygulanması hücre canlılığını önemli oranda arttırmıştır ($p<0,001$ ve $p<0,01$).

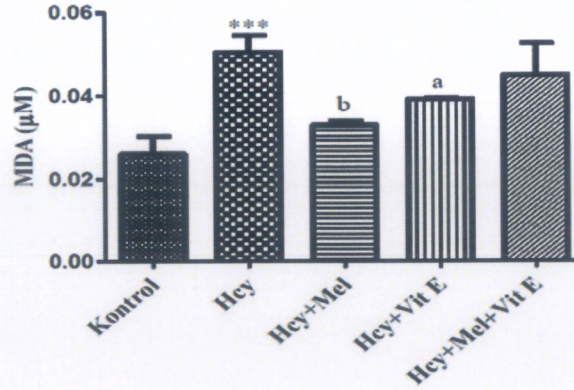


Şekil 4.1.1. WST-1 assay hücre canlılığı analizi sonuçlarını gösteren grafiktir. Kontrol grubunda sadece besiyeri eklenmiştir. Hcy grubunda 1 mM homosistein, Hcy+Mel grubunda 1 mM Hcy ve 10 μ M melatonin, Hcy+Vit E grubunda 1 mM Hcy ve 50 μ M vitamin E, Hcy+Mel+Vit E grubunda ise 1 mM Hcy, 10 μ M melatonin ve 50 μ M vitamin E 24 saat uygulanmıştır. (Sonuçlar Data \pm SD olarak ifade edilmiştir. *** $p<0,001$ vs kontrol, ^b $p<0,01$ vs Hcy, ^c $p<0,001$ vs Hcy, n=8)

4.1.2. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Analizi

Şekil 4.1.2.'de gösterilen LPO sonuçlarına göre 1 mM Hcy, kontrol grubuna göre LPO göstergesi olan MDA konsantrasyonunu önemli oranda artırırken ($p<0,001$) Hcy ile birlikte 10 μ M Mel uygulanması Hcy'nin oluşturduğu MDA miktarını önemli oranda düşürmüştür ($p<0,01$).

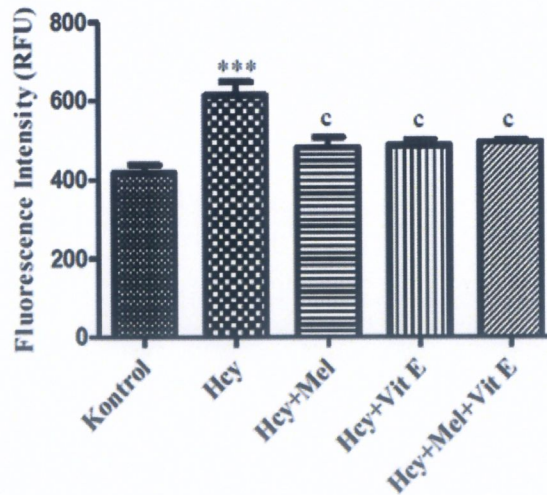
Mel ve vit E'nin birlikte uygulanması sinerjetik olarak önemli bir değişikliğe yol açmamıştır.



Şekil 4.1.2. Lipid peroksidasyonu sonuçlarını gösteren grafik. Kontrol grubunda sadece besiyeri eklenmiştir. Hcy grubunda 1 mM homosistein, Hcy+Mel grubunda 1 mM Hcy ve 10 µM melatonin, Hcy+Vit E grubunda 1 mM Hcy ve 50 µM vitamin E, Hcy+Mel+Vit E grubunda ise 1 mM Hcy, 10 µM melatonin ve 50 µM vitamin E 24 saat uygulanmıştır. (Sonuçlar Data±SD olarak ifade edilmiştir. ***p<0,001 vs kontrol, ^ap<0,05 vs Hcy, ^bp<0,01 vs Hcy, n=3)

4.1.3. Reaktif Oksijen Türevleri (ROS) Analizi

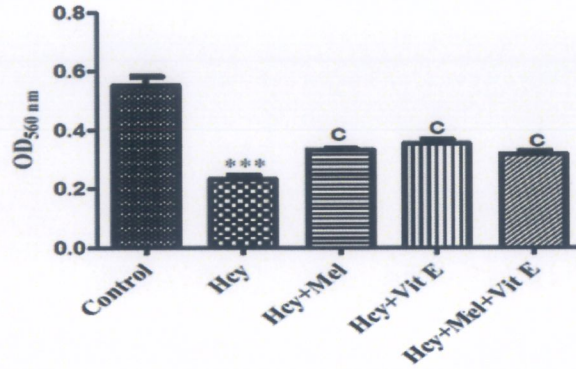
Şekil 4.1.3.'de gözlemlendiği üzere 1 mM Hcy, kontrol grubuna göre ROS miktarını kontrol grubuna göre artırırken (p<0,001) Hcy ile birlikte 10 µM mel ve 50 µM vit E uygulanması ROS miktarını düşürmüştür (p<0,001).



Şekil 4.1.3. Florasan şiddeti (FI) ölçüm sonuçlarını gösteren grafik. Kontrol grubunda sadece besiyeri eklenmiştir. Hcy grubunda 1 mM homosistein, Hcy+Mel grubunda 1 mM Hcy ve 10 µM melatonin, Hcy+Vit E grubunda 1 mM Hcy ve 50 µM vitamin E, Hcy+Mel+Vit E grubunda ise 1 mM Hcy, 10 µM melatonin ve 50 µM vitamin E 24 saat uygulanmıştır. (Sonuçlar Data±SD olarak ifade edilmiştir. ***p<0,001 vs kontrol, ^cp<0,001 vs Hcy n=4)

4.1.4. Hücre Göçü Analizi

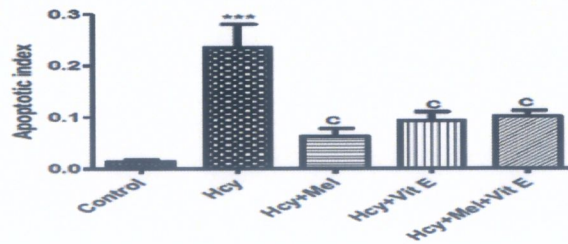
Şekil 4.1.4.'de belirtilen hücre göçü sonuçlarına göre endotel hücreleri 1 mM Hcy olan ortamda hücre göçünü önemli oranda azaltmıştır ($p<0,001$). Ortama 10 μ M Mel ve 50 μ M vit E eklenmesi hücre göçünü istatistiksel olarak önemli oranda arttırmıştır ($p<0,001$).



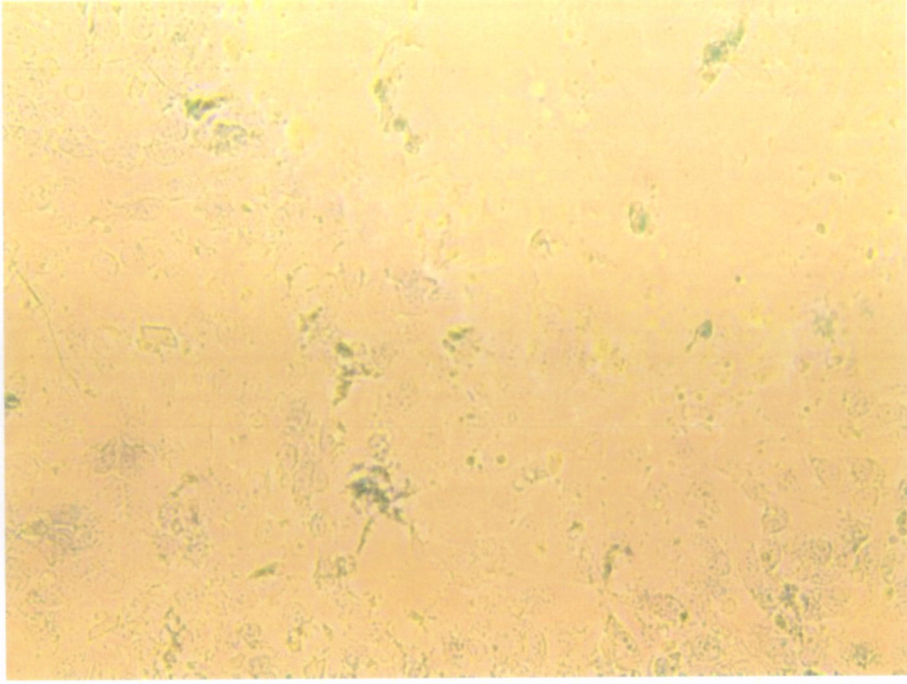
Şekil 4.1.4. Hücre göçü analizi sonuçlarını gösteren grafik. Kontrol grubunda sadece besiyeri eklenmiştir. Hcy grubunda 1 mM homosistein, Hcy+Mel grubunda 1 mM Hcy ve 10 μ M melatonin, Hcy+Vit E grubunda 1 mM Hcy ve 50 μ M vitamin E, Hcy+Mel+Vit E grubunda ise 1 mM Hcy, 10 μ M melatonin ve 50 μ M vitamin E 24 saat uygulanmıştır. (Sonuçlar Data \pm SD olarak ifade edilmiştir. *** $p<0,001$ vs kontrol, ^c $p<0,001$ vs Hcy, n=4)

4.1.5. *In Situ* Apoptoz Deteksiyonu: Tünel Assay

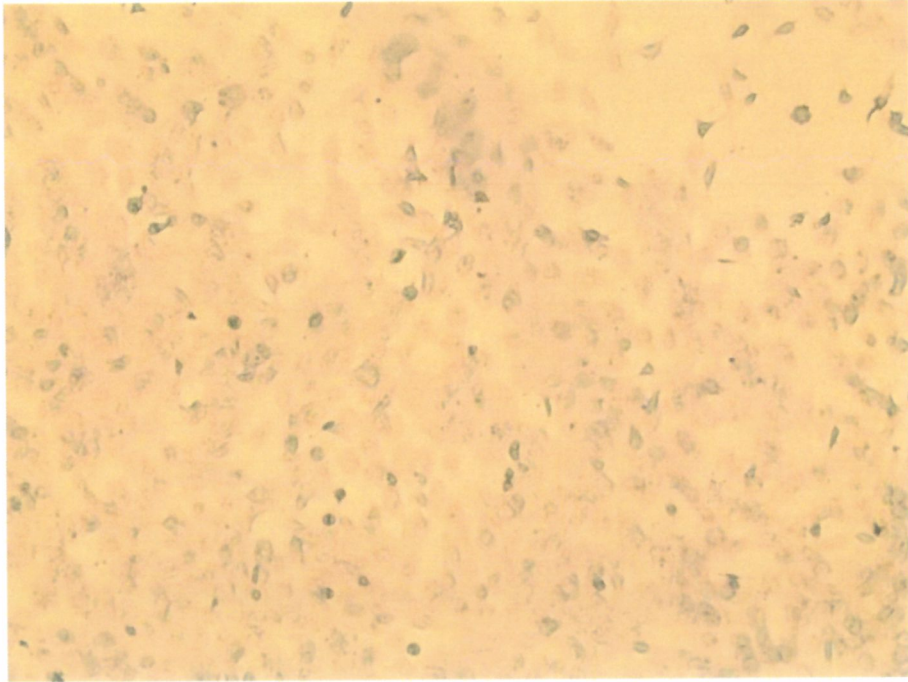
Apoptotik hücre sayısını belirlemede TUNEL assay yöntemi kullanılmıştır. Şekil 4.1.5 .1.'de gösterildiği üzere hücrelere 1 mM Hcy eklenmesi apoptoza uğrayan hücre sayısını arttırmıştır ($p<0,001$). Hcy ile birlikte 10 μ M Mel ve 50 μ M vit E eklenmesi apoptoza uğrayan hücre sayısında istatistiksel olarak önemli oranda düşüş gerçekleştirmiştir ($p<0,001$). Hcy ve vit E'nin birlikte eklenmesi de Hcy grubuna göre apoptotik hücre sayısını azaltmıştır.



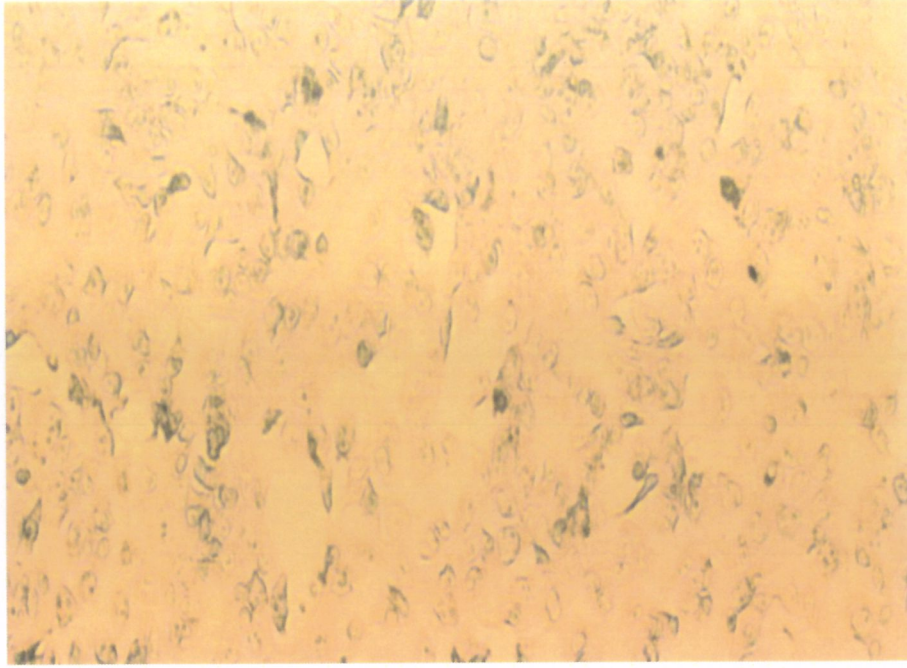
Şekil 4.1.5.1. TUNEL assay apoptotik indeks sonuçlarını gösteren grafik. Kontrol grubunda sadece besiyeri eklenmiştir. Hcy grubunda 1 mM homosistein, Hcy+Mel grubunda 1 mM Hcy ve 10 μ M melatonin, Hcy+Vit E grubunda 1 mM Hcy ve 50 μ M vitamin E, Hcy+Mel+Vit E grubunda ise 1 mM Hcy, 10 μ M melatonin ve 50 μ M vitamin E 24 saat uygulanmıştır. (Sonuçlar Data \pm SD olarak ifade edilmiştir. *** $p<0,001$ vs kontrol, ^c $p<0,001$ vs Hcy, n=3)



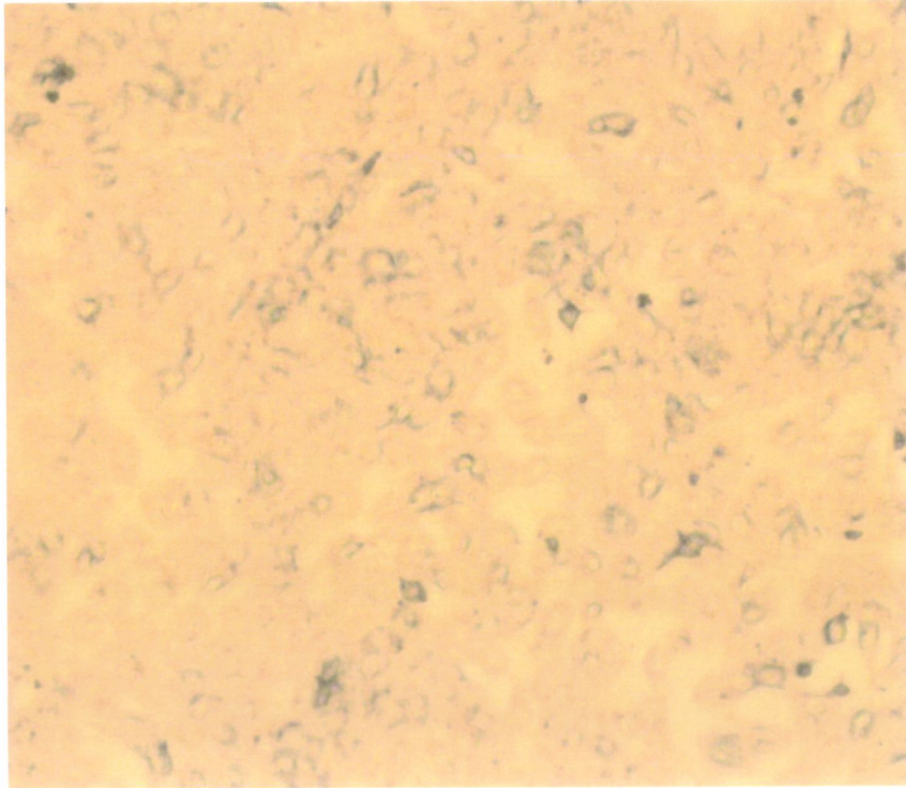
Şekil 4.1.5.2. Kontrol grubunun TUNEL assay görüntüsü



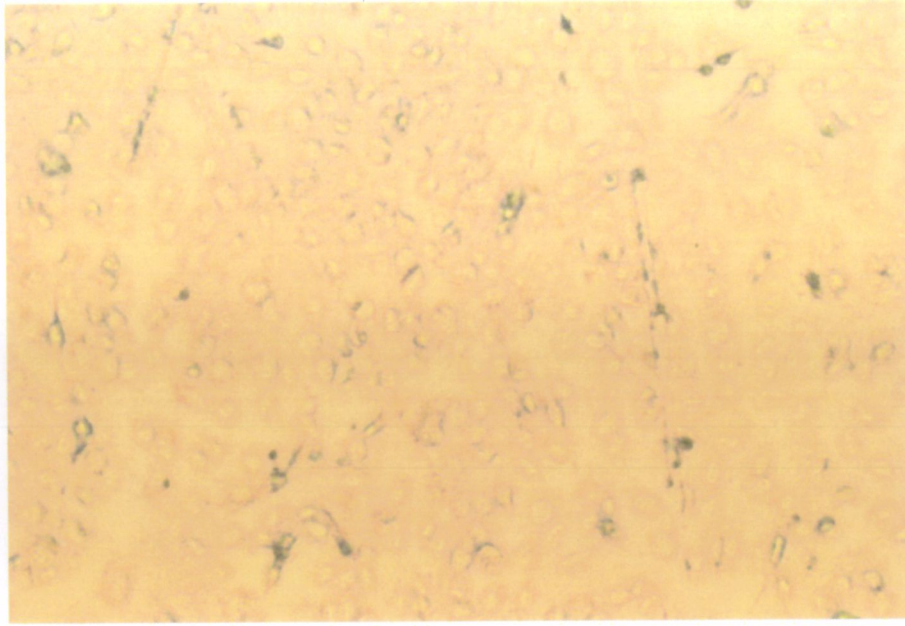
Şekil 4.1.5.3. Hcy grubunun TUNEL assay görüntüsü



Şekil 4.1.5.4. Hcy+Mel grubunun TUNEL assay görüntüsü



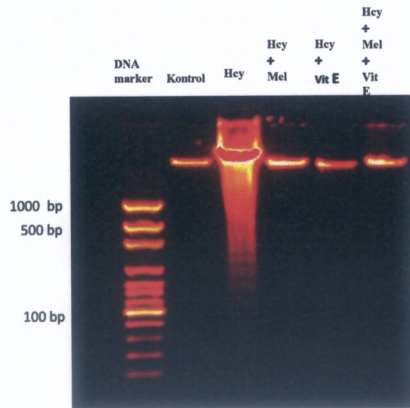
Şekil 4.1.5.5. Hcy+Vit E grubunun TUNEL assay görüntüsü



Şekil 4.1.5.6. Hcy+Mel+Vit E grubunun TUNEL assay görüntüsü

4.1.6. DNA Fragmentasyonu Analizi

Şekil 4.1.6.'da gözlemlendiği üzere agaroz jel sonuçlarına göre hücelere 1 mM Hcy eklenmesi hücrelerin genomik DNA'sında önemli oranda hasar yol açmıştır. Genomik DNA parçalanmış ve apoptozun göstergesi olan DNA fragmentlarına ayrılma durumu gözlenmiştir. Hcy ile birlikte 10 μ M Mel ve 50 μ M vit E eklenmesi DNA fragmentasyonunu azaltmış fragmentasyona uğramış DNA görülmemiştir.



Şekil 4.1.6. Endotel hücrelerinden izole edilen genomik DNA agaroz jel yürütme sonuçlarını gösteren agaroz jel görüntüsüdür. Kontrol grubunda sadece besiyeri eklenmiştir. Hcy grubunda 1 mM homosistein, Hcy+Mel grubunda 1 mM Hcy ve 10 μ M melatonin, Hcy+Vit E grubunda 1 mM Hcy ve 50 μ M vitamin E, Hcy+Mel+Vit E grubunda ise 1 mM Hcy, 10 μ M melatonin ve 50 μ M vitamin E 24 saat uygulanmıştır. Herbir gruptan izole edilen genomik DNA % 0,8'lik agaroz jelde yürütülmüştür

4.2. Tartışma

Bu çalışmada insan endotel hücrelerinde Hcy'nin hücrel oksidatif hasar parametrelerini nasıl etkilediğine ve Mel ve Vit E'nin bu parametreler üzereinde ne gibi değişikliklere yol açtığıının *in vitro* koşullarda gözlemlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca Mel ve Vit E'nin hücrelere birlikte eklenmesinin hücrel etkilerini arttırıp arttırmadığına bakılmıştır.

Hcy, metiyonin amino asidinin demetillenmesi sonucu oluşan ve tiol grubu içeren bir amino asit türevidir. İçerdiği tiol grubundan dolayı da hücrelerde çok çeşitli etkilere yol açar. Hcy seviyesinin yükselmesi endotel hücrelerinde hücrel fonksiyonların azalmasına, lipid peroksidasyonuna ve apoptoza yol açar. Hcy'nin bu etkisi hücrelerdeki ROS miktarını arttırmasından dolayı ortaya çıkar (Blom et al. 1995; Tawakol et al. 1997; Carsten and Kenneth 2004). Artan ROS seviyesi hücrelerde artan lipid peroksidasyonuna yol açar. Lipid peroksidasyonunun artması membran potansiyelinin kaybedilmesine ve özellikle mitokondriyel membran depolarizasyonuna neden olur (C. Sidoti-de Fraisse et al. 1998).

Ayrıca artan ROS miktarı mitokondriyel membran potansiyelinin kaybedilmesine sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımına ve hücrede apoptozu tetikleyen Bcl2 protein ailesinden olan proteinlerin aktivasyonuna yol açarak apoptozu arttırır (Kumar and Jugdutt 2003). Bu çalışmada Hcy, *in vitro* ortamda endotel hücrelerindeki ROS miktarını arttırmıştır. Buna paralel olarak hücrelerdeki LPO miktarı da artmıştır. ROS ve LPO seviyelerinin artması apoptozu tetikleyen önemli unsurlar olduğu için apoptoza uğrayan hücre sayısında da artış gözlemlenmesi, yukarıdaki bilgiyi doğrular niteliktedir. Ayrıca endotel hücrelerinin Hcy'li ortamda hücre göçünü azaltması artan apoptotik hücre sayısına bağlı olarak açıklanabilir.

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), epifiz bezinden salgılanan triptofan türevi bir hormondur (Hill et al. 1988). Melatonin hormonu önemli bir radikal giderici ve güçlü bir antioksidan molekülüdür. Bu özelliğinden dolayı hücrelerdeki ROS seviyesini düşürdüğü ve hücreleri ROS moleküllerinin oluşturduğu oksidatif hasar karşı koruduğu bilinmektedir (Vijayalaxmi et al. 2002). Melatonin hormonunun bu özelliği, çalışmada

kullanılmasının en önemli sebebidir. Melatonin hücredeki serbest radikallerle reaksiyona girerek ROS seviyesini azaltır. Ayrıca melatoninin *in vitro* koşullarda Hcy'nin sebep olduğu oksidatif hasara karşı normal hücreleri apoptoza karşı koruduğu da gösterilmiştir (Osuna et al. 2002).

Bu çalışmada hücrelere Hcy ile beraber 10 μ M Mel eklenmesi hücrelerde oluşan ROS miktarını Hcy grubuna göre önemli oranda azaltmıştır. ROS seviyesindeki düşüğe bağlı olarak oluşan LPO miktarını da azaltmıştır. ROS ve LPO seviyelerindeki düşüş Mel'in radikal giderme özelliğini göstermektedir. Ayrıca Mel eklenmesi Hcy'nin sebep olduğu apoptotik hücrelerin sayısını düşürmüştür. Bu veriler Mel'in normal hücreleri apoptoza karşı koruduğu bilgisiyle uyumaktadır. Apoptotik hücre sayısındaki azalışa bağlı olarak melatonin Hcy'nin azalttığı hücre göçü oranını önemli oranda arttırmıştır. Yine bu durumu melatoninin hücreleri apoptoza karşı koruduğu bilgisine dayandırılabilir.

Vit E molekülünün hücrelerdeki ROS miktarını azalttığı ve hücreleri oksidatif hasara karşı koruduğu ve buna bağlı olarak lipid peroksidasyonunu azalttığı bilinmektedir (Hong et al. 2004). Bu çalışmada hücrelere Hcy ile beraber 50 μ M Vit E eklenmesi, ROS seviyesini Hcy grubuna göre önemli oranda düşürmüştür. ROS miktarındaki düşüğe bağlı olarak Hcy grubuna göre LPO seviyesini de önemli oranda düşürmüştür. Bu veriler daha önceden yapılmış çalışmalarla gösterilen Vit E'nin oluşan LPO miktarını düşürdüğü bilgisiyle örtüşmektedir (Baydas vd. 2002; Celik vd. 2002).

Ayrıca Vit E'nin ROS ve LPO miktarlarını önemli oranda azaltması apoptotik hücre sayısını da Hcy grubuna göre önemli oranda azaltmıştır. Bu veri, vitamin E'nin endotel hücreleri gibi normal hücreleri apoptoza karşı koruduğu bilgisiyle örtüşmektedir (Hong et al. 2004).

Bu çalışmada elde edilen bir başka sonuç ise hücrelere Hcy ile beraber 10 μ M Mel ve 50 μ M Vit E eklenmesinin melatonin ve vitamin E'nin tek eklendiği sonuçlara göre önemli bir değişiklik oluşturmamasıdır. Buradan melatonin ve vitamin E gibi iki önemli radikal giderici molekülün birlikte hücrelere eklenmesinin sonuçlarda önemli bir değişikliğe yol açmadığı sonucu çıkarılabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Homosisteinin fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonlara bağılı olarak endotel hücrelerinde oksidatif hasarı arttırdığını ve buna bağılı olarak apoptozu tetiklediğini gösteren birçok çalışma vardır. Yüksek homosistein konsantrasyonu demek olan hiperhomosistenemi kardiovasküler sistemin temel hücrelerinden olan endotel hücrelerde apoptotik hücre ölümünü arttırdığı için kardiovasküler hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmada *in vitro* koşullarda melatonin ve alfa tokoferolün endotel hücrelerde tetiklenen oksidatif stresin etkisini yüksek oranda azalttığı ve koruyucu etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu tez çalışması melatonin ve alfa tokoferolden elde edilecek çeşitli ilaçların endotel hücreleri için koruyucu etken madde olarak ve hiperhomosistenemi hastalarında tedavi amaçlı kullanılabileceğini göstermesi ve bununla ilgili gelecek çalışmalara ışık tutması açısından önem arzetmektedir.

KAYNAKLAR

Baydas G, Canatan H, Turkoglu A (2006) Comparative analyses of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Journal of Pineal Research* 32: 225–230

Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT (2002) Melatonin as chronobiotic anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian based cancer therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2: 113–132

Blom HJ, Kleinveld HA, Boers GH, Demacker PN, Hak-Lemmers HL, Te-Poele-Pothoff MT, Trijbels JM (1995) Lipid peroxidation and susceptibility of low-density lipoprotein to in vitro oxidation in hyperhomocysteinemia. *European Journal of Clinical Investigation* 25: 149–154

Bostom AG, Silbershatz H, Rosenberg IH, Selhub JD, Agostino RB, Wolf PA, Jacques PF, Wilson PW (1999) Nonfasting plasma total homocysteine levels and all-cause and cardiovascular disease mortality in elderly Framingham men and women. *Archives of Internal Medicine* 159: 1077–1080

Celik S, Baydas G, Yilmaz O (2002) Influence of vitamin E on the levels of fatty acids and MDA in some tissues of diabetic rats. *Cell Biochemistry and Function* 20: 67–71

Chen CX, Cao CF, Song CX (2012) Influence of Hhcy and hyperinsulinism on human endothelial cell apoptosis and caspase-3 expression. *Chinese Rem Clin.* 12(10): 1289–91
Cui P, Luo Z, Zhang H, Su Y, Li A, Li H, Zhang Za, Yang Z, Xiu R (2006) Effect and mechanism of melatonin action on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Pineal Research* 41: 358-362

Fadeel B, Gleiss B, Hogstrand K, Chandra J, Wiedmer T, Sims PJ, Henter JI, Orrenius S, Samali A (1999) Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266(2): 504-11

Ferrara N, Houck KA, Jakeman L, Leung DW (1992) Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrinology Reviews* 13: 18–32

Fraisse CS, Rincheval V, Risler Y, Mignott B, Vayssiere JL (1998) TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene* 17(13): 1639–165

Han P (2013) The relationship between plasma homocysteinemia and cerebral infarction. *Journal of China Health Industries* 19: 130–1

Hill SM, Blask DE (1998) Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and the morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Research* 48: 6121–6126,

Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, Lee SC, Lee KB, Rhee SJ (2004) Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinica Chimica Acta* 340: 107–115

<http://archive.impactaging.com/papers/v4/n5/full/100459.html> (alıntı tarihi 30.09.2016)

<http://cenblog.org/the-haystack/files/2011/06/melatonin.png> (alıntı tarihi 30.09.2016)

<http://www.robertbarrington.net/wp-content/uploads/2013/03/Homocysteine-Metabolism-Homocysteinurea.jpg> (alıntı tarihi 30.09.2016)

https://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-Tocopherol#/media/File:Tocopherol,_alpha-.svg (alıntı tarihi 30.09.2016)

https://en.wikipedia.org/wiki/Homocysteine#/media/File:Homocysteine_racemic.png (alıntı tarihi 30.09.2016)

Kumar D, Jugdutt BI (2003) Apoptosis and oxidants in the heart. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 142: 5–8

Li L, Hu BC, Gong SJ, Yan J (2011) Homocysteine induced caspase-3 activation by endoplasmic reticulum stress in endothelial progenitor cells from patients with coronary heart disease and healthy donors. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 75: 1300–5

Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ (2001) Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuroendocrinology Letter* 22: 45–47

Loscalzo J (1996) The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *Journal of Clinical Investigation* 98: 5–7

Maruf AA, O'Brien P (2014) Flutamide-Induced Cytotoxicity and Oxidative Stress in an *In Vitro* Rat Hepatocyte System. Hindawi Publishing Corporation

Nehler MR, Taylor LM, Porter JM (1997) Homocysteinemia as a risk factor for atherosclerosis: a review. *Cardiovascular Surgery* 5: 559–567

Osuna C, Reiter RJ, García JJ, Karbownik M, Tan DX, Calvo JR, Manchester LC (2002) Inhibitory effect of melatonin on homocysteine-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Pharmacological Toxicology* 90: 32–37

Ratnoff OD (1968) Activation of Hageman factor by L- homocysteine. *Science* 162: 1007

Reiter RJ (2004) Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *Journal of Pineal Research* 37: 213–214

Rodgers GM, Kane WH (1986) Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *Journal of Clinical Investigation* 77: 1909

Shan Y, Zhang MH, Zhang M, Tian XY (2011) Effect of homocysteine on the expression of endothelial antioxidative enzymes in vein. *Journal of Yunan Norm University* 31(3): 64–7

Shen HM, Shi CY, Shen Y, Ong CN, (1996) Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radical Biology and Medicine* 21(2): 139-146

Skurk C, Walsh K (2004) Death Receptor Induced Apoptosis. A new mechanism of homocysteine-mediated enthelial cell cytotoxicity. *Hypertension* 43: 1168

Smith MT, Thor H, Hartzell P, Orrenius S (1982) The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 31(1): 19–26

Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA (1997) Hyperhomocysteinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 95: 1119–1121

Vijayalaxmi, Thomas CR, Reiter RJ, Herman TS (2002) Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *Journal of Clinical Oncology* 20: 2575–2601

White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL, Bush AI, Cappai R (2001) Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *Journal of Neurochemistry* 76: 1509–1520

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Antalya'nın Elmalı ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Özdemir İlköğretim Okulunda tamamladı. Elmalı Lisesi'nden mezun oldu. 2011 yılında Boğaziçi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden mezun oldu. 2012 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde araştırma görevlisi olarak göreve başladı. Aynı bölümde araştırma görevlisi olarak görevine devam etmektedir. İngilizce bilmekte olup evli ve bir çocuk babasıdır.