

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDROJEN PEROKSİTE MARUZ KALAN FARE MİYOBLAST HÜCRE
HATTINDA OLUŞAN ATROFİYE, MELATONİN UYGULANMASININ
KALPAİN-1 İFADELENMESİNE VE ATROFİK MORFOLOJİYE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

Dr. NAZLI KARIMISAKHVIDI

Fizyoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2018

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDROJEN PEROKSİTE MARUZ KALAN FARE MİYOBLAST HÜCRE
HATTINDA OLUŞAN ATROFİYE, MELATONİN UYGULANMASININ
KALPAİN-1 İFADELENMESİNE VE ATROFİK MORFOLOJİYE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

Dr. NAZLI KARIMISAKHVIDİ

Fizyoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Murat Timur BUDAK

ANKARA

2018

ONAY SAYFASI

**HİDROJEN PEROKSİTE MARUZ KALAN FARE MİYOBlast HÜCRE HATTINDA
— OLUŞAN ATROFİYE, MELATONİN UYGULANMASININ KALPAİN-1
İFADELENMESİNE VE ATROFİK MORFOLOJİYE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

NAZLI KARIMISAKHVIDI

Doç. Dr. Murat Timur Budak

Bu tez çalışması 31.10.2018 tarihinde jürimiz tarafından "Fizyoloji Doktora Programı"nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Erhan KIZILTAN

Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD

Üye: Prof. Dr. Gonca AKBULUT

Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD

Üye: Prof. Dr. Ethem GELİR

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD

Üye: Doç. Dr. Burcu HAYTA

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD

Üye: Doç. Dr. Meltem TUNCER

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

26 Kasım 2018


Prof. Dr. Diclehan ÖRHAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾



26/11/2018

Dr. NAZLI KARIMISAKHVIDI

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanının Doç. Dr. Murat Timur BUDAK danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Dr. NAZLI KARIMISAKHVIDI

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren değerli hocam Doç. Dr. Murat Timur Budak'a.

Tez çalışmama değerli yorumları ile katkıda bulunan Prof. Dr. Gonca Akbulut' a.

Güler yüzünü samimiyetini benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Burcu Hayta' ya.

Tez çalışmam sırasında ve doktora eğitim süresince kıymetli bilgiler ve, tecrübelerle çalışma ortamında eğitim almamı sağlayan ve her zaman destekleyen değerli Fizyoloji Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Ethem Gelir ve, diğer değerli bölüm hocalarıma;

Doktora eğitimim süresince ve tezimin her aşamasında destek ve yardımlarını esirgemeyen sevgili asistan arkadaşlarıma özellikle Yasemin Kartal ve Adnan Berk Dinçsoy ve bölüm çalışanlarımıza;

Bana her zaman destek olan ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili eşim Vahid'e ve doğduğu günden itibaren varlığıyla bana güç veren bitanecik oğlum Rayan' a teşekkürlerimi sunarım.

Teşekkürlerin az kalacağı diğer üniversite hocalarımın da bana doktora eğitim hayatım boyunca kazandırdıkları her şey için ve beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için hepsine teker teker teşekkürlerimi sunuyorum ve son olarak beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan sevgili anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

KARIMISAKHVIDI, N., Hidrojen peroksit maruz kalan fare Miyoblast hücre hattında oluşan atrofiye, melatonin uygulanmasının kalpain-1 ifadenmesine ve atrofik morfolojiye etkisinin incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2018. Kas atrofilerinin en sık görülen tipi olan kullanılmamaya bağlı kas atrofisinin oluşumunda oksidatif stresin temel etken olduğu bilinmektedir. Bu etkiyi ortadan kaldırmak amacı ile çalışılan çeşitli tedavi seçenekleri mevcuttur. Oksidatif stres ile oluşan en önemli ilk hasarın kalpain-1 gibi proteazlar ile oluşturulan kontraktıl protein bütünlüğünün bozulması çeşitli araştırmalarda ortaya konmuştur. Oksidatif strese bağlı atrofiyi önlemede etkinliği gösterilen bir tedavi seçeneğinde antioksidan uygulamalarıdır. Antioksidanlar içinde de melatonin gibi mitokondri hedefleyen antioksidanlar grubunun daha etkili bir tedavi seçeneği öne çıkmaktadır. Bizim çalışmamızda bu noktada literatüre ilk olarak melatonin uygulamasının kalpain-1 proteazının ifadesi üzerine etkisi ve melatoninin redoks dengeleri ve morfoloji üzerinde etkileri düzeyinde katkı sağlaması için planlanmıştır. Çalışmamızda oksidatif stres oluşturmak için H₂O₂ kullanıldı. Aynı koşullarda ve aynı pasaj sayısında olan C2C12 hücrelerinden 4 grup oluşturuldu. K (Kontrol), M (Melatonin), H (H₂O₂), M+H (Melatonin+ H₂O₂) grupları deney protokolünde belirtildiği gibi oluşturularak morfolojik değerlendirme için miyotüplerin çapları ölçüldü. Morfolojik değerlendirmede gruplar arasında anlamlı farklılık gösterildi (p<0,05). Morfolojik değerlendirme sonrası total protein lizatlarından Kalpain-1 protein miktarları ölçüldü. Kalpain 1 protein miktarının K grubunda diğer gruplara göre daha az olarak gözlemlendi. Hücrelerin antioksidan, oksidan durumunu belirtmek için TAS ve TOS kitleri kullanıldı. H grubunda TOS miktarı diğer gruplardan daha yüksek bulundu. Rebound etki ile açıklanabilen en yüksek ortalama TAS değeri H grubunda görüldü. Bu sonuçlar, H₂O₂'in C2C12 hücrelerde kas atrofisi oluşturduğunu ve melatoninin oluşan atrofiyi morfolojik olarak önlediğini göstermektedir. Melatoninin kas atrofisini önlemede kalpain-1 protein etkisi haricinde başka bir mekanizmasında rol alabileceği sonucuna varıldı. Bu etkinin daha iyi açıklanabilmesi için işlevsel çalışmaların yürütülmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Kas atrofisi, Kalpain-1, Melatonin, Mitokondri hedefli antioksidanlar, Redoks dengesi

Destekleyen kuruluş: Çalışmamız Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Hızlı Destek Projesi -16063) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

KARIMISAKHVIDI, N., Investigation of the effect of melatonin administration on calpain-1 expression and atrophic morphology on atrophy of mouse myoblast cell line exposed to hydrogen peroxide, Hacettepe Graduate School of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Physiology, Ankara, 2018. It is known that oxidative stress is the main factor in the formation of disuse muscle atrophy which is the most common type of muscle atrophy. Various treatment options are available to eliminate this effect. The first important damage which is done by oxidative stress on contractile protein integrity induced by proteases such as calpain-1 has been demonstrated in several studies. Antioxidant treatment is an effective treatment option to prevent atrophy due to oxidative stress. In the antioxidant, a more effective treatment option of the “mitochondrial targeted antioxidants” group such as Melatonin is prominent. In our study, the effects of melatonin application on the expression of the calpain-1 protease and the effects of melatonin on the redox balance and morphology were first investigated in the literature. We have used H₂O₂ to generate oxidative stress in our study. Four groups of C2C12 cells were created under the same conditions and in the same passage number. K (Control), M (Melatonin), H (H₂O₂), M + H (Melatonin+H₂O₂) groups were formed as described in the experimental protocol and the diameters of the myotubes were measured for morphological evaluation. Morphological evaluation revealed a significant difference between the groups ($p<0.05$). After morphological evaluation, Calpain-1 protein amounts were measured in total protein lysates. Calpain 1 protein amount was less in group K compared to other groups. TAS and TOS kits were used to find out the antioxidant/oxidant statuses of the cells. H group showed higher increase when we compared with other groups in TOS amounts. The highest mean TAS value that could be explained by the rebound effect was observed in the H group. These results suggest that H₂O₂ produces muscle atrophy in C2C12 cells and that melatonin morphologically prevents atrophy. Melatonin may be involved other mechanisms which cause disuse muscle atrophy other than calpain-1 protein effect. Functional studies need to be carried out to better explain this effect.

Key words: Muscle atrophy, Calpain 1, Melatonin, Mitochondria targeted antioxidants, Redox balance

Supported organization: Our study was supported by Scientific Research Unit of Hacettepe University (Fast Support Project - 16063)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskelet Kası ve İşlevleri	3
2.2. İskelet Kasının Farklılaşması	4
2.3. İskelet Kasının Plastisitesi	5
2.3.1. İskelet Kas Kitesinin Korunma Yolakları	5
2.4. Kas Atrofisi	6
2.4.1. Kas Atrofisini Düzenleyen Sinyal Yolakları	7
2.4.2. Kas Atrofisinde Aktive Olan Proteolitik Yolaklar	9
2.5. Kalpainler ve Kaspazlar	12
2.5.1. Kaspazlar	12
2.5.2. Kalpainler	12
2.6. Kullanılmamaya Bağlı Kas Atrofisi	15
2.6.1. ROS ve Oksidatif Stres	15
2.6.2. Mitokondri	16
2.7. Antioksidanlar	17
2.7.1. Mitokondriyi Hedefleyen Antioksidanlar (MTA)	17
2.7.2. Melatonin	18
2.8. Melatonin ve Kalpain Etkileşimi	21

2.9. Melatonin ve Proteazom İnhibitörü Etkileri Arasındaki Benzerlik	22
2.9.1. Melatonin Etkileri İçin Ubikitin-Proteazom Hipotezi	23
2.10. Melatoninin Prooksidan Etkisi	23
2.11. İskelet Kası Çalışmalarında Kullanılan Deneysel Modeller	24
2.11.1. <i>In vivo</i> Modeller	24
2.11.2. <i>In vitro</i> Modeller	24
2.12. Amaç ve Hipotez	25
2.12.1. Amaç	25
2.12.2. Hipotez	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1. Gereçler	26
3.1.1. Hücre Kültürü	26
3.1.2. Hücre Canlılık Testi	26
3.1.3. MTT Yöntemi	27
3.1.4. Hücrelere Kimyasalların Uygulaması	27
3.1.5. Miyotüp Çap Ölçümü	27
3.1.6. Protein İzolasyonu	27
3.1.7. Protein Miktar Tayini	28
3.1.8. Western Blot	28
3.1.9. TAS ve TOS Ölçümleri	29
3.2. Yöntemler	29
3.2.1. C2C12 Hücrelerinin Çoğaltılması	29
3.2.2. C2C12 Hücrelerine Melatonin ve H ₂ O ₂ Uygulanmadan Önce MTT Yöntemi Aracılığıyla IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	33
3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulama Planı	34
3.2.4. Image J Programıyla Miyotüp Çapı Ölçümü	35
3.2.5. C2C12 Hücrelerinden Protein İzolasyonu	37
3.2.6. Bradford Yöntemi Kullanılarak TPL Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	37
3.2.7. Western Blot	37

3.2.8. TAS ve TOS Kitleri ile Yapılan Oksidan ve Antioksidan Seviye Ölçümleri	40
3.2.9. İstatiksel Analiz	42
4. BULGULAR	43
4.1. MTT yöntemiyle IC50 Değerlerinin belirlenmesi	43
4.2. C2C12 Hücrelerinin Farklı Büyüme ve Farklılaşma Dönemlerindeki Morfolojik Özelliklerinin Deney Grupları Arasında Karşılaştırılması	45
4.3. Image J Programıyla Deney Gruplarının Morfolojik Değerlendirilmesi	50
4.4. Deney Grupları Morfolojik Ölçüm Değerlerinin Karşılaştırılması	52
4.5. Deney Gruplarından Elde Edilen Total Protein Lizatlarındaki Protein Konsantrasyonların Belirlenmesi	55
4.6. Kalpain 1 Protein İfadelenmesinin Değerlendirilmesi ve Gruplar Arası Karşılaştırması	56
4.7. TAS Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Gruplar Arası Karşılaştırması	58
4.8. TOS Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Gruplar Arası Karşılaştırması	59
5.TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
6.1. Sonuçlar	67
6.2. Öneriler	67
7.KAYNAKLAR	69
8. EKLER	
Ek 1. Orjinallik Ekran Çıktısı	
Ek 2. Dijital Makbuz	
9.ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Derece santigrad
ABTS	2,2'-Azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AKT 1	Serin / treonin spesifik protein kinaz 1
AKT	Serin / treonin spesifik protein kinaz
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AOD	<i>Arbitrary Optic Density</i>
APF-1	ATP bağımlı proteolitik faktör -1
APS	Amonyum persülfat
ATP	Adenozin trifosfat
BAX	<i>BCL-2-like protein 4</i>
BCL-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C2C12	Fare miyoblast hücre hattı
Ca ⁺²	Kalsiyum
Clarity ECL substrate	<i>Clarity Enhanced Chemiluminescence substrate</i>
CO ₂	Karbon dioksit
cyt-C	Sitokrom C
DAPI	<i>4,6- diamidine-2'-phenylindole</i>
ddH 2 O	Deiyonize su
DDT	<i>Dithiothreitol</i>
DMEM	<i>Dublecco's Modified Eagle'Limiting Medium</i>
DMSO	Dimetil Sülfoksit
E1	Ubikitin aktive edici enzim
E2	Ubikitin konjuge edici enzim
E3	Ubikitin bağlama enzimi
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ETZ	Elektron Transport Zincir
FBS	Fetal Dana Serumu

FoxO	<i>Forkhead Box O</i>
GR	Glukokortikoid reseptörü
GSH	Glutasyon Redüktaz
H grup	H ₂ O ₂ uygulanan grup
H₂O₂	Hidrojen peroksit
H₂SO₄	Sülfürik Asit
HCL	Hidroklorik asit
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IC50	Yarı inhibe edici konsantrasyon
IGF 1	insülin benzeri büyüme faktörü 1
K grup	Kontrol grup
KD	Kilo Dalton
M grup	Melatonin uygulanan grup
M	Molar
M+H grup	Melatonin+H ₂ O ₂ uygulanan grup
MAFbx	<i>Muscle Atrophy F-box (Atrogin 1)</i>
MDA	Malondialdehit
Mito E	Mitokondri hedefli E vitamin
Mito Q	Koenzim Q
MPTP	<i>1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine</i>
MPTP	<i>Mitochondrial Permeabilite Transition Pore</i>
MTA	Mitokondriyi Hedefleyen (<i>Targeted</i>) Antioksidanlar
mTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
MURF 1	<i>Muscle Ring-Finger protein 1</i>
NaCL	Sodium klorit
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B</i>
Nrf-2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>

OH	Hidroksi
OXOPHOS	Oksidatif Fosforilasyon
P/S	Penisilin-Streptomisin
P53	Tümör baskılayıcı protein 53
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-T	<i>Phosphate buffer saline- Tween twenty</i>
pH	<i>potential of Hidrojen</i>
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (<i>Species</i>)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SkQ1	(10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium)
SMAD	Kısaltma, <i>Caenorhabditis elegans</i> SMA (" <i>small</i> " worm phenotype) ve <i>Drosophila</i> MAD (" <i>Mothers Against Decapentaplegic</i> ") ailesinin genleri ile ilgili homolojileri ifade eder. Ve bu iki ifadenin kısaltmalarının birleşmesiyle oluşmuştur.
SOD	Süperoksit Dismütaz
SS-31	((d-Arg-2', 6'-dimethyltyrosine-Lys-Phe-NH ₂),(Szeto-Schiller ³¹))
TAS	<i>Total Antioxidant Status</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	n,n,n,n-Tetrametiletilediamin
TGF β	Dönüştürücü büyüme faktörü Beta
TOS	<i>Total Oxidant Status</i>
TPL	Total Protein Lizat
Trolox	Vitamin E analogu
UCP_s	<i>Uncoupling Protein S</i>
UPP	Ubikitin Proteazom Yolağı (<i>Pathway</i>)
UV	Ultraviyole
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1.	Kas hücresinin embriyonik dönemde farklılaşması. 4
2.2.	İskelet kasının yapısı. 5
2.3.	Kas atrofisine karşı koymak için önemli tedavi hedefleri olan sinyal modülleri. Yolakların çoğu AKT-mTOR-FoxO modülünde ortaklanmış bir yola yönlendirilir. Noktalı çizgiler henüz ayrıntıları tam keşfedilmemiş yolaklara işaret eder. 6
2.4.	Kas liflerinin boyutunu kontrol eden ana yolaklar. Protein sentezi ve degradasyonu, birçoğu ortak ara maddelerle veya birbiriyle çapraz-karışmada birleşen birçok farklı uyaran tarafından düzenlenir. Burada gösterilen bileşenlerin birçoğu kas hastalıklarında umut verici terapötik hedeflerdir. Noktalı çizgiler, henüz tam olarak tanımlanmamış yetişkin iskelet kasındaki moleküler mekanizmaları ve rolü olan yolları göstermektedir. GR, glukokortikoid reseptörünü işaret eder. 7
2.5.	IGF1-AKT yolunu kontrol eden dahili geri bildirim yolakları. IGF1-AKT yolunu kontrol eden dahili geri bildirim döngüleri kırmızı ile gösterilmiştir. Noktalı çizgi, AKT'nin mTOR üzerindeki etkisinin dolaylı olduğunu göstermektedir. 8
2.6.	Ubikitin-Proteazom Yolağı (UPP) 9
2.7.	Otofaji-Lizozom sistemi. 9
2.8.	Kastaki miyofibrilleri yıkım için yönlendiren temel mekanizma. A. Kalpainler çoğunlukla parçalanmamış miyofilamentlerin Z çizgisinde bulunurlar.B. Kalpainler aktif hale gelince Z diskin yanındaki bölgelerde bulunan Titin ve Nebulin gibi hücre iskeletinin proteinlerini ard arda parçalayabilir ve myofilamenlerin ayrılmasına sebep olabilirler. C. Miyofilamenler, miyofibrillerden serbestleşirler. D. Polipeptidler ve polipeptidlerin fragmanları proteazom tarafından amino asitlere parçalanırlar. 14
2.9.	Melatoninin sentez basamakları. 19

2. 10.	Melatoninin Ubiquitin-Proteazom Yolak inhibitörü benzeri işlevleri.	22
2.11.	C2C12 hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşma süreci.	25
3.1.	C2C12 Hücrelerinin DAPI boyaması sonrası florans altında mikroskopik görüntüleri.	30
3.2.	C2C12 Hücrelerinin farklılaşması ve miyotüp oluşumunun başlaması.	32
3.3.	İmage J programı ile morfolojik ölçüm.	36
3.4.	Protein örneklerinin jelde yürütülmesi (A) ve PVDF membrana transferi (B).	38
4.1.	Melatonin IC50 değerinin hesaplanması.	43
4.2.	H ₂ O ₂ IC50 değerinin hesaplanması.	44
4.3.	C2C12 hücrelerinin çoğaltılması (A, B) ve bu hücrelerin farklılaşma sürecinin başlatılması (C).	46
4.4.	Farklılaşma sonu kontrol grubu C2C12 hücrelerinin morfolojisi 10X (A) ve 40X (B) büyütmedeki görüntüleri.	47
4.5.	Farklılaşmanın sonu melatonin grubu C2C12 hücrelerinin morfolojisi 10X (A) ve 40X (B) büyütmede görüntüleri.	48
4.6.	Farklılaşmanın sonu H ₂ O ₂ grubu C2C12 hücrelerinin morfolojisi 10X (A) ve 40X (B) büyütmede görüntüleri.	48
4.7.	Farklılaşmanın sonu melatonin+H ₂ O ₂ grubu C2C12 hücrelerinin morfolojisi 10X (A) ve 40X (B) büyütmede görüntüleri.	49
4.8.	Image J programı ile miyotüp morfoloji ölçümü.	50
4.9.	İmage J programından elde edilen miyotüp morfolojik ölçüm datalarının <i>Microsoft Excel</i> programına aktarılması. Her bir 40X büyütmeli mikroskop görüntüsü içine düşen miyotüp kısımları F1, F2 vs şeklinde numaralanarak (A), gereç ve yöntemde ifade edildiği gibi program çıktısı her bir miyotüp için <i>Microsoft Excel</i> programına (B) aktarıldı (Şekil 4.9.B da miyotüpler, fiber olarak belirtilmiştir).	51
4.10.	Deney gruplarının farklılaşmanın 6. gününün sonunda miyotüp çaplarının ölçüm ortalamaları ve standart (std) hata çizgileri .	52

4.11.	Deney gruplarının ortalama miyotüp çapları ve SD değerlerinin “Error Bar grafiği” şeklinde SPSS program çıktısı olarak gösterimi.	55
4.12.	Biorad kiti protein standartları ile hazırlanan grafiğinin üzerinde deney gruplarının total kalpain-1 protein miktarlarının gösterimi.	55
4.13.	Image Lab yazılımında protein bantlarının TPN metoduyla ölçümü.	57
4.14.	Western blot ile kalpain-1 proteinin iki farklı protein konsantrasyonu kullanılarak “ <i>Biorad ChemiDoc XRS +</i> ” görüntüleme sisteminde Image Lab yazılımı kullanılarak görüntülenmesi.	57
4.15.	Deney gruplarının kalpain-1 protein ifadenmesinin Rolatif <i>Arbitrary Optic Density</i> (AOD) ortalaması. Her grup için 2 tekrar yapılmıştır.	58
4.16.	Deney gruplarının ortalama TAS değerleri.	59
4.17.	Deney gruplarının ortalama TOS değerleri.	60

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. Hücre sayısının optimizasyonunun 6-kuyulu plaka için tasarımı.	33
3.2. Hücre kültürü flaskları ve kaplarının taban yüzey alanlarının hesaplanması için kullanılan firma tablosu.	33
3.3. MTT deneyinin 96-kuyulu plakada tasarımı.	34
3.4. TAS yönteminde tanımlanan prosedür. Tablo 3.5. TAS yönteminde kullanılan Reagentlerin içeriği.	41
3.5. TOS yönteminde tanımlanan prosedür. Tablo 3.7. TOS yönteminde kullanılan reagentlerin içeriği.	42
4.1. MTT yönteminde kullanılan melatonin konsantrasyonları ve elde edilen hücre canlılık yüzdeleri.	44
4.2. MTT yönteminde kullanılan H ₂ O ₂ konsantrasyonları ve elde edilen hücre canlılık yüzdeleri	45
4.3. Deney grupları arasında yapılan Oneway ANOVA istatistiksel analiz sonucu.	53
4.4. Gruplar arasındaki farklılıkları göstermek için çoklu karşılaştırma yapmak amacıyla yapılan Post Hoc test sonuçları.	54

1.GİRİŞ

Kaslar, vücuttaki en büyük proteinlerin bulunduğu bölgedir. Kas atrofisinde; kas hücreesindeki organellerde, proteinlerde ve sitoplazmada azalma olur. Buna bağlı olarak lif çapında, kuvvet üretiminde ve yorulmaya karşı dirençte azalma meydana gelir. İskelet kasında yer alan proteinlerin aşırı miktarda yıkılması ve ardından ortaya çıkan kas kitlesindeki azalma; gerek fonksiyon kayıplarına gerekse enerji metabolizmalarında hasarlara sebep olarak morbidite ve mortalitede artışa neden olmaktadır (1). Bununla birlikte, kas kitlesindeki bu kayıp birçok farklı tedavinin etkinliğini de zayıflatabilir. Bu nedenle atrofinin önlenmesi ve tedavisinin bulunması için yapılan moleküler çalışmalarla kas atrofisinin önlenmesi ve/veya azaltılmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesi hayati önem sağlamaktadır (2, 3).

Fare C2C12 kas hücre hattı, atrofi mekanizmalarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir hücre hattı modelidir (4). Birçok kas atrofisinde oksidatif stresin direkt ve indirekt etkileri kısmen bilinmektedir (5). Bu etkilenmede oksidatif stresin temel kaynağı ağırlıklı olarak elektron transportu sırasında mitokondride elektron kaçakları sonucu oluşan oksijen radikali, hidrojen peroksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri oldukları belirtilmiştir (6). Hücrenin maruz kaldığı oksidatif stress düzeyine göre bu mekanizmaların etkinliği ve sonuçları değişmektedir. Bu etkilerin düzenlenmesi ile ilgili mekanizmalar ve etkin yolak ve moleküllerin tanımlanması atrofinin yıkıcı etkilerini önlemek için yoğun şekilde çalışılmaktadır. Kas hücresinin atrofisinde önemli bir mekanizma olan ubiquitin-proteazom yolağının aktive olması için kas kontraktıl proteinlerinin bu mekanizma öncesi kalsiyum bağımlı proteaz sistemi ile bütünlüğünün bozulması gerektiği geçmiş çalışmalarda belirtilmiştir (3). Oksidatif strese maruz kalan C2C12 kas hücrelerinde en etkin proteazlar olarak kalpain-1 aktivasyonu McClung ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir (4). Melatoninin oksidatif strese maruz kalan dokularda hücrenin canlı kalmasına katkı sağladığı bilinmektedir. Bu etkisini diğer antioksidanlardan farklı olarak hücre ve mitokondri içinde daha fazla yoğunlaşmasıyla sağladığı düşünülmekte ve bu nedenle “*mitochondrial targeted antioxidant (MTA)*” grubu içinde sayılmaktadır. Aynı zamanda melatoninin metabolitlerinde

antioksidan etkide olduğu ve çeşitli mekanizmalarla bu etkiyi sağladığı gösterilmiştir. Bu etkilerinden bazıları şöyle sıralanabilir; MTA olarak belirgin radikal temizleyici (*scavenger*) etkisi, antioksidan gen ifadesini artırması, *mitochondrial permeabilite transition pore* (MPTP) inhibisyonu sonucu sitokrom C (Cyt-C)'nin sitoplazmaya geçişinin engellenmesi ile aktif kaspaz-3'ün oluşmasının önlenmesi (7), mitokondri iç zarı üzerindeki *Uncoupling* Proteinlerini (UCPs) üzerine etkisiyle mitokondri fonksiyonunun düzenlenmesi ile mitokondri kaynaklı oksijen radikali oluşumunu azaltması (8). Aynı zamanda melatoninin artan konsantrasyon ve inkübasyon süresine bağlı prooksidan etki gösterebileceği bazı çalışmalarda belirtilmiştir (9, 10). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda oksidatif strese maruz bırakılan bazı hücre hatları ve hayvan çalışmalarında melatoninle ön tedavi yapıldığı zaman kalpain aktivitesi ve düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (11). Melatonin bir diğer etkisi ubiquitin-proteazom yolağında inhibitör etki göstermesi olarak ifade edilmiştir (12).

Bu çalışmada biz C2C12 kas hücrelerinde oksidatif stresle tetiklenen atrofiye bağlı morfolojik değişimi melatonin tedavisinin ne ölçüde etkilendiğini, kalpain-1 ifadenin bu süreçte ne derecede değiştiğini ve C2C12 hücrelerinin redoks dengesinin nasıl değiştirildiğini ortaya koymayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskelet Kası ve İşlevleri

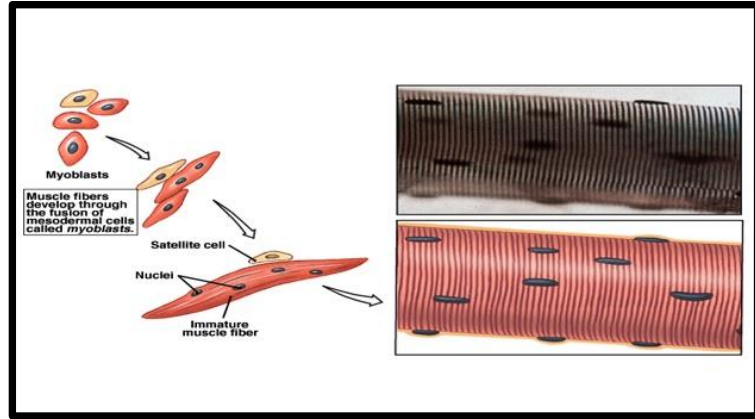
İnsan vücudunda 500'den fazla iskelet kası bulunur. İskelet sistemine bağlanan ve destekleyen konumda olan bu kaslar sinir sistemi tarafından kontrol edilir (13). Kas kitlesi normal erişkin insan vücudunun % 40-50'sini oluşturur ve memelilerde metabolizma kontrolünde önemli rol oynar. İskelet kası vücudun istemli hareketini sağlayan organımızdır. Kas hücresi; hareket, mekanik gerilim üretimi ve bu gerilimi sürdürmek için çok organize bir yapıya sahiptir. Kas hücresinin en küçük fonksiyonel yapısı sarkomer olarak adlandırılır. Bir kas hücresi sarkomerlerin peş peşe dizilmesinden oluşur. Sarkomer içerisinde düzenli bir şekilde kontraktil proteinler paketlenmiş işlevsel bir yapı olarak görev yaparlar. Miyozin iplikleri sarkomerin merkezinde ve aktin iplikleri periferde yer alırlar (14).

Sarkomerler iskelet kasının kasılma ve gevşemesinden sorumlu en küçük fonksiyonel yapılardır. Bu vücudun küçük ve zarif, güçlü ve büyük hareketler şeklinde çok çeşitli hızlı/yavaş ve de esnek olan hareketler yapmasını sağlar. İskelet kasları tüm istemli hareketlerden sorumludur ve optimal fiziksel performans için esastırlar. Motor ünite kaybı, lif tipi değişiklikleri, kas lifi atrofisi ve düşük nöromusküler aktivasyon gibi fizyolojik değişiklikler hareketlerin hızını ve kas tarafından üretilen gücü etkiler. Bu değişiklikler de azalmış fiziksel performans ve fonksiyonel güçsüzlüğe neden olabilir (15). İskelet kasları sadece fiziksel performanstan sorumlu değildir. Hayat boyu optimal sağlıklı yaşam sürdürülmesine de önemli katkıda bulunurlar. Örneğin; İskelet kasları değişik metabolik yollarda rol alırlar. İskelet kasları insüline bağlı glukoz alımında birinci derece etkili olduklarından, glukoz homeostazını sürdürmek için kiritik öneme sahiptirler (16). Kaslar yağ asidi metabolizması ve glikojen sentezi gibi değişik metabolik fonksiyonlara da katılırlar. Bu nedenle iskelet kaslarında oluşan metabolik bozuklular, insülin direnci, metabolik sendrom ve şişmanlığa sebep olabilir (17). Ayrıca, kaslar salgıladıkları miyokinler aracılığı ile diğer organlarla iletişim kurarak parakrin veya endokrin etkiler de gösterebilirler. Miyokinler, kemik, pankreas, karaciğer ve yağ dokusu gibi farklı dokuların metabolik

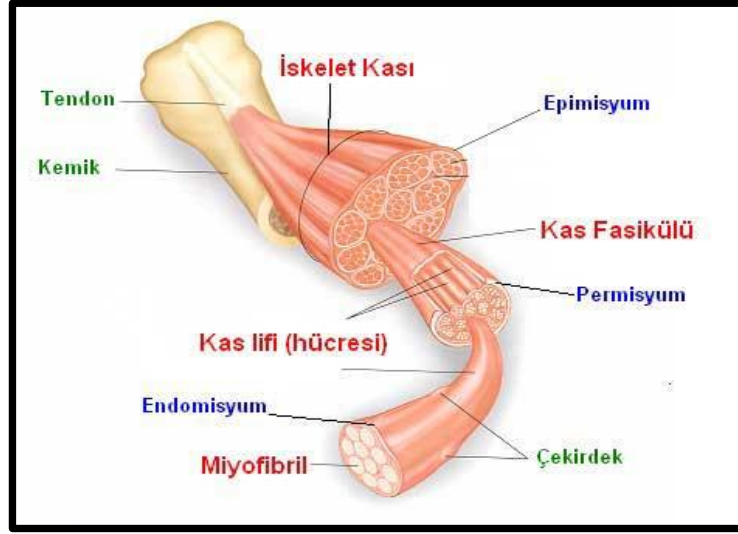
fonksiyonlarını desteklerler (18). İskelet kasının kendi metabolik fonksiyonu ve miyokinlerin rolü hayat boyunca optimal sağlamlığı korumak için kasların önemini göstermektedir (13).

2.2. İskelet Kasının Farklılaşması

İskelet kas hücreleri embriyoda bulunan miyoblastların füzyonuyla oluşur. Miyoblastlar farklılaşmamış tek çekirdeli mezodermal hücrelerdir (Şekil 2.1). Her bir kas lifi kasın bir ucundan diğer ucuna kadar uzanan kas hücreleridir. Bu hücreler çok çekirdekli kasılma üniteleridir. İskelet kası çok fazla damar ve sinire sahip bağ dokusuyla sarılı bir organdır. Her bir kas lifi birkaç yüz ile birkaç bin arasında değişen miyofibril içerir (Şekil 2.2). Her miyofibrilde yan yana yaklaşık 1500 miyozin ipliği ve 3000 aktin ipliği bulunur. Bunlar kas kasılmasından sorumlu olan büyük polarize proteinlerdir. Miyozin ve aktin ipliklerinin kısmen içiçe girmesi nedeniyle miyofibriller birbirini izleyen koyu ve açık bantları oluştururlar (19). Kas hücreleri 10-100 μm çapında ve ortalama birkaç santimetre uzunluğunda, yüzlerce çekirdek içeren muazzam yapılardır (3, 14).



Şekil 2.1. Kas hücresinin embriyonik dönemde farklılaşması.



Şekil 2.2. İskelet kasının yapısı.

2.3. İskelet Kasının Plastisitesi

İskelet kaslarının yapıları ve işlevsel özellikleri vücudun ihtiyaçlarını karşılamak için değişebilir. Örneğin; egzersiz veya inaktivite gibi metabolik talep değişikliklerine yanıt olarak kas kütlesi artabilir ya da azalabilir. İskelet kasının kısıtlı çoğalma kapasitesi nedeniyle kas boyutunun düzenlenmesi, protein sentezi ve protein yıkımı arasındaki dengeyle belirlenir. Aşırı mekanik yük veya anabolik hormonların uyarısı, dengeyi protein sentezine doğru kaydırıp lif çapında artışla oluşan hipertrofiye neden olurken, katabolik koşullarda protein yıkımı protein sentezinden fazla olduğu için kas güçsüzlüğüne ve kas atrofisine yol açar (2).

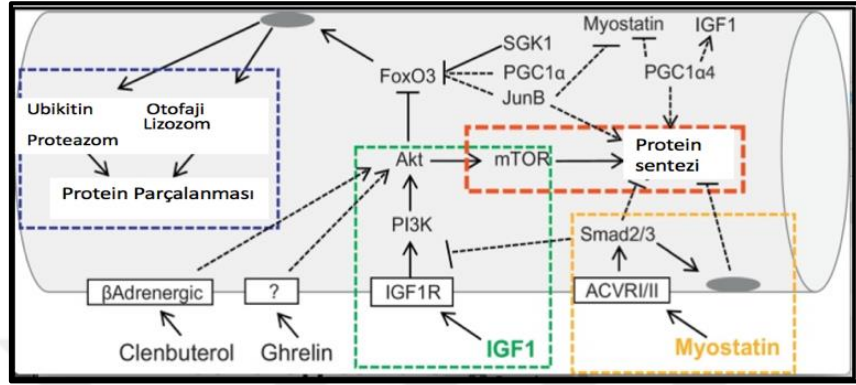
2.3.1. İskelet Kas Kütlesinin Korunma Yolakları

Kas kütlesi esas olarak iki önemli yolakla kontrol edilir:

- 1) Dönüştürücü büyüme faktörü Beta / Smad ($TGF\beta$ / Smad) yolağı
- 2) İnsulin benzeri büyüme faktör 1- Serin / treonin spesifik protein kinaz-*MammalianTarget Of Rapamycin- Forkhead box O* (IGF1-AKT-mTOR-FoxO) yolağı

$TGF-\beta$ süper ligand ailesi, Smad transkripsiyon faktörleri aracılığıyla kas boyutunu düzenler (20). Smad 1/5/8 anabolik genleri düzenlerken, Smad2/3

katabolik genleri kontrol eder (21). IGF1-AKT-mTOR eksenini, aynı anda FoxOs transkripsiyon faktörleri ve protein yıkım yollarını bloke ederken translasyonel mekanizmayı uyararak protein sentezini artırır (Şekil 2.3) (20).



Şekil 2.3. Kas atrofisine karşı koymak için önemli tedavi hedefleri olan sinyal modülleri. Yolakların çoğu AKT-mTOR-FoxO modülünde ortaklanmış bir yola yönlendirilir. Noktalı çizgiler henüz ayrıntıları tam keşfedilmemiş yollara işaret eder (20).

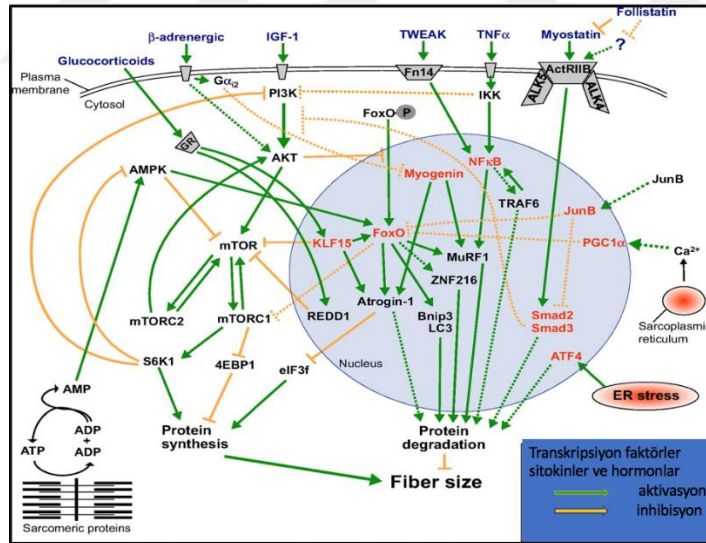
2.4. Kas Atrofisi

Kas kütlesinin % 5-10'unun istemsiz kaybı olarak tanımlanan iskelet kası atrofisinde; kas hücresindeki organeller, protein ve sitoplazmasında azalma olur. Bunların sonucunda da lif çapında, kuvvet üretiminde ve yorulmaya karşı dirençte azalma meydana gelir. Bazı patolojik durumlarda iskelet kas atrofisi oluşur. Bunlara örnek olarak; denervasyon, AIDS, kanser, diyabet, kalp ve böbrek hastalıklarına bağlı ve yaşlanma sürecinde gelişen atrofiler verilebilir (2). Kas atrofisi, hastalıkların yokluğunda kasın kullanılmamasına bağlı olarak da ortaya çıkabilir (22, 23). Kas atrofisi yaşam kalitesinin düşmesine ve mortalitenin artmasına büyük ölçüde katkıda bulunur. Bu nedenle kas atrofisinin moleküler yollarının anlaşılması için yapılan araştırmalar kas atrofisi üzerindeki klinik sonuçları iyileştirmek, sağlık sistemi üzerindeki yükü azaltmak ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için gereklidir (3). Hücrenin proteolitik sistemlerinin aktivasyonu transkripsiyonel olarak düzenlenmiş ve bazı genlerin ifade artışı ve azalışı atrofi sürecinde tespit edilmiştir. Bu bağlamda atrofide regülasyona uğrayan genler atrogenler olarak adlandırılmıştır (24-27). Atrofi

ile ilişkili ifade artışı saptanmış olan genler arasında ubiquitin-proteazom ve otofajilizom yollarına/sistemlerine ait genler mevcuttur. Bu genler normal zamanlarda AKT'nin FoXO üzerindeki inhibe edici etkisiyle inaktif halde olarak bulunurlar (28-31). Bu bulgular atrofinin özel sinyal yolları ve transkripsiyonel programlar aracılığıyla kontrol edilen aktif bir süreç olduğunu göstermiştir. Kas atrofisinde en fazla ifade artışı saptanan genlerin başında Atrojin-1 (MAFbx olarak da bilinir) ve MuRF1 E3 ligazlarını kodlayan genler olduğu çoğu çalışmada gösterilmiştir (1, 24, 25).

2.4.1. Kas Atrofisini Düzenleyen Sinyal Yolları

Birçok yeni bulgu, miyofibrillerin boyutu ve iskelet kasının kasılma performansının düzenlenmesinde kompleks senaryoların ve karmaşık sinyal yollarının rolü olduğunu göstermiştir (Şekil 2.4). Bu farklı yollar ilginç bir şekilde birbirine karışır ve farklı seviyelerde protein sentezi ve yıkımını koordine etmede birbirlerini modüle eder (1).



Şekil 2.4. Kas liflerinin boyutunu kontrol eden ana yollar. Protein sentezi ve degradasyonu, birçoğu ortak ara maddelerle veya birbiriyle çapraz-karışmada birleşen birçok farklı uyaran tarafından düzenlenir. Burada gösterilen bileşenlerin birçoğu kas hastalıklarında umut verici terapötik hedeflerdir. Noktalı çizgiler, henüz tam olarak tanımlanmamış yetişkin iskelet kasındaki moleküler mekanizmaları ve rolü olan yolları göstermektedir. GR, glukokortikoid reseptörünü işaret eder (1).

Kas atrofisinde 4 major yoldan söz edilebilir :

1. İnsulin benzeri büyüme faktör 1- Serin / treonin spesifik protein kinaz - *Forkhead box O* (IGF1-AKT-FoxO) yolu IGF1, dolaşımdaki bir büyüme faktörüdür. Ayrıca iskelet kası da dahil olmak üzere birçok doku tarafından yerel olarak üretilir (32) Şekil 2.5 de IGF1-AKT yolunu kontrol eden dahili geri bildirim yolları gösterilmiştir.

2. Myostatin yolu

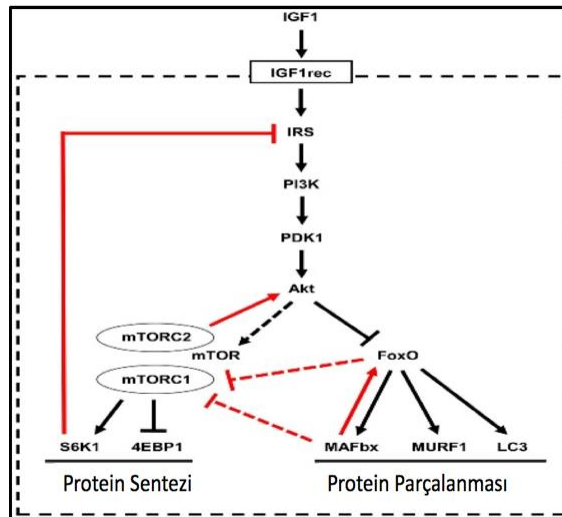
TGF β ailesinin bir üyesi olan miyostatin, ağırlıklı olarak iskelet kası tarafından ifade edilip, salgılanır ve kas büyümesinin negatif bir düzenleyicisi olarak işlev görür.

3. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B* (NF κ B) yolu

Bağışıklık ve inflamasyon da majör rol oynayan NF κ B, iskelet kasında da ifade edilir. Transkripsiyon faktörleri, aynı zamanda inflamatuvar sitokinlerin özellikle tümör nekroz faktörü-a (TNF α) etkisine aracılık edip kas atrofisine sebep olur.

4. Glukokortikoidlerin (1) etkilediği yollar.

Glukokortikoid düzeyleri, kas kaybıyla ilişkili birçok patolojik durumda artmaktadır. Glukokortikoid tedavisi, hücre kültürü ve *in vivo* olarak Atrojin-1 ve MuRF1 ifadelenmesini artırıp ve kas atrofisini indükler.(1).



Şekil 2.5. IGF1-AKT yolunu kontrol eden dahili geri bildirim yolları. IGF1-AKT yolunu kontrol eden dahili geri bildirim döngüleri kırmızı ile gösterilmiştir. Noktalı çizgi, AKT'nin mTOR üzerindeki etkisinin dolaylı olduğunu göstermektedir (32).

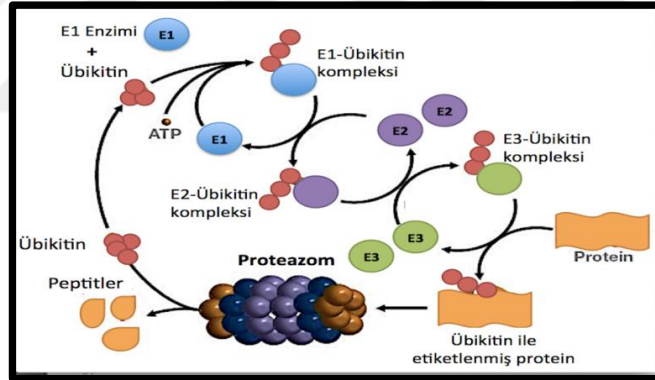
2.4.2. Kas Atrofisinde Aktive Olan Proteolitik Yolaklar

İskelet kasının atrofisi sırasında iki proteolitik ana yolak atrojenler (atrofide ifade artışına uğrayan genler) aracılığıyla aktive edilir.

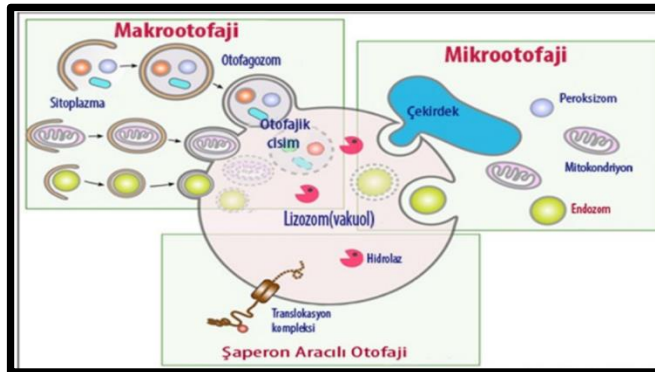
1. Ubikitin-Proteazom yolu (UPP), ağırlıklı olarak miyofibriler proteinleri parçalar (Şekil 2.6).

2. Otofaji-lizozom sistemi, disfonksiyonel organelleri, protein agregantlarını ve bozulmuş toksik proteinleri ortadan kaldırır. 3 Tip otofaji gösterilmiştir; Makrotofaji, mikrotofaji, şaperon aracılı otofaji (Şekil 2.7).

Otofaji yıllar önce tanımlanmasına rağmen atrofi sırasında kas proteini yıkımına olan ilgisi uzun bir süre belirlenememiştir. Erken kanıtlar, lizozomal degradasyonun denerve kasta protein yıkımına katkıda bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca kas atrofisi sırasında bir lizozomal proteaz olan Katepsin-L'in ifadenmesinde artış gözlemlenmiştir (20).



Şekil 2.6. Ubikitin-Proteazom Yolu (UPP)



Şekil 2.7. Otofaji-Lizozom sistemi.

UPP Yolağı

Protein homeostazının ubiquitin-proteazom yolağı ile düzenlenmesi esas olarak retikülosit lizatlarındaki denatüre globin degradasyonunu inceleyen Ciehanover ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (33, 34). Onların çalışmaları sayesinde proteinlerin parçalanmaları için, daha sonra ubiquitin olarak tanımlanan ATP bağımlı proteolitik faktör-1'e (APF-1) gerek duydukları kanıtlanmıştır (35).

UPP yolağının temel özelliğı, proteinlerin proteazoma girmeleri için poliubikitin zincirleriyle etiketlenmeleri gerekliliğıdir. Proteazom, tübül şeklinde çok alt ünite ve proteolitik enzimlere sahip olan bir protein kompleksidir (26S proteazom). Bu kompleks bir çekirdek (20S core) ve her iki ucundan birer düzenleyiciden (19S core) oluşmuştur (36-38). Proteinlere ubiquitin eklenmesinin hassas bir şekilde modüle edildiğı düşünülmektedir. Bu işlem için üç farklı bileşen gerekir; E1 (ubikitin aktive edici enzim), E2 (ubikitin konjuge edici enzim) ve E3 (ubikitin bağlama enzimi) (33, 39). UPP yolağı aracılı protein yıkımı seçici bir süreçtir, burada E3 ligaz hız kısıtlayıcı basamaktır (34). Ubikitin önce ubiquitin aktive edici enzimle (E1) aktive olur, sonra E2 enzime transfer olur ve E3, E2 den aktive edilmiş ubiquitin formunu lizin rezidüsüne aktarır. E3 enzimleri, substratın amino terminal kalıntısı, spesifik fosforile edilmiş alanları veya imha kutusu (*destruction box*) gibi birçok yapısal motifi tanıyabildikleri için substrat özgüllüğünün birincil belirleyicisidirler (40). Özelleşmiş E3 enzimleri proteinlerin belirli kısımlarını ubiquitinleştirir, dolayısıyla E3 ligazlar proteazoma yıkım için hangi proteinlerin hedeflendiğini belirlemede önemli rol oynamaktadır (3).

UPP sisteminin kontraktıl protein proteolizinin %80'inden sorumlu olduğı gösterilmiştir (41).

Deneyisel hayvan modelleri ve hastalar üzerinde yapılan araştırmalar yoğun hacimde kas proteini yıkımının yanı sıra önemli bir bulgu olarak, UPP yolağının atrofiyle ilgili katabolik koşullarda aktifleştiiğini göstermiştir (1, 42). Proteazom sadece sarkomer proteinlerini monomerik formda (Örneğın alfa aktinin) parçalayabilir. Ancak aktomiyozin kompleksi halinde (kas proteinlerinin %50-70'inden sorumludur) (37) veya bozulmamış miyofibril halinde daha kararlı oldukları için UPP yolağıyla

yıkıma uğrayamazlar. Proteazomun büyük olmasına rağmen sarkomerin içerisine girememesi yanı sıra aktif bölgeler içeren proteazomun merkez boşluğuna giriş çapı sadece 10-13 Å'dür ve, çapı 10-100 µm arasında değişen miyofibrillerin girişi için çok dardır. Kaspaz-3, aktomiyozini *in vitro* ve kas hücrelerinde parçalamaktadır. Kaspaz-3 aktifleşmesiyle ortaya çıkan ürünler UPP aracılığıyla hızlı bir biçimde parçalanırlar. Kaspaz-3 aktivitesinin uyarılmasının kasta bazal protein döngüsünün düzenlenmesinden ziyade katabolik koşullarda da rol oynadığını düşünülmektedir (43). Kas atrofisinin başlaması için miyofibriler proteinlerin degradasyonu ve bunun için sarkomer yapısının bütünlüğünün bozulması gerekir. Ortaya konan kanıtlar, kalpainlerin de kas atrofisinde görülen proteolizin düzenlemesinde ve sarkomer bütünlüğünün bozulmasında önemli rol oynadıklarını göstermiştir. Dolayısıyla kalpainler ve UPP yolağı kas proteinlerinin proteolizi üzerinde sinerjik etkiye sahiptirler ve kalpainler kas atrofisi sırasında UPP yolağının aktifleşmesinde pozitif etki yaparlar (3).

İskelet kası proteinlerini; miyofibriler proteinler, sarkoplazmik proteinler, stroma proteinleri olarak 3 gruba ayırabiliriz. Miyofibriler proteinler en büyük iskelet kası proteinleridir ve kasın kasılma fonksiyonundan sorumludurlar. Kasın kasılma fonksiyonunu yapabilmesi için miyofibrillerin kas hücresi içerisinde ara vermeksizin hücrenin başından sonuna kadar devam etmeleri gerekir. Bu nedenle miyofibriler proteinlerin yenilenmesinde bu yapının bozulmaması gerekir. Bu mekanizma, farklı metabolik koşullardaki atrofik kasların, çaplarının daha küçülmesinin gözlemlenmesiyle tutarlıdır (44). Miyofibriler proteinler sarkomer proteinleri (miyosin, aktin gibi.) ve sitoskeletal proteinlerden (vimentin , desmin gibi.) oluşmuştur. Desmin, vimentin, distrofin, filamin gibi sitoskeletal proteinlerin hepsinin ve sarkomer proteinlerinin *in vivo* veya *in vitro* kalpain substratları olduğu tanımlanmıştır. Kalpainlerin bu kritik sitoskeletal proteinler üzerindeki güçlü parçalama aktiviteleri nedeniyle (45). miyofilamentlerin miyofibrillerin yüzeyinden serbest kalmalarında kalpainlerin sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (45).

2.5. Kalpainler ve Kaspazlar

Talbert ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan bir araştırmada, kalpain veya kaspaz-3 inhibisyonunun Soleus kasının kullanılmamaya bağlı atrofisini önlemek için yeterli olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra ilk kez ekstremitte kaslarında kalpain ve kaspaz-3'ün birbirlerini düzenleyici bir mekanizması olduğu gösterilmiştir. Bu mekanizma ile, kalpain kaspaz-3 yapımının uyarabildiği gibi aktif kaspaz-3 ve kalpain aktivasyonunu da başlatabilir denmiştir (46).

2.5.1.Kaspazlar

Kaspazlar, ileri derecede özelleşmiş aspartata özgü sistein proteazlarından oluşan bir aileye aittir ve çok hücreli organizmalarda bulunan interlökin-1 β dönüştürücü enzim ailesinin üyeleridirler (47). Kaspaz gen ailesi, inflamatuvar kaspazlar ve apoptotik kaspazlar olmak üzere iki ana alt gruba ayrılırlar. Apoptotik kaspazlar kendi içinde ayrıca başlatıcı kaspazlar ve uygulayıcı kaspazlar olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. Kaspazlar, hücre kaderinin tespiti, bağışıklığın düzenlenmesi yanı sıra hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu için intrasellüler apoptotik sinyalleri indüklediği gibi hücre transdüksiyonu ve amplifikasyonunda da merkezi bir rol oynayan bir kaspaz kaskat sistemi oluştururlar (48, 49).

2.5.2. Kalpainler

Kalpainler tüm omurgalılarda bulunan kalsiyum bağımlı sistein proteazlardır. Hücre içi çeşitli hücresel süreçlerdeki rollerine örnek olarak; sitoskeletal yeniden şekillendirme, sinyal iletimi ve apoptoziste önemli rol oynaması verilebilir (50). Kalpain ailesi 14 üyeden oluşmasına karşın kas dokusunda esas olarak üç farklı kalpain belirlenmiştir. Bunlar kalpain 1 ve 2 (μ ve m kalpain) ve kalpain 3'tür. Kalpain 1 ve 2 kalsiyuma bağlı sensiviteleri noktasında değişiklik gösterir. Kalpain 1, 5-50 μ M kalsiyum konsantrasyonuna daha duyarlı iken kalpain 2, 250-1000 μ M kalsiyum konsantrasyonuna daha duyarlıdır (51).

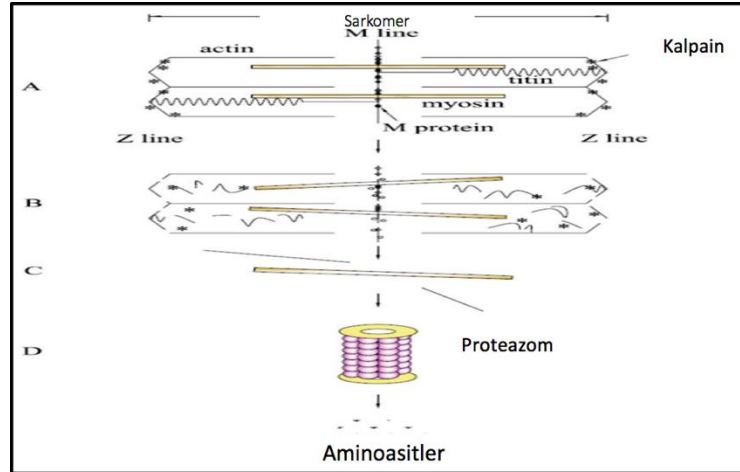
Yapılan birtakım araştırmalarda bazı atrofi türlerine örnek olarak kullanılmamaya bağlı atrofi, denervasyon atrofisi yanı sıra sepsis, glukokortikoid

tedavisi sonucunda oluşan atrofilerde de kalpainlerin aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir (52, 53).

Araştırmalar ayrıca; artmış kalpain aktivitesinin, sarkomer proteinleri ve diğer tüm proteinlerin yıkımı için gereken UPP yolağı üzerinde pozitif etki yaptığını göstermişlerdir (3). Proteoliz aktivitesi normal koşullarda hücreler için zararlı olduğu için çoğu zaman kalpainlerin hücre içerisinde inaktif durumda tutulmaları gerekir (50).

Hücre içerisinde kalsiyum düzeyinin artmasının, otolizle kalpainlerin N-terminal kısmının uzaklaştırılmasının, kalpainlerin fosforilasyonunun, kalpainlerin membrana bağlanmalarının, kalpastatinin varlığının (kalpainlerin endojen inhibitörü) hepsi; kalpainlerin aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynadıkları *in vitro* olarak gösterilmiştir (50, 54). Bunlar arasında, kalsiyum ve kalpastatin en önemli role sahiptirler (3).

Yukarıda değindiğimiz gibi miyofibriller kas hareketini sağlayan, sarkomerlerin yan yana dizilmesinden oluşan, oldukça düzenli hücre içi özelleşmiş protein yapılarıdır. Sarkomerlerin bütünlüğünün bozulmasında, Z diskinin iki yanında bulunan ve miyozin ve aktini Z diskine bağlayan proteinlerin (nebulin, titin, alfa aktinin) kalpainlerin substratları oldukları bilinmektedir. Kalpainlerin aktivitesiyle bu proteinlerin yıkımı gerçekleşir ve böylece sarkomer yapısının bütünlüğü bozulur. Böylece Z diskinin erimesiyle miyofibrillerin bütünlüğünde bir boşluk oluşur (45).



Şekil 2.8. Kastaki miyofibrilleri yıkım için yönlendiren temel mekanizma. A. Kalpainler çoğunlukla parçalanmamış miyofilamentlerin Z çizgisinde bulunurlar. B. Kalpainler aktif hale gelince Z diskin yanındaki bölgelerde bulunan Titin ve Nebulin gibi hücre iskeletinin proteinlerini ard arda parçalayabilir ve miyofilamenlerin ayrılmasına sebep olabilirler. C. Miyofilamenler, miyofibrillerden serbestleşirler. D. Polipeptidler ve polipeptidlerin fragmanları proteazom tarafından amino asitlere parçalanırlar (3).

Diğer taraftan kalpainler hızlı bir biçimde sarkomer proteinlerinden olan troponin I, troponin T ve tropomiyozinin yıkılmasına sebep olurlar. Bunların yanı sıra kalpainler miyozin ve aktin proteinlerini diğerlerine göre daha yavaş olarak parçalarlar (55). Kastaki miyofibrilleri yıkım için yönlendiren temel mekanizma şekil 2.8 de gösterilmiştir.

Kalpastatin

Kalpastatin, kalpain sisteminin iyi tanımlanmış bir üyesidir (56). Kalpastatinin baskılanması μ -kalpainin ifadenmesini arttırarak apoptotik kaspaz yolağını aktive eder. Dolayısıyla kalpain/kalpastatin ilişkisi hücrenin yaşaması ve proliferasyonu için önemli rol oynamaktadır (57). Birçok çalışmada çeşitli yaralanma modellerinde, kalpastatinin protein miktarı ve aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (58). Bununla beraber kalpastatinin aşırı ifadenmesi oksidatif stresten kaynaklanan nöronal dejenerasyonu önlemeye yardımcı olur (59).

2.6. Kullanılmamaya Bağlı Kas Atrofisi

Kullanılmamaya bağlı atrofide reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına bağlı hasar meydana geldiği ilk kez 1991 yılında rapor edilmiştir (60). Bu çığır açan rapor, yirmi yılı aşkın bir süredir pek çok çalışmayla doğrulanmıştır (61). Birçok *in-vitro* ve *in-vivo* araştırmada, kullanılmamaya bağlı atrofi modeli oluşturmak için H_2O_2 kullanılmıştır (62-65).

2.6.1.ROS ve Oksidatif Stres

ROS veya reaktif azot türlerinin seviyeleri ile karakterize edilir. Düşük konsantrasyonda antioksidan ve/veya bozulmuş antioksidan enzim aktivitesine bağlı olarak azalmış antioksidan kapasitesi veya artmış ROS üretim, oksidatif strese neden olabilir (66). Fizyolojik konsantrasyonlarda ROS; mitojenle aktif protein kinaz (MAPK), protein kinaz ve NF κ B yolları aktive veya inhibe ederek, redoks sinyallemede ve hücre sağ kalımında önemli rol oynamaktadır (67).

Bununla birlikte yüksek ROS seviyeleri; DNA, proteinler ve lipidlerde değişikliğe veya hasara neden olur ve apoptotik hücre ölümünü uyarabilir (68).

H_2O_2 aracılı veya diğer maddelerle oluşan oksidatif stres, kas atrofisinin oluşmasına 3 temel mekanizmayla sebep olur :

1. Otofaji-lizozom ve ubiquitin proteazom yollarının aktivitelerini artırır.
2. Atrojenlerin (kas proteazlarını ifade eden genler) ifadelenmelerini artırır ve aynı zamanda protein sentez yollarını transkripsiyon ve translasyon aşamalarında inhibe eder.
3. Okside proteinlerin yapıları daha açık hale geldikleri için proteolize daha yatkın hale gelirler (69).

McClung ve arkadaşları tarafından 2009 yılında gerçekleştirilen bir araştırmada (4), oksidatif stresin fare kas hücre hattı olan C2C12 hücrelerinde, kalpainlerin ifadelenmelerinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Bu araştırmada oksidatif stres oluşturmak amacıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılmıştır. Birkaç çalışma, H_2O_2 'nin iskelet kası miyofibril atrofisini indüklemeye kabiliyetini düşündürse de; bu çalışma, H_2O_2 ve miyotüp atrofisi arasındaki doğrudan bağlantıyı gösteren ilk

çalışmadır. Söz konusu araştırmada H_2O_2 'in hücre canlılığını değiştirmeden kas atrofisi oluşturacak dozunu belirtmek için; farklılaşmış C2C12 hücrelerine değişik konsantrasyonlar ve değişen sürelerde H_2O_2 uygulanmıştır. Kontrol grubu 0 μM olmak üzere, farklılaşmış C2C12 hücreleri artan konsantrasyonlara (25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM) maruz bırakılmışlardır. Her bir konsantrasyonu değişen zaman (1.saat, 2.saat, 4.saat, 24.saat, 48.saat, 72.saat) aralıklarında uygulamışlardır. Gene bu çalışmada H_2O_2 'in miyositler üzerinde toksitesini belirtmek için tripan mavisi metodu kullanılmıştır. Sonuç olarak çalışmada hücrelerin canlılığını değiştirmeden, miyotüp çap ölçüm metoduyla belirlenen kas atrofisi oluşturan H_2O_2 konsantrasyonları ve süresi; 25 μM veya 50 μM konsantrasyonlarda 24 saatlik uygulama şeklinde belirlenmiştir (4).

Kullanılmamaya bağlı atrofinin en önemli nedeninin oksidatif stres olduğu (5) ve kullanılmayan kaslarda ROS'in ağırlıklı olarak mitokondride üretildiği gösterilmiştir (46).

2.6.2. Mitokondri

Mitokondri ökaryotlar için hayati bir organeldir. Hücrelerin ATP üretiminden sorumlu olan mitokondri hücrelerin güç üretme yeri olarak bilinirler. Mitokondride ATP üretimi sırasında mitokondrinin iç zarında bulunan elektron taşıyıcıları tarafından yakalanan elektronlar elektron transport zincirinden (ETZ) geçerler ve oksijene taşınarak sonunda su oluştururlar. Bu arada bazı elektronlar ETZ'dan kaçır. Bu kaçan elektronlar oksijenle reaksiyona girerek oksijenin indirgenmesine sebep olmak suretiyle süperoksit anyonu oluşmasına neden olurlar. Süperoksit anyonu hücresel fonksiyonlar için önemli bir sinyal molekülüdür (6). Ancak aşırı süperoksit üretimi hücre ölümüne yol açabilecek hücre hasarına neden olan oksidatif strese neden olur. Süperoksit anyonu dismutaz enzimiyle veya otodismutasyona uğrayarak H_2O_2 'e dönüşür. H_2O_2 süperoksit anyonundan çok daha uzun yarı ömre sahip olduğu için diğer hücresel bölümlere rahatlıkla dağılabilir. Bu dağılım sırasında H_2O_2 bir metal iyonunun varlığında Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu ile yarılanma ömrü en az olan (nanosaniyeler düzeyinde) hidroksil (OH) serbest radikale dönüşür. Bu kadar kısa

yarılanma ömrü olması ve bilinen herhangi bir detoksifiye edici enzimi olmayan hidroksil radikali de oksidatif hasarın maksimum düzeyde lipidler, proteinler, DNA ve karbonhidratlar gibi makromoleküller de oluşmasını sağlar. Bu nedenle sağlıklı çalışan mitokondri, hücrenin sağlığı için en önemli unsurdur. Fonksiyonel mitokondri hücrenin kaderini belirler. Mitokondri sadece hücre için gerekli ATP üretimini sağlamakla kalmaz, hücrenin apoptoza kadar gidebilen ölüm sinyallerinin başlatıcısı da olabilir (7).

2.7. Antioksidanlar

Sivakumar ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yapılan araştırmada, C2C12 hücre hattı kullanılmıştır. Bu çalışmada oksidatif stresi azaltmak için H_2O_2 uygulamadan önce antioksidan olarak sunphenon ve polyphenon kullanmışlardır. Çalışma sonucunda C2C12 hücre hattında oksidatif stres belirteçlerinin azalmasını gözlemlemişler ve böylece bu güçlü antioksidanların oksidatif strese bağlı kas atrofilerini azaltabileceğini öne sürmüşlerdir (70).

2.7.1. Mitokondriyi Hedefleyen Antioksidanlar (MTA)

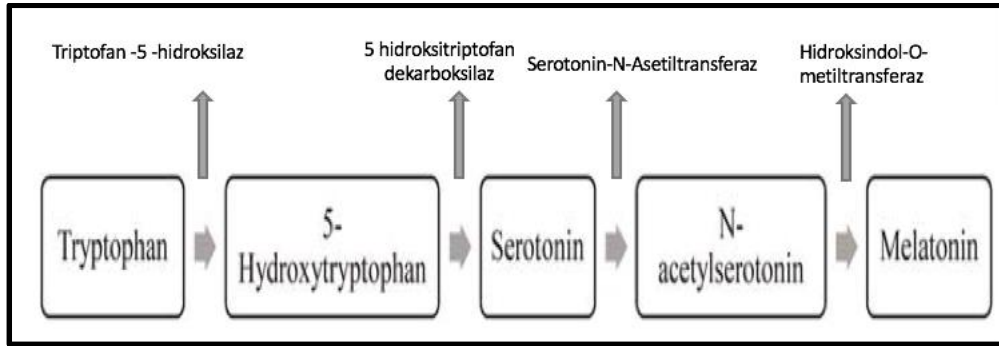
Kullanılmamaya bağlı kas atrofisinde katabolik yollar aracılığıyla mitokondrinin morfolojisi, fonksiyonu ve içeriği değişir ve bu değişiklikler ROS üretimini etkiler (2). Bu sebeple mitokondri morfolojisini ve fonksiyonunu korumak amacıyla mitokondriyi hedefleyen birçok antioksidan ajan sentezlenmiş (7) ve bu amaçla test edilmiştir (71). Ama bunların hiçbirinde beklenen tatminkâr sonuçlar görülmemiştir. Bunun başlıca nedeni bu ajanların mitokondri içine geçememesidir. Mitokondri membranı birçok maddeye sınırlı geçirgenliğe sahiptir. Çoğu durumda maddeler transmembran taşıyıcı sistem aracılığıyla mitokondrinin içine taşınırlar. Mitokondriyi hedefleyen sentetik ajanların en başarılıları olarak koenzim Q10 (MitoQ) ve mitokondri hedefli E vitamininden (MitoE) bahsedebiliriz. Bu moleküllerin membranı geçmesinde aktif antioksidan kısımların bir lipofilik *triphenylphosphonium* katyonuna kovalent olarak bağlanarak mitokondrinin zarından geçmesini sağlar. Böylece bu antioksidan moleküller birkaç yüz kata kadar mitokondrinin içinde

birikebilirler (72). Kas atrofi modellerinde en çok çalışılan bu gruptaki diğer iki antioksidan molekülde SkQ1 (10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium) ve SS-31 (d-Arg-2', 6'-dimethyltyrosine-Lys-Phe-NH₂)(Szeto-Schiller-31) dir. Bu antioksidanlar etkilerini mitokondri fosfolipidlerinden olan kardiolipinin oksidasyonunu önlemek suretiyle mitokondri hasarını önliyerek ve ROS üretimini azaltarak yaptıkları bazı araştırmalarda gösterilmiştir (73). Bu MTA'ların, hücreleri hasara karşı korudukları gösterilmiş ve klinik uygulamalara başlanmıştır (74, 75). Vücudumuzda bulunan bazı maddeler, MTA gibi mitokondri içerisinde daha fazla konsantre olabilen yapıya sahiptirler. Bunların en önemlilerinden olan melatonin 1958 yılında Lerner tarafından izole edilerek tanımlanmıştır (76).

2.7.2. Melatonin

N-asetil-5-metoksitriptamin olarak da bilinen melatonin, esansiyel bir amino asit olan triptofanın bir türevidir (76). Melatonin, beyin merkezinde bulunan epifiz bezinin nörohormonal salgısıdır (77). Sirkadiyen bir ritme sahiptir ve gece boyunca üretimi artar. Uykunun zamanlaması, kan basıncı, mevsimlik üreme ve diğer fizyolojik fonksiyonların sirkadiyen ritmlerinin senkronize edilmesinde önemli rol oynar (78, 79). Normal olarak, hayatın ilk yılında melatonin salgılaması başlar. Üç aydan önce çok düşük bir seviyede salgılanır. Sonra salgılanması ritmik olarak artarak 1-3 yılda zirveye ulaşır ve ardından yetişkinlik dönemine kadar kademeli olarak azalır (80). Melatonin lipofilik ve hidrofiliktir. Bu amfifilik özellik kan-beyin bariyerini geçmek için bir avantaj sağlar (81).

Melatonin, pinealositler tarafından aşağıdaki Şekil 2.9.'da gösterildiği gibi triptofandan başlayan serotonin ile devam eden 4 basamakta şekilde gösterilen enzimler ile sentezlenir (77).



Şekil 2.9. Melatoninin sentez basamakları.

Melatoninin pinealositler dışı başka hücrelerden de bir antioksidan ve serbest radikal temizleyicisi olarak üretildiğine dair kanıtlar bulunmuştur (82, 83). Melatonin; beyin omurilik sıvısı, tükürük, safra, sinoviyal sıvı ve anne sütü gibi tüm fizyolojik sıvılarda bulunur (84).

Melatoninin önemli koruyucu etkisi esasen serbest radikal temizleyici olarak yüksek potansiyeli, düşük toksisitesi ve su ve organik ortamlarda geçirgenliği temelinde olmaktadır (83, 85). Elde edilen sonuçlara göre melatoninin hücre koruyucu etkisinin MitoQ ve MitoE'den daha güçlü olduğu belirtilmiştir. Melatonin mitokondri içerisinde yüksek bir seviyede bulunması yanı sıra en azından bazı hücreler de mitokondri tarafından üretildiğine dayalı da bazı kanıtlar mevcuttur (86). Melatoninin mitokondri koruyucu etkisini şu mekanizmalar aracılığıyla yaptığı öne sürülmüştür (7).

1. MTA olarak belirgin radikal temizleyici etkisi.
2. Antioksidan genlerin ifadenmesini arttırması. Örnek olarak süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz verilebilir.
3. *Mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) inhibisyonu sonucu sitokrom C (cyt C)'nin sitoplazmaya geçişini engellemesiyle aktif kaspaz-3'un oluşmaması ve böylece apoptozun engellenmesi.
4. Melatonin, mitokondri iç zarı üzerindeki *uncoupling* proteinler (UCPs) üzerine bu proteinlerin gen ifadenmesini ve protein aktivitesini arttırarak daha etkili olmalarını sağlar (8). UCPs aktivitesinin artması intermembran aralıkta olan protonların mitokondrinin matriksine dönmesini sağlar. Böylece mitokondrinin

intermembran potansiyelini azaltarak elektron transport hızının artmasına ve elektron kaçağının azalmasıyla ROS üretiminin azalmasına neden olur. Melatonin düzeyinin azalmasının; felç, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi bazı nörolojik rahatsızlıkların patofizyolojisinde rol oynadığı da belirtilmiştir. Bu yüzden melatonin bu tür nörolojik bozukluklar için hiçbir yan etkisi olmaksızın, umut vaat eden potansiyel terapötik nöroprotektif ajan olarak nitelendirilmektedir (11).

Salucci ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yayınlanan makalede (87), farklı etkili mekanizmalar için seçilen çeşitli apoptotik kimyasal tetikleyicilere maruz bırakılan C2C12 hücrelerinde melatoninin uygulamasının etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada hücreler tedavi öncesi melatonine tabi tutulmuş ve sonrasında H_2O_2 , etoposide ve strusporine maruz bırakılmıştır. Bu araştırmada farklı melatonin dozları (1 mM, 500 μ M, 100 μ M, 50 μ M) 24 saat süreyle hormonun hücrelerin canlılığını ve çoğalma yeteneklerini değiştirmeden en etkin konsantrasyonunu belirtmek için kullanılmıştır. Kullanılan dozlardan en iyi konsantrasyon olarak 100 μ M belirtilmiştir. Bu nedenle Salucci ve arkadaşları bu çalışmada hücreleri tedavi öncesi 100 μ M melatonine 24 saat süreyle maruz bırakmıştır. Morfofonksiyonel ve moleküler analizlerle miyoblastlarda melatoninin oksidatif stresi önlediği ve bunun en azından bir kısmının mitokondrial yollar üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar melatoninin iskelet kas hücrelerinde bir antioksidan ve antiapoptotik molekül olarak görev yapabilme kabiliyetini doğrulamaktadır (87). Miyotüplere melatonin uygulamasının antioksidan genlerin ifadenmesini arttırarak antioksidan kapasitelerini arttırdığı ifade edilmiştir. Melatonin mitokondride kompleks I-bağlı OXOPHOS (oksidatif fosforilasyon) artırır (88). Altta yatan mekanizma bilinmemekle beraber melatoninin bu etkisi; kompleks I-bağlantılı metabolizmayla ilişkili enzimlerin aktivite ve genlerinin ifadenmelerini modüle etme yeteneği şeklinde yorumlanmıştır (89, 90). Bu bilgilerin ışığında, tez çalışmasında antioksidan olarak melatonin uygulanmasına karar verilmiştir.

2.8. Melatonin ve Kalpain Etkileşimi

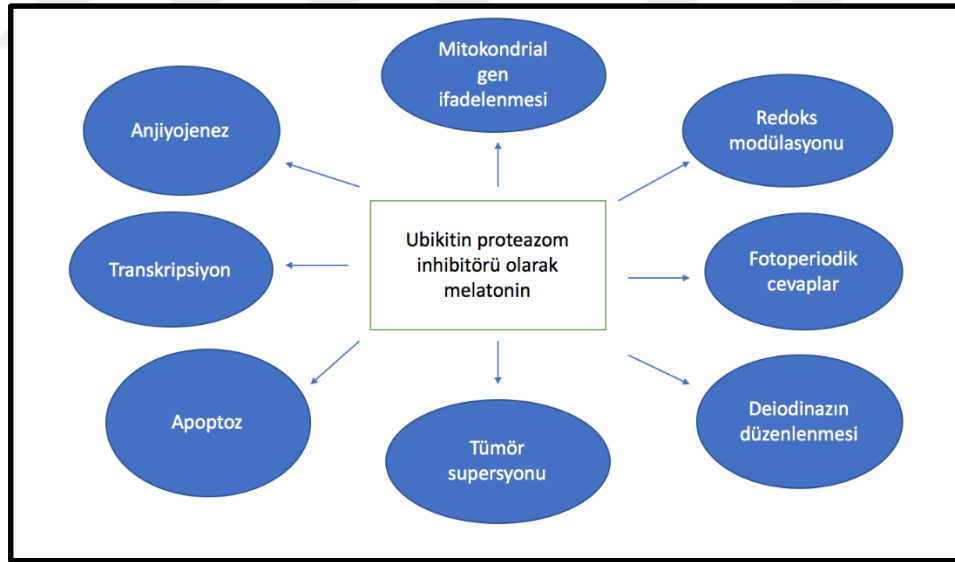
Parkinson hastalığı beynin “*substantia nigra pars compacta*” kısmında bulunan dopaminerjik nöronların zarar görmeleriyle karakterize bir hastalıktır. Düzgün ve koordineli motor hareketlerin bozulması, sertlik, titreme, bradikenezi ve denge bozukluğu gösterdiği en önemli belirtileridir (91, 92). Birçok kanıta göre yaşa bağlı gelişen Parkinson hastalığı ve oksidatif stres arasında yakın bir ilişki söz konusudur (93, 94). Farelerde, *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine* (MPTP) toksiniyle tetiklenen Parkinson hastalığında melatonin enjeksiyonu, hipokampus ve striatumda meydana gelen lipid peroksidasyonunu önleyerek nigrostriatal bölgede nöral ölümü engellemiştir (95).

Chetsawang ve arkadaşları tarafından 2017 yılında gerçekleştirilen araştırmada (11), sıçanlarda amfetamin ile indüklenen substansia nigra da meydana gelen dejeneratif süreçte kısmen kalpain-1 aktivasyonunun sorumlu olduğu ve melatoninin bu süreci tersine çevirebileceği gösterilmiştir. Amfetamin sinaptik veziküllerden dopaminin salgılanmasını uyararak merkezi sinir sisteminde dopamin düzeyini artıran bir psiko-uyarıcı olarak bu çalışmada tanımlanmıştır. Chetsawang ve arkadaşları amfetaminin uygulamasının mitokondri düzeyinde; ROS üretiminde artışın mitokondride hasara neden olarak mitokondriden sitozol içine Ca^{+2} sızıntısına neden olduğunu belirtmiştir. Sonuç olarak yüksek hücre içi Ca^{+2} düzeyi kalpain aktivasyonuna katkıda bulunabileceği sonucuna varmışlardır. Bu çalışmanın deney protokolünde farelere art arda 7 gün boyunca salin veya amfetamin uygulaması yapılmış, melatonin amfetamin uygulanmasından 30 dk önce enjekte edilmiştir. D-amfetamin uygulanmasından önce melatoninle ön tedavinin kalpainin protein düzeyinde oluşturduğu etki western blot analizi kullanarak belirlenmiştir. Bu çalışmada sonuç olarak, D-amfetamin uygulamasının, kalpain miktarında anlamlı bir artışa sebep olduğu, ancak D- amfetamin uygulanmasından önce melatonin ile ön tedavinin, kalpain miktarını önemli ölçüde azalttığı ortaya konmuştur. Melatonin tek başına, bu çalışmada kontrol grubuna kıyasta fare beyninin siyah maddesinde kalpain miktarında değişikliğe sebep olmamıştır. Melatoninin, amfetaminin substansia nigra da indüklediği hücre ölüm yolağındaki koruyucu etkisi, kalpastatin miktarının

onarımı ve kalpain düzeyi ve aktivasyonun azalmasına bağlı olduğu ifade edilmiştir. Melatoninin koruyucu etkisi büyük ihtimalle antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Burdaki mekanizmanın, melatonin uygulamasının ilk önce amfetaminin nöron hücrelerindeki yarattığı oksidatif stresi azaltması, sonrasında bunun neticesinde sitozolde oluşan Ca^{2+} homestazı ile kalpain aktivasyonunu engellediği şeklinde yorumlanmıştır (11).

2.9. Melatonin ve Proteazom İnhibitörü Etkileri Arasındaki Benzerlik

Melatonin brotezomib gibi proteazom inhibitörleriyle birçok benzer özelliğe sahiptir(12). Melatonin bir protein kinaz olan AKT'nin aktivitesini düşürür (96), anjiyojenik faktörün aktivitesini düşürür, VEGF (97) ve transkripsiyon faktörü Nrf-2'yi aktive eder (98). Bu etkilerin hepsi proteazom inhibitörleri tarafından da gösterilmektedir (99). Melatoninin, ubiquitin–proteazom yolağının bir inhibitörü gibi gerçekleşen aktiviteleri Şekil 2.10.'da gösterilmektedir (12).



Şekil 2. 10. Melatoninin Ubiquitin-Proteazom Yolak inhibitörü benzeri işlevleri.

2.9.1. Melatonin Etkileri İçin Ubikitin-Proteazom Hipotezi

Vriend ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılan bir çalışmada melatoninin genel hücresel etkisini ubikitin-proteazom yolağı vasıtasıyla yaptığı hipotezi ifade edilmiştir. Melatoninin proteinlerin hücresel işlemleri için gereken ubikitin aktivasyonunu proteazomun inhibisyonu üzerinden modüle ettiği belirtilmiştir. Ubikinasyonun melatoninin antioksidan etkilerini göstermesinde etkili olduğu görülmektedir. Eğer melatonin proteazom üzerinde genel bir etkiye sahipse, p53, VEGF, Bcl-2, BAX ve AKT1 gibi bir dizi sinyal iletim proteinlerinin hücresel miktarını modüle etmesi beklenmektedir. Bu çalışmada ifade edildiği gibi bu hipotez teyit edilirse melatoninin birçok sistem üzerinde gerçekleştirdiği etkilerini ubikitin-proteazom yolağı aracılığıyla gösterdiği ispat edilirse melatonin klinik olarak proteazom inhibitörlerine cevap veren hastalıklarda kullanılabileceği olasıdır (12).

2.10. Melatoninin Prooksidan Etkisi

Görünüşe göre melatoninin antioksidan etkisi, fizyolojik ve farmakolojik etkilerinin sadece bir kısmını oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra insan lösemik Jurkat hücre hattında melatoninin μM ve mM konsantrasyonlar arasında önemli prooksidan aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır. Glutasyon miktarı azalan hücrelerde melatoninin antioksidan etkisinden ziyade prooksidan etkisinin öne çıktığı ifade edilmiştir. Bu veriler melatoninin hücrenin redoks dengesinde önemli bir rol oynadığını ama bunun için antioksidan etkinin şart olmadığını belirtmektedir (100). İnsan hepatosit hücre hattında (HepG2), melatoninin 0.1-10 μM konsantrasyon aralığına 24 saat süreyle maruz bırakıldığı zaman görülen antioksidan etkisi, hücre içi GSH (azalmış glutasyon) düzeyini arttırması ve buna bağlı hücre canlılığını arttırmasına bağlanmıştır. Buna karşın hücreler aynı melatonin konsantrasyonuna 96 saat süreyle maruz bırakıldıkları zaman hücre canlılığının anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir. Gene bu çalışmada hücreler melatoninin yüksek konsantrasyonlarına (1000-10,000 μM) maruz bırakıldıktan 15 dakika sonra GSH'ın azaldığı ve buna bağlı hücre canlılığının anlamlı olarak düştüğü ortaya konmuştur. Bu çalışmada melatoninin bu çift etkisi inkübasyon

süresi ve konsantrasyona bağlı değişmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada artan maruziyet süresi veya artmış konsantrasyonda melatoninin antioksidan etkisinin prooksidant etkiye değişebileceği ifade edilmiştir (9).

2.11. İskelet Kası Çalışmalarında Kullanılan Deneysel Modeller

2.11.1. *In vivo* Modeller

İskelet kası atrofi çalışmalarında fare ve sıçan modelleri çoğunlukla kullanılmaktadır.

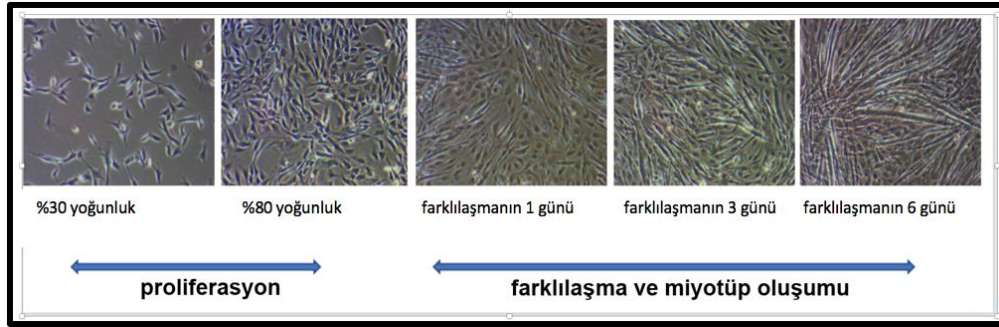
Örnek olarak, kalpastatini aşırı ifade eden genetik modifikasyona uğramış transgenik farelerde kalpainlerin kas atrofisinde rol oynadığı gösterilmiştir (37, 101).

2.11.2. *In vitro* Modeller

C2C12 Hücre Hattı Kültürü

C2C12 hücre hattı C3H farenin ezilme yaralanmasından sonra, uyluk kasından kültüre edilen miyoblastların seri pasajlanmalarından üretilen bir alt klondur (102). C2C12 hücreleri yüksek serum içeren besiyerlerinde kolayca çoğalırlar. Hücre yoğunluğunun % 80'in üzerinde olduğu, hücrelerin birbiri ile temas kurduğu koşullarda, düşük serum besiyerlerine geçilirse farklılaşmaya uğrarlar. Bu hücreler kontraktıl miyotüpler ve karakteristik kas proteinleri üretme kapasitesine sahiptirler (103).

C1C12 hücrelerinin saf bir hücre hattı olması, çabuk farklılaşmaları ve kasılabilir kas lifleri oluşturdıklarından dolayı *in vitro* değişik kas hastalık modellerini oluşturmak için birçok araştırmacı tarafından bu hücre hattının tercih edildiği görülmektedir. C2C12 hücre hattının proliferasyon ve farklılaşma süreci Şekil 2.11 gösterilmiştir.



Şekil 2.11. C2C12 hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşma süreci.

2.12. Amaç ve Hipotez

2.12.1. Amaç

Biz çalışmamızda atrofi modeli oluşturmak için literatürde kullanıldığı gibi C2C12 fare miyoblast hücre hattı kullandık ve oksidatif stres oluşturma amacıyla H_2O_2 'den yararlandık. Melatonin kas atrofisini önlemede etkinliği gösterilen ve mitokondride konsantre olan bir antioksidandır. Bununla birlikte yapılan bazı *in vitro* çalışmalarda melatonin çift etkisi olduğu ve bazı hücre hatlarında prooksidan etki gösterdiği belirtilmiştir. Oksidatif stres ile aktive olan temel proteazın kalpain-1 olduğu gene literatürde ortaya konmuştur. Bu çalışmada melatonin tedavisi ile kalpain-1 ifadenmesinin ne derecede değiştiği C2C12 fare miyoblast hücre hattında ortaya konacaktır. Bunun yanı sıra melatoninin etkisini gösterirken antioksidan ya da prooksidan etki gösterme durumu hücrenin total antioksidan ve oksidan kapasitesi ölçülerek ortaya konmaya çalışılacaktır. Oksidatif strese bağlı kas atrofisinin önlenmesinde de melatoninle yapılan ön uygulamanın morfolojik değişiklikleri ne ölçüde etkilediğide bu çalışma ile ortaya konmuş olacaktır.

2.12.2. Hipotez

- 1) Melatonin uygulaması kalpain-1 ifadenmesini oksidatif strese maruz kalan C2C12 fare miyoblast hücrelerinde değiştirmez.
- 2) Melatoninin dışardan uygulanmasının oksidatif strese maruz kalan fare kas hücrelerinde oluşan atrofik morfolojiyi etkilemez.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızdaki hücre kültürü çalışmaları kontaminasyonu önleyici uygun çalışma teknikleri ile Fizyoloji Anabilim Dalı moleküler-hücre laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereçler

3.1.1. Hücre Kültürü

C2C12 fare miyoblast hücre hattı

Dublecco's Modified Eagle' Limiting Medium (Thermofisher, Cat #LSG 300-30)

Fetal Dana Serum (FBS) (Thermofisher)

At serumu (Thermofisher, Cat # 26050088)

Penisilin-Streptomisin (P/S) (Thermofisher, Cat #15140122) (10,000U/ML)

L-Glutamin 100X (Thermofisher, Cat #25030081)

PBS (*Phosphate buffered saline*) tabletleri (Bioshop, Cat #PBS404.100)

Hücre kültürü sınıfında DMSO (Applichem)

Trypsin-EDTA (1X) (Gibco by life technologies)

DAPI (4,6- diamidine-2'-phenylindole) (1mg/ml stok)

Hücre biyogüvenlik kabini (TEKNOMAR, Model: CHEMOCELL LRCX-UV)

Altan objektifli mikroskop (Nikon, ECLIPSE TS100)

Nemli CO₂ inkübatörü (Panasonic, Model: MCO-18ACL-PA)

Soğutmalı santirfüj (Kubota, Model: 5500)

Üstten objektifli mikroskop (Leica, Model:DM2000 LED)

Hücre kültürü flasksı, steril (Sastedet, 75Cm²)

Hücre kültürü flasksı, steril (Sastedet, 25Cm²)

3.1.2. Hücre Canlılık Testi

Tripan mavisi boyası (Thermofisher, Cat #15250061)

Neubauer Lam (Superior, Cat #C964110)

3.1.3. MTT Yöntemi

Vybrant™ MTT Cell Proliferation Assay Kiti

- MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)
- Hidroklorik asit (37% ultra saf) (Merck, Cat #K01223014)
- Mikroplate okuyucusu (Molecular Devices, SpectraMax Plus 384 Microplate Spectrophotometer, S/NP 02695)

3.1.4. Hücrelere Kimyasalların Uygulanması

Melatonin (Sigma, Lot:46H0416)

Hidrojen Peroksit 30% (Merck, Cat #1.07209.1000)

Etil alkol (96%)

Ultra hassas terazi (SHIMADZU)

Deiyonize su (ddH₂O)

3.1.5. Miyotüp Çap Ölçümü

National Institute of Health USA, IMAGEJ programı (JAVA 1.8.0 -161)

Toupcam Dijital kamera (TOUPTEK PHOTONICS, P/N:TP105100A)

ToupView 3.7 programı (Toup Tek- Toup View, Version: x64, 3.7.4460)

3.1.6. Protein İzolasyonu

Lizis Buffer Tris (Bio-Rad, Cat #161-0719) (50 Mm, PH: 6.8)

NaCl (J.T.Baker, Lot: 1412501831) (150 mM)

Triton X-100 (1%)

EDTA (1.5 mM)

SDS (Bio-Rad, Cat#161-0301) (0.01%)

DTT(dithiothreitol) (Thermofisher, CAT#R0861, 1µm)

Proteaz inhibitör tablet (Roche, 04693159001)

3.1.7. Protein Miktar Tayini

Bradford Quick Start protein tayin kiti, (Bio-Rad, CAT#500-0206)

96-kuyulu plaka (Sastedet)

Çok kanallı Pipet

Mikropalet okuyucusu (Spectramax M2)

3.1.8. Western Blot

Stain-Free Precast Gels (BIO-RAD, Mini-PROTEAN TGX, Cat # 456-8093)

10x *Running buffer*(Tris/Glisin/SDS) (Biorad, Cat#161-0732)

PBS- T (%0,05):

Tween -Twenty (Bio-Rad, Cat#170-6531)

PBS (BIOSHOP, Cat# PBS404.100)

2X *Lamelli sample buffer* (Bio-Rad, Cat#161-0737)

B-merkapttoethanol (Bio-Rad, Cat#161-0710)

Ponceau S solüsyonu (Advansta, Cat #R-03021-D50)

Western blot filtre kağıdı (20cm x 20cm)

Bromofenol mavisi (Sigma, Cat #B0126-25gr)

1-Butanol (Sigma, Cat #B7906-500ml)

Anti-Calpain 1 large subunit antikor (Thermofisher (Invitrogen), Cat # PA517547)

Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary antikor, HRP ile bağlı (Thermofisher, Cat #31460)

Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad, Cat #170-6404)

Precision Plus Protein™ unstained protein standards Ladder (Biorad Cat#1610363)

Clarity ECL Substrate (Biorad, Cat#17-5060)

Elektroforez ve Transfer Cihazları:

lektroforez cihazı (Bio-Rad)

Trans Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Cat# 170-4155)

Jel ve Blot Görüntüleme:

ChemiDoc XRS *with Image Lab Software (Bio-Rad, Serial No: 721BR12528)
Image Lab Software 5.2.1 Version (Bio-Rad, Hercules CA / ABD)

3.1.9. TAS ve TOS Ölçümleri

Total Antioksidant Status (TAS) Kiti (Rel Assay Diagnostics, Cat#RL0017)

Total Oksidant Status (TOS) Kiti (Rel Assay Diagnostics, Cat#RL0024)

3.2. Yöntemler

3.2.1. C2C12 Hücrelerinin Çoğaltılması

C2C12 hücreleri, Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Doç.Dr. Burcu Hayta'nın cömert bağıışı ile temin edilmiştir. Hücreler Dr. Hayta tarafından ATCC firmasından temin edildikten sonra antibiyotikli besiyerinde beş pasaj çoğaltılarak sıvı nitrojen içinde dondurularak saklanmıştır. Bu kıymetli bağıış ile temin edilen dondurulmuş stok hücreleri sekizinci pasaja kadar yeterli hücre elde edilmek amacıyla uygun besiyeri içinde (% 10 FBS+% 1 L-glutamin + % 1 Pensilin/Streptomysin içeren DMEM) çoğaltıldı ve aşağıda ayrıntısı ifade edildiğı gibi kullanılıncaya kadar vial içinde dondurularak saklandı.

Hücreler her işlemten önce Nikon alttan objektifli mikroskopta incelenerek morfolojileri ve yoğunluğu gözlemlendi. Her pasajlamadan önce Tripan mavisi aracılığıyla hücreler boyanarak sayım yapıldı ve canlılık oranları tespit edildi. Canlılık oranları % 90 ve üzeri olan hücrelerle deneylere devam edildi.

Hemositometrede Hücre Sayımı

Hemositometrenin (Neubauer lam) sayma bölmesinin içinde olan farklı bölgelerden 1 mm²' lik 5 adet kare seçilip hücreler sayılarak ortalaması alındı. Sonrasında bulunan hücre sayısı aşağıdaki denklem kullanılarak toplam hücre sayısı şeklinde hesaplandı.

Toplam Hücre Sayısı = Ortalama Hücre Sayısı x Sulandırma faktörü x 10⁴ x Hacim

Tripan Mavisi ile Hücre Canlılık Testi

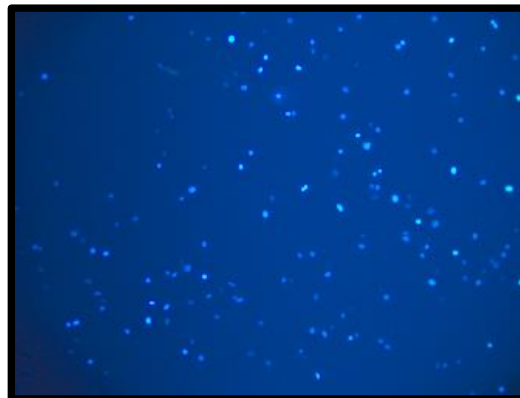
Tripan mavisi ölü hücrelerin belirlenmesi için kullanılan bir boya türüdür. Bu boyanın çalışma prensibi şöyle açıklanabilir. Boya negatif yüklüdür. Sağlıklı hücrelerde membranlarının dış yüzeyindeki glikokaliks tabakası negatif olduğu için boya bu hücrelere giremez. Sonuçta; sağlıklı hücreler tripan mavisi ile boyanmazken ölü hücreler maviye boyanır.

Kısaca bu test şu şekilde uygulandı.

- Hücreler 1X PBS' le 2 kere yıkandıktan sonra tripsinize edilip bir falkon tüpe alındı.
- 1X PBS içinde tripan mavisi %0,4'lük bir solüsyon olarak hazırlandı.
- Falkon içerisinden alınan hücre karışımı 1:1 oranında tripan mavisi ile karıştırıldı.
- Canlı hücrelerin mililitredeki toplam sayısını boyanmayan hücreler şeklinde kabul edildi. Canlı hücrelerin yüzdesini hesaplamak için:

Canlı hücreler (%) = (Canlı hücrelerin mililitredeki toplam sayısı/ Tüm hücrelerin mililitredeki toplam sayısı) x 100

Kriyotüp yaklaşık 1 milyon hücre olacak şekilde stok olarak hazırlanan C2C12 hücreleri dondurulmadan önce DAPI boyası ile mikoplazma enfeksiyonunu çağrıştıracak görüntü olup olmaması yönünden test edildi(Şekil 3.1)..



Şekil 3.1. C2C12 Hücrelerinin DAPI boyaması sonrası florans altında mikroskopik görüntüleri.

DAPI Boyama Protokolü

- 1µl DAPI boyası, 1ml 1x PBS'le iyice pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- 1x PBS'le hücreleri yıkadıktan sonra, üzerine 1µl DAPI/1ml PBS solüsyonu eklendi ve 5 dakika beklendikten sonra, Leica üstten objektifli mikroskopa DAPI filtresiyle hücreler incelendi.
- Hücrelerde kontaminasyonu gösteren hücre harici bir nükleus boyaması mikoplazma kontaminasyon bulgusu olarak değerlendirecekti.

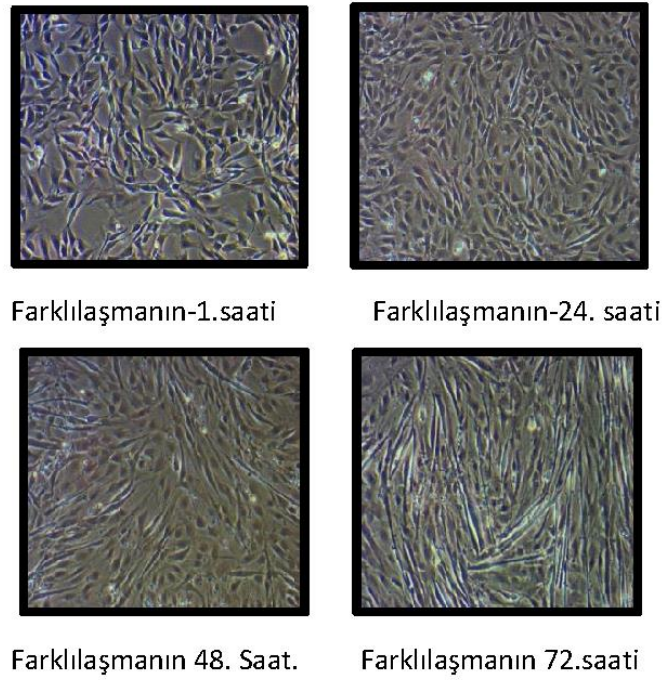
Çalıştığımız hücrelerin hiçbirinde böylesi bir kontaminasyon bulgusu tesbit edilmedi.

Dondurulmuş Stok C2C12 Hücrelerinde Sağlıklılık Testi

Çoğaltılarak 8. pasajda dondurulan viallerden bazıları aynı dondurmaya maruz kalan diğer viallerdeki hücreleri test etme amacıyla, normal proliferasyon ve farklılaşmaları yönünden deney protokolümüze uygun olacak şekilde test edildi.

C2C12 Hücre Farklılaşma Protokolü

- Hücrelerin alttan objektifli mikroskopa %70-80 yoğunluğa ulaşmış olup olmadığı incelendi.
- 1X PBS' le 2 kere hücreler yıkandıktan sonra flastaki besiyeri farklılaşma besiyeri ile değiştirildi (% 1 L-Glutamin, % 1 P/S, % 2 At serumu, % 96 DMEM).
- Mikroskopa her gün takibi yapılan hücrelerimizin farklılaşma besiyeri sonrası 24. saatte miyotüp oluşturmaya başladığı gözlemlendi. Hücre besiyeri 24-48 saate bir değiştirildi (farklılaşmanın altıncı gününün sonuna kadar). Üstte belirtilen basamakların her aşamasında hücrelerin fotoğrafları çekildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. C2C12 Hücrelerinin farklılaşması ve miyotüp oluşumunun başlaması.

Hücre Sayısının Optimizasyonu

MTT yöntemi ve sonraki deneylerde kuyulu plakalar için hangi yoğunlukta hücre ekmemiz gerektiğini belirlemek için, 1 adet 6-kuyulu plakaya hücreler literatür bilgilerine uygun olarak ekildi. Hücrelerin sağlıklı şekilde %70-80 yoğunluğa ulaştıkları zaman en ideal koşul olarak belirlendi. Bu amaçla başlangıçta her bir kuyucuğa 125,000 hücre ekildi. Hücre optimizasyonu için tasarlanan 6-kuyulu plakaya ekilen hücre sayısı Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Tablo 3.2 de üretici firmanın belirttiği değişik plaka yüzey alanları değerleri kullanılarak deneylerimizin yapıldığı 96-kuyulu plakaya ekilmesi gereken hücre, 6-kuyulu plakaya ekilen hücrelerimizden elde edilen sonuçlarımız kullanılarak, 4000 hücre olarak hesaplandı.

Tablo 3.1. Hücre sayısının optimizasyonunun 6-kuyulu plaka için tasarımı.

25 x 10 ³	50 x 10 ³	75 x 10 ³
100 x 10 ³	125 x 10 ³	150 x 10 ³

Tablo 3.2. Hücre kültürü flaskları ve kaplarının taban yüzey alanlarının hesaplanması için kullanılan firma tablosu.

Kültür Kabı	Yüzey Alanı (cm ²)	Hacim (ml)	6 – Kuyulu plaka Oranı		
6 – Kuyulu Plaka	10	2	1		
96 – Kuyulu Plaka	0.3	0.2	0.03		

3.2.2. C2C12 Hücrelerine Melatonin ve H2O2 Uygulanmadan Önce MTT Yöntemi Aracılığıyla IC50 Değerlerinin Belirlenmesi

Bir tetrazolyum tuzu olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) sarı renkli olup, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller oluşmaktadır. Kristaller, DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözülür. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans verir. Böylece indirekt olarak hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülür. Ayrıca ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir (104-106).

IC50 değeri : Yarı maksimum inhibe edici konsantrasyon (IC50), belirli bir biyolojik veya biyokimyasal fonksiyonun inhibe edilmesinde bir maddenin etkililiğinin bir ölçüsüdür. Bu niceliksel ölçüm belirli bir biyolojik işlemi yarıya kadar inhibe etmek için belli bir ilacın veya inhibitörün ne kadarının gerekli olduğunu belirtir. Değerler tipik olarak molar konsantrasyon olarak ifade edilir.

MTT yöntemi için, melatonin 50 mg/ml %95 saf etanol içerisinde çözüldükten sonra, uygun konsantrasyonda stoklar distile su ile dilüe edilerek hazırlandı. Ayrıca

H₂O₂ için de stok solüsyonu uygun molaritede distile su içerisinde dilüe edilerek hazırlandı.

Deneyler Thermofisher firmasından temin edilen *Vybrant MTT Cell Prolifration assay* Kit protokolüne uygun olarak tasarlandı.

MTT yöntemi ile melatonin ve H₂O₂'in deneylerimizdeki uygulama dozlarının öldürücü etkisinin IC50 değerlerinin altında olduğunu göstermek amacıyla Tablo 3.3'de belirtildiği gibi 96-kuyulu plakaya değişik konsantrasyonlarda melatonin ve H₂O₂ uygulandı. Bunun neticesinde deneylerimizde kullanılmasına karar verilen 100 µM melatonin, 50 µM H₂O₂ konsantrasyonlarının literatürle de uyumlu olduğu gösterildi.

Tablo.3.3. MTT deneyinin 96-kuyulu plakada tasarımı.

Mel -10mM	Mel -5mM	Mel -1mM	Mel -100µM	Mel -10µM	H2O2 -1mM	H2O2 -500µM	H2O2 -100µM	H2O2 -50µM	H2O2 -10µM
Mel -10mM	Mel -5mM	Mel -1mM	Mel -100µM	Mel -10µM	H2O2 -1mM	H2O2 -500µM	H2O2 -100µM	H2O2 -50µM	H2O2 -10µM
Mel -10mM	Mel -5mM	Mel -1mM	Mel -100µM	Mel -10µM	H2O2 -1mM	H2O2 -500µM	H2O2 -100µM	H2O2 -50µM	H2O2 -10µM
Mel -10mM	Mel -5mM	Mel -1mM	Mel -100µM	Mel -10µM	H2O2 -1mM	H2O2 -500µM	H2O2 -100µM	H2O2 -50µM	H2O2 -10µM
Mel -10mM	Mel -5mM	Mel -1mM	Mel -100µM	Mel -10µM	H2O2 -1mM	H2O2 -500µM	H2O2 -100µM	H2O2 -50µM	H2O2 -10µM

Vybrant MTT Cell Prolifration Assay Kiti protokolü üretici firmanın önerdiği şekilde yapıldı.

3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulama Planı

- 1) Kontrol grubu: Kontrol amaçlı hiçbir uygulama yapılmayan C2C12 hücre grubu.
- 2) Melatonin grubu: Melatonin uygulanan C2C12 hücre grubu.
- 3) H₂O₂ grubu: H₂O₂ uygulanan C2C12 hücre grubu.
- 4) Melatonin+H₂O₂ grubu: Melatonin ve H₂O₂ uygulanan C2C12 hücre grubu.

Melatonin ve H₂O₂ tedavi uygulaması

MTT deneyi sonucu literatürle uyumlu bulunan dozlarda melatonin ve H₂O₂ uygulamaları aşağıda açıklandığı şekilde yapıldı:

Melatonin Uygulaması

- Farklılaşmanın 4. gününde.
- Melatonin 100 µM konsantrasyonda, 24 saat süreyle uygulandı (120-144 saatleri arası).
- Uygulanan gruplar Melatonin ve (Melatonin+H₂O₂) Grupları

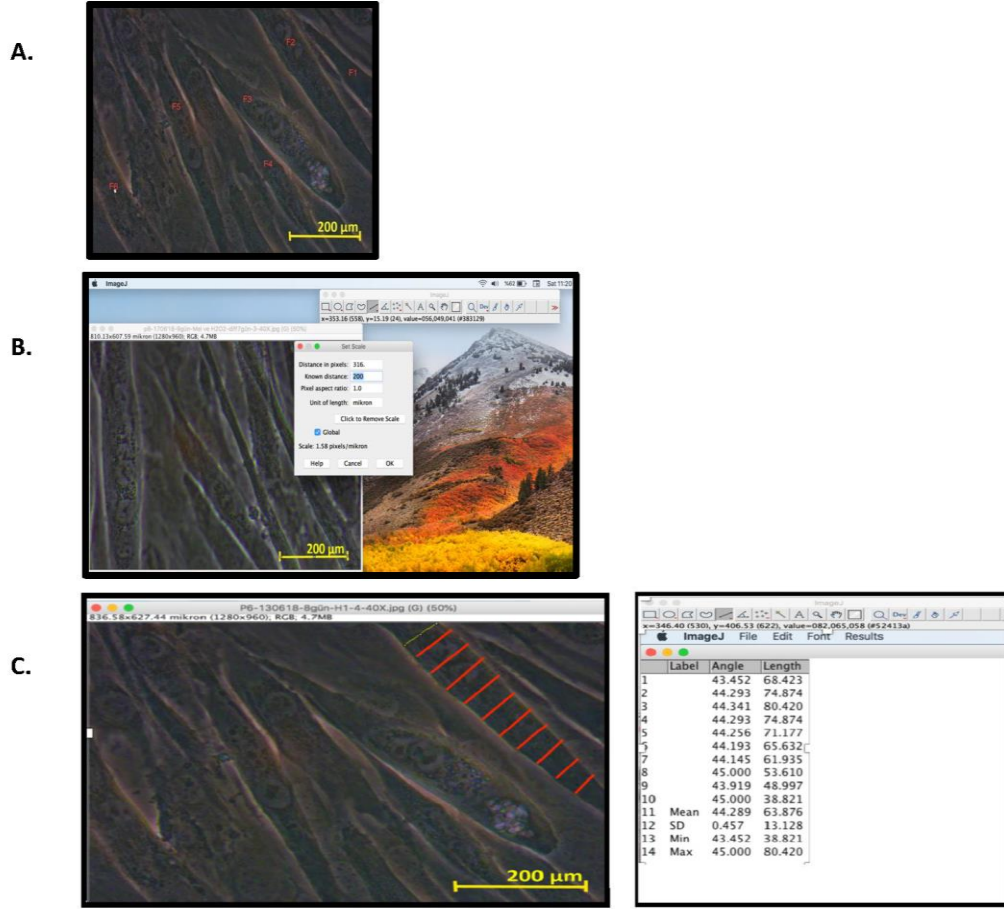
H₂O₂ Uygulaması

- Farklılaşmanın 5 gününde.
- H₂O₂ 50 µM konsantrasyonda, 24 saat süreyle uygulandı (144-168 saatleri arası).
- Uygulanan gruplar H₂O₂ ve (Melatonin+H₂O₂) Grupları

3.2.4. Image J Programıyla Miyotüp Çapı Ölçümü

Image J yazılımı NIH bünyesinde olan bir görüntü analiz programıdır. Bu yazılım farklı bilim dallarında, şekil parametrelerin belirlenmesi ve atrofiyi belirtmek için miyotüp çapı ölçümü amacıyla kullanılmaktadır (107). Miyotüp çapı ölçümü için farklılaşmanın 6.gününün sonunda 40X büyütmede deneyde bulunan 4 grubun her birinden flaskların birbirinden uzak rastgele değişik alanlarından 9 adet fotoğraf çekildi. Tezde kullanılan bu resimlerin altına 200 µm'ye karşılık gelen ölçek konuldu. Fotoğraflarda sınırları belli olan miyotüp parçaları (Şekil 3.3, A – Miyotüpler, Fiber olarak belirtilmiştir) numaralandırılarak seçildi. Image J programı indirildikten sonra bu program aracılığıyla ölçüm yapmak için fotoğraf dosyasından ilgili fotoğraf yüklenmesi yapıldı. Image J programında ölçek uzunluğu 200 µm olarak tanımlandı (Şekil 3.3, B) fotoğraflarda mikroskop alanına düşen her bir miyotüp (fiber) parçasının uzunluğu % 100 kabul edilerek 10 eşit parçaya bölündü (Şekil 3.3, C). Bu parçalar miyotüp (fiber) uzunluğuna dik açıda olan, enine kesit (uzunluk) eşdeğeri ve enine

açıları (resmin çerçevesi referans alınarak) program aracılığıyla oluşturuldu, bu ham veri Microsoft Excel programına aktarılarak hesaplamalarda kullanıldı.



Şekil 3.3. Image J programı ile morfolojik ölçüm.

- A.** Farklılaşmanın 6. gününün sonunda 40X büyütmede çekilen her mikroskop alanında, sınırları belirgin olan miyotüp parçaları şekilde görüldüğü gibi numaralanarak seçildi.
- B.** Image J programında ölçek uzunluğu 200 µm olarak tanımlanarak programdaki ölçümlerin bunu esas alarak hesaplanması sağlandı.
- C.** Her bir miyotüp parçasının uzunluğu şekilde görüldüğü gibi % 100 kabul edilerek 10 eşit parçaya bölündü. Bu parçalar fiber uzunluğuna dik açıda olan, enine kesit (uzunluk) eşdeğeri ve enine açıları (resmin çerçevesi referans alınarak) program aracılığıyla oluşturuldu. Hesaplamaların hepsi yapıldıktan sonra enine kesitlerin uzunluklarının ortalaması alındı ve tümünün ortalaması grubun ortalaması olarak kabul edildi.

3.2.5. C2C12 Hücrelerinden Protein İzolasyonu

C2C12 hücrelerinin farklılaşmasının fotoğraflanmasını takiben 25 cm²'lik flasklar içinde yer alan hücrelerden total protein lizatları aşağıda ana hatları ile bahsedildiği şekilde elde edildi.

Hücreler'in 1XPBS ile yıkanmasını takiben, tripsinasyon sonrası hücre peleti oluşturuldu. Sonrasında lizis tamponu ile muamele edilen hücreler santrifüj sonrası supernatani alınarak total protein lizat (TPL) olarak -20°C derecede analizler için saklandı. TPL'lar aşağıdaki gibi etiketlendi.

K (TPL) = Kontrol grubu total protein lizat.

M (TPL) = Melatonin grubu total protein lizat.

H (TPL) = H₂O₂ grubu total protein lizat.

MH (TPL) = Melatonin + H₂O₂ grubu total protein lizat.

3.2.6. Bradford Yöntemi Kullanılarak TPL Protein Konsantrasyonlarının Belirtilmesi

Bradford Bio-Rad Quick start protein assay kitinin protokolünde belirtildiği gibi BSA standartları 2000 µg/ml'lik stok solüsyonundan hazırlandı. Kullanılan standart konsantrasyon aralığı kitte ifade edildiği gibi 1.25- 20 µg/ml olarak oluşturuldu.

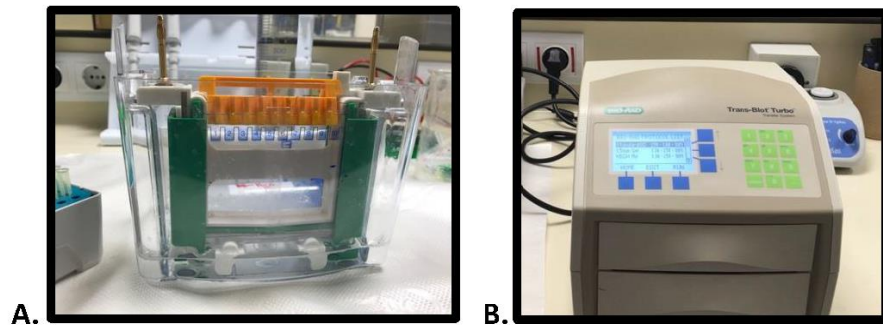
Deney gruplarımızdaki (K, M, H, M+H) TPL protein konsantrasyonlarının kullanılan kitte belirtilen ölçülebilir lineer aralığa gelmesi için farklı dilüsyonlar denendi (Ör. 100, 150, 200 kat dilüsyon). Gruplarımızın TPL dilüsyonları 200 kat dilüsyon ile bu aralığa ulaştığı için protein konsantrasyon tayinleri için bu dilüsyon kullanıldı.

3.2.7. Western Blot

Western Blot testi moleküler biyolojide protein solüsyonunda aranan bir proteinin olup olmadığını ve varsa ne kadar olduğunu anlamak için kullanılan bir yöntemdir. *Western blot* tekniği, antikor tespitinin özgüllüğü ile jel elektroforezinin rezolüsyonunu bir araya getiren bir yöntemdir.

Western blot yöntemi ana hatları ile aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

- Kullanılan protein konsantrasyonlarını eşitlemek için sulandırılan TPL 2XLaamelli *buffer* içinde bire bir karıştırıldıktan sonra % 1-2 oranda - β -merkaptoethanol eklendi.
- Her bir grup için hazırlanan örneklerdeki proteinlerin denatürasyonunu sağlamak için yukarıdaki karışım 95°C'de 5 dakika bekletildi.
- Hazır *precast stain free gel*'e örnekler total hacimleri 28 μ l olacak şekilde yüklendi. Ayrıca protein işaretleyicisi olarak *Precision Plus Protein Standards*, *Unstain* iki ayrı kuyucuğa 15 μ l olarak yüklendi.
- Elektorforez cihazıda 150 V sabit voltajda 10x *Running buffer*'dan hazırlanan 1X *Running buffer* içinde 60 dakika yürütüldü.
- İki ayrı protein konsantrasyon seti şeklinde hazırlanan örnekler (4,5 ve 13,5 μ g/kuyucuk) jelde yürütüldükten sonra PVDF membrana *Trans Blot Turbo Transfer System* kullanılarak bizim kullandığımız hazır jel için önerilen "*Mixed MV, 25 V, 7 min*" ayarında transfer (*Semi dry transfer*) edildi. Şekil 3.4'de Protein örneklerinin jelde yürütülmesi ve PVDF membrana transferi gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Protein örneklerinin jelde yürütülmesi (A) ve PVDF membrana transferi (B).

- Jel Bio-Rad görüntüleme cihazında görüntülendi ve transfer verimliliği jelde protein kalmaması ile doğrulandı.
- Bio-Rad *precast stain free gel*'den PVDF membrana transfer olan total proteinler, UV ışık ile 1 dakika aktive edildikten sonra total protein normalizasyonunda (TPN) kullanılacak olduğu için Biorad görüntüleme cihazının kemiluminesans ayarında görüntülendi.
- *Stain free* teknolojisi, *stain free* hazır jellerde mevcut olan bir kimyayı kullanması nedeni ile ayrıca bir boyama veya işaretlemeye gerek duymadan protein bantlarını görüntülemeye izin vermektedir. Bu özelliğin nedeni; *precast stain free gel*'ler içinde trihalo bileşiği olacak şekilde hazırlanmasıdır. Bu bileşik ultraviole (UV) ışınlarına maruz kalınca triptofan kalıntıları ile kovalant bir bağ oluşturularak ışımaya yapar ve uygun görüntüleme sistemleriyle jel ve proteinin membranlarında tüm protein bantlarında herhangi başka bir boyama veya antikor işaretlemeye gerek duymaksızın ışımaya verir (108).
- Proteinlerimizin transfer olduğu PVDF membran PBS içinde hazırlanmış %5'lik *Blotting-Grade Blocker (Nonfat dry milk)* ile spesifik olmayan antikor bağlanmasını önlemek için oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat bloklama yapıldı.
- Bloklamadan sonra PVDF membran primer Kalpain 1 antikorunun 1/1000'lik dilüsyonunda PBS içinde hazırlanmış %2,5 *non fat dry milk*'de gece boyu +4°C'de karıştırıcı üzerinde inkübe edildi.
- Sonrasında PVDF membran 3 kez PBS-T ile 10'ar dakika oda ısısında karıştırıcı üzerinde yıkandı.
- Yıkama işlemi sonrası PVDF membran sekonder antikorun 1/10000'lik dilüsyonunda PBS içinde hazırlanmış %2,5 *non fat dry milk*'de 2 saat süreyle oda sıcaklığında, karıştırıcı üzerinde antikorla inkübe edildi.
- HRP ile bağlı sekonder antikor uygulaması sonrası PVDF membran 3 kez PBS-T ile 15'er dakika oda ısısında karıştırıcı üzerinde yıkandı.
- *Clarity Western ECL substrate* kit içindeki *lumino enhancer* solüsyonu ve peroksit solüsyonu yarı karanlıkta, bire bir karıştırıldı ve membran üzerine

kaplayacak şekilde pastör pipetlerle membranın kenarından membran üzerine yayıldı. Membran 4 dakika bekletildikten sonra membran Birad görüntüleme cihazında UV transluminatörün üzerine konuldu ve pozisyon ayarından sonra uygun görüntü çekildi.

- Bantların görüntülenmesinde *Image Lab* yazılımı kullanıldı ve bantların AOD'leri (*Arbitrary Optic Density*) ölçüldü.
- *Stain-Free* teknolojisinin sağladığı TPN metodu kullanılarak normalizasyon gerçekleştirildi (109). Kısaca, elde edilen Kalpain-1 protein bantlarının her birinin AOD'leri o bantın içinde yer aldığı hattaki *stain free gel* ile ölçümü yapılan total protein miktarına göre TPN metoduna göre normalizasyonu yapılarak o deney grubunun relatif Kalpain-1 protein miktarı değeri elde edildi.

3.2.8. TAS ve TOS Kitleri ile Yapılan Oksidan ve Antioksidan Seviye Ölçümleri

TAS kitinin çalışma prensibi:

ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*) temelinde çalışan spektrofotometrik olarak ölçülen kolorometrik bir metottur. Toplam antioksidan durumu belirtmek için numunede olan antioksidanlar kit içeriğinde bulunan ABTS radikallerinin indirgenmesine sebep olarak ABTS'in koyu mavi-yeşil renginin kaybolmasına neden olur. Bu amaçla spektrofotometride 660 nm absorbansında yapılan okuma ile toplam antioksidan miktarını belirlenir. Bu analiz stabil antioksidan bir solüsyon olan Trolox (Vit E analoğu) ile kalibre edilir ve Trolox eşdeğeri (mmol Trolox Equiv/L) olarak ifade edilir (110, 111).

TOS kitinin çalışma prensibi:

Bu test spektrofotometrik olarak ölçülen kolorometrik bir metottur. Toplam oksidan durumu belirlenmede kit temel olarak şu prensip üzerinden çalışmaktadır. Numunedeki oksidanlar demir iyon şelatlayıcı kompleksi okside eder. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamı içinde bol miktarda mevcut olan güçlendirici moleküller ile uzatılır. Ferrik iyon, bir asidik ortam içinde kromojen renkli bir kompleks yapar.

Rengin yoğunluğu numunede olan oksidan miktarı ile doğru orantılıdır. Bu tahlil H_2O_2 'le kalibre edilir ve sonuçlar H_2O_2 eşdeğeri ($\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ Equiv/L}$) olarak gösterilir (111, 112).

TAS ve TOS ölçümleri, 96 kuyulu plaka kullanılarak yapıldı. Örnek olarak C2C12 hücre gruplarından elde edilen TPL kullanıldı. Uygulama protokolü olarak *Rel Assay Diagnostics* firmasının TAS ve TOS kitleri için var olan protokolü takip edildi (www.rel assay.com).

Total Antioxidan Status (TAS)

Deney sonuçları 2 kez tekrarlanarak hesaplandı. Firmanın temin ettiği kitin protokolünde mevcut olan, reagentlerin miktarları (küvet için verilen değerler 96-kuyulu plaka için hesaplandı) ve prosedür ile ilgili tablolar aşağıda gösterilmiştir (Tablo 3.4 ve Tablo 3.5).

Tablo 3.4. TAS yönteminde tanımlanan prosedür. **Tablo 3.5.** TAS yönteminde kullanılan Reagentlerin içeriği.

Prosedür	
Dalga boyu	660 nm
Aşağıda belirtildiği gibi küveti doldurun	
Örnek ya da Standart ya da Su	18 μl
Reagent 1	300 μl
Karıştırın Absorbansını 30 saniye sonra okuyun (A1)	
Reagent 2	45 μl
Karıştırın Absorbansını 5 dakika sonra 37°C okuyun (A2) Ya Absorbansını 10 dakika sonra oda sıcaklığında okuyun (A2)	

Reagentlerin içeriği		
İçerik		Konsantrasyon
Reagent 1	Tampon Solüsyonu	
	Asetat Tamponu	0.4 mol/L pH5.8
Reagent 2	Prokromojen Solüsyonu	
	Substrat Solüsyonu	30 mmol/L
	ABTS	1 mmol / L
Standard	Troloks	0.5 mmol / L
QC Level 1	Troloks	0.5 mmol / L
QC Level 2	Troloks	2.0 mmol / L

Total Oxidan Status

Deney sonuçları 2 kez tekrarlanarak hesaplandı. Firmanın temin ettiği kitin protokolünde mevcut olan, reagentlerin miktarları (küvet için verilen değerler 96-kuyulu plaka için hesaplandı) ve prosedür ile ilgili tabloları (Tablo 3.6 ve Tablo 3.7.) aşağıda gösterilmiştir.

Tablo 3.5. TOS yönteminde tanımlanan prosedür. Tablo 3.7. TOS yönteminde kullanılan reagentlerin içeriği.

Prosedür	
Dalga boyu	530 nm
Aşağıda belirtildiği gibi küveti doldurun	
Örnek ya da Standart ya da Su	45 µl
Reagent 1	300 µl
Karıştırın	
Absorbansını 30 saniye sonra okuyun (A1)	
Reagent 2	15 µl
Karıştırın	
Absorbansını 5 dakika sonra 37°C okuyun (A2)	
Ya	
Absorbansını 10 dakika sonra oda sıcaklığında okuyun (A2)	

Reagentlerin içeriği		
İçerik	Konsantrasyon	
Reagent 1	Tampon Solüsyonu	-
	H ₂ SO ₄	25mM
	pH 1.75	
Reagent 2	Substrat Solüsyonu	
	H ₂ SO ₄	25mM pH
	1.75	
Standard	Demir iyon	5 mM
	O-dianisidin	10 nM
QC Level 1	H ₂ O ₂	10 µmol/L
QC Level 2	H ₂ O ₂	5 µmol/L
	H ₂ O ₂	20 µmol/L

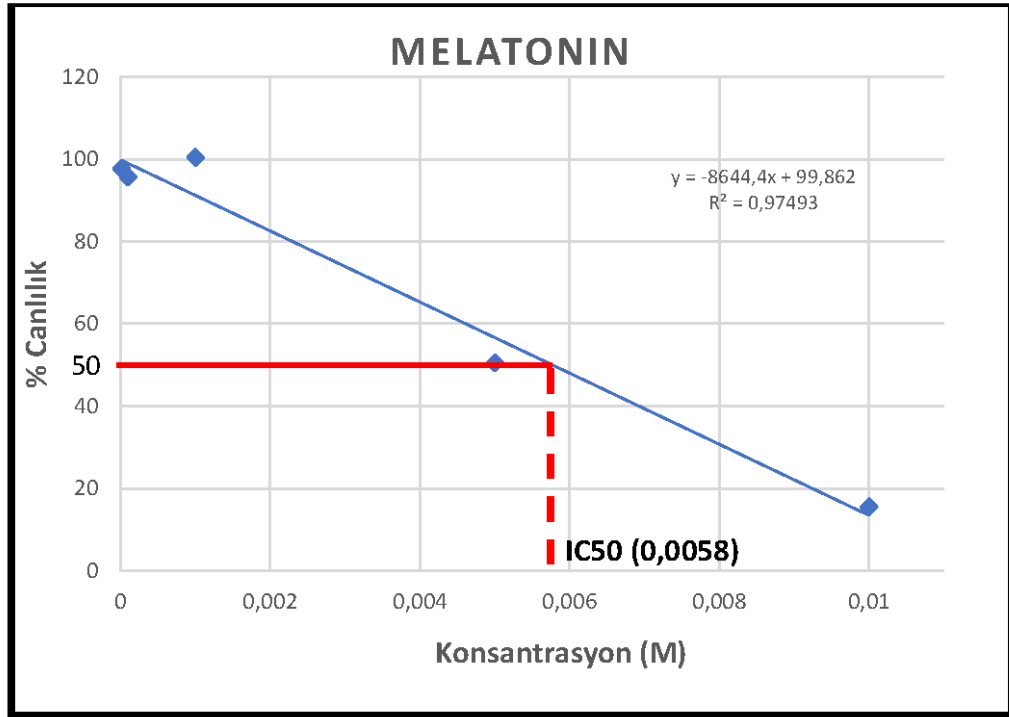
3.2.9. İstatiksel Analiz

İstatistik analizler IBM SPSS 22.0 paket programında yapıldı. Deney gruplarının çap değerlerinin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (Oneway ANOVA) kullanıldı. İkili karşılaştırmalarda Tukey testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. MTT yöntemiyle IC50 Değerlerinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan tedavi ajanlarının MTT yöntemi ile belirlenen IC50 değerleri ve buna ilişkin grafikleri gösterilmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

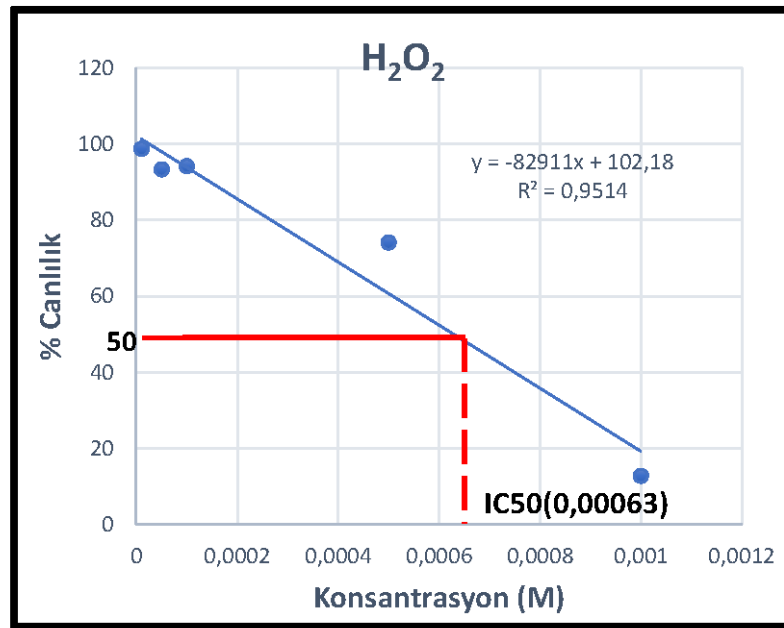


Şekil 4.1. Melatonin IC50 değerinin hesaplanması.

MTT yöntemiyle % 60 yoğunluk seviyesine gelmiş C2C12 hücrelerine, farklı melatonin konsantrasyonları (0,01-0,00001 M arası) uygulandı ve kontrole göre canlılık oranları yüzde olarak hesaplandı. Hücrelerin % 50 oranda canlı olduğu molar konsantrasyon grafiğin lineer formülünden hesaplanan IC50 değeri olarak şekil 4.1'de gösterilmiştir. Bu hesaplama değerleri 3 kez yapılan deney tekrarı sonucu oluşturulmuştur. Her deney düzeneğinde 4 teknik tekrar yapılmıştır. Kullanılan konsantrasyonlar ve onlara denk gelen hücre canlılık oranları tablo 4.1'de belirtilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. MTT yönteminde kullanılan melatonin konsantrasyonları ve elde edilen hücre canlılık yüzdeleri.

Melatonin(Molar)	0,01	0,005	0,001	0,0001	0,00001
% Canlılık	15,58	50,54	100	95,72	97,74



Şekil 4.2. H₂O₂ IC₅₀ değerinin hesaplanması.

MTT yöntemiyle % 60 yoğunluk seviyesine gelmiş C2C12 hücrelerde, farklı H₂O₂ konsantrasyonları (0,001-0,000001 M arası) uygulandı ve kontrole göre % canlılık oranları hesaplandı. Hücrelerin % 50 oranda canlı olduğu molar konsantrasyon grafiğin lineer formülünden hesaplanan IC₅₀ değeri olarak şekil 4.2’de gösterilmiştir. Bu hesaplama değerleri 3 kez yapılan deney tekrarı sonucu oluşturulmuştur. Her deney düzeneğinde 4 teknik tekrar yapılmıştır.

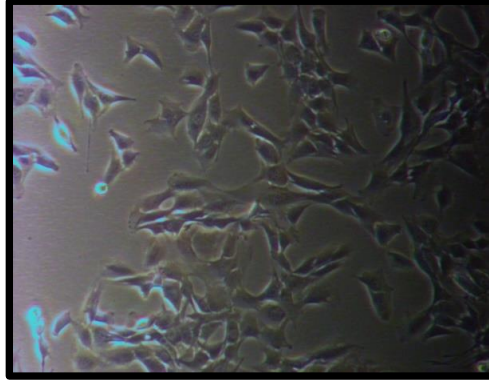
Kullanılan konsantrasyonlar ve onlara denk gelen hücre canlılık oranları Tablo 4.2’de belirtilmiştir.

Tablo 4.2. MTT yönteminde kullanılan H₂O₂ konsantrasyonları ve elde edilen hücre canlılık yüzdeleri

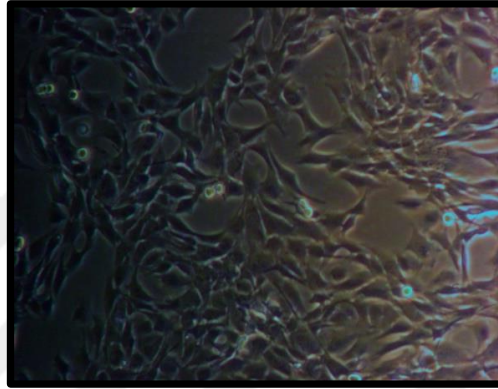
H ₂ O ₂ (Molar)	0,001	0,0005	0,0001	0,00005	0,000001
% Canlılık	12,80	74,12	94,21	93,36	98,78

4.2. C2C12 Hücrelerinin Farklı Büyüme ve Farklılaşma Dönemlerindeki Morfolojik Özelliklerinin Deney Grupları Arasında Karşılaştırılması

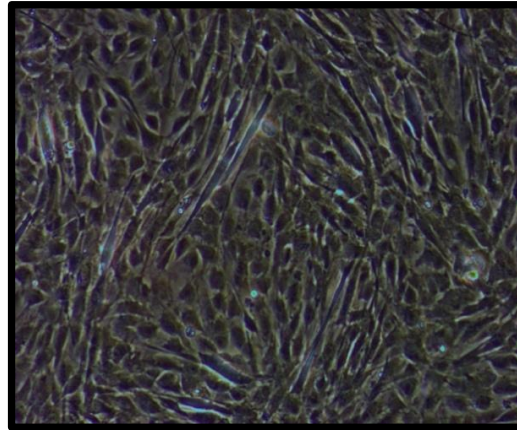
Çalışmamızda kullanılan C2C12 hücrelerinin tipik çoğaltılma ve farklılaşma paternlerine örnek görünümüleri gösterilmiştir (Bkz.şekil 4.3).



A. 24.saat sonunda büyüme besiyerinde,% 25-30 yoğunluktaki hücrele(10X büyütme).



B. 48.saat sonunda büyüme besiyerinde, % 75-85 yoğunluktaki hücreler(10X büyütme).

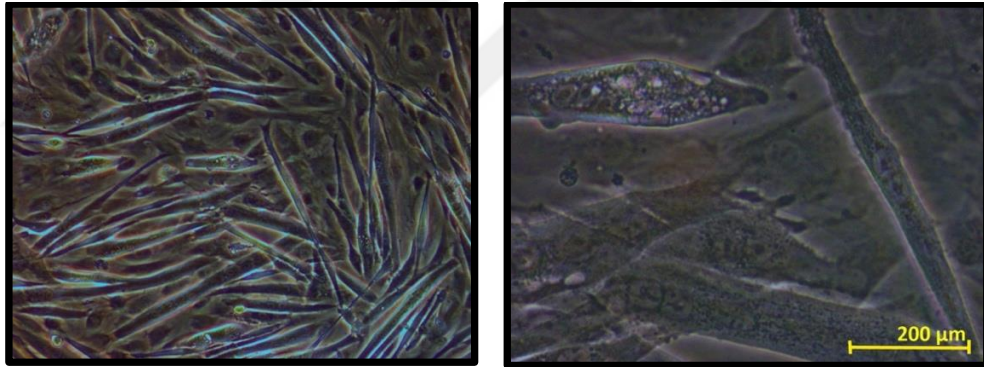


C. 72.saat sonunda farklılaşma besiyerindeki C2C12 hücrelerinin görünümü(10X büyütme).

Şekil 4.3. C2C12 hücrelerinin çoğaltılması (A, B) ve bu hücrelerin farklılaşma sürecinin başlatılması (C).

Hücrelerin flaska büyüme besiyeri içinde ekilmesinin 24. saatinde fotoğrafları çekildi (Şekil 4.3.A). Hücreler sağlıklı bir şekilde flask tabanına tutunarak % 25-30 yoğunlukta yüzeyi kaplamakta ve çok az oranda yüzen ölü hücre içermekteydi. Hücreler 24. saatin sonunda büyüme besiyerinin tazelenmesini takiben 48. saatte % 75-85 yoğunlukta olduğu dönemde tekrar fotoğrafları çekildi (Şekil 4.3.B). Yine bu dönemde hücrelerin sağlıklı bir şekilde çoğaldıkları gözlemlendi. Hücrelerin besi yeri 48. saatin sonunda büyüme besiyerinden farklılaşma besiyerine değiştirildi. Bu değişimden sonra 72. saatte (farklılaşmanın 1. gününün sonunda) fotoğrafları çekildi (Şekil 4.3.C). Bu dönemde hücrelerin beklendiği gibi bir araya gelerek miyotüp oluşturmaya başladığı gözlemlendi. Tüm hücre kültürü görüntülemeleri Nikon alttan objektivli mikroskopla normal ışıkta, Toupview programı kullanılarak yapıldı.

Farklılaşma sonu Kontrol grubu C2C12 hücrelerinin morfolojisi şekil 4.4 göstermektedir.



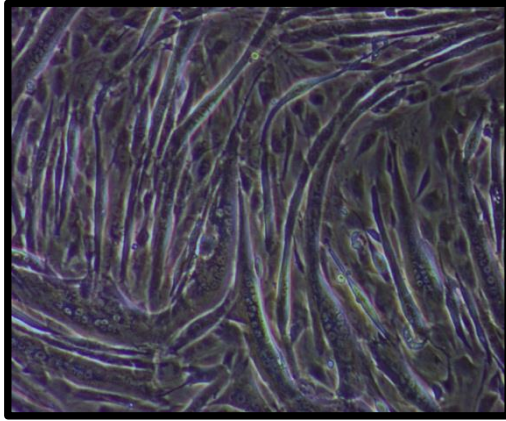
A) 192.saat sonunda (10X büyütme)

B) 192.saat sonunda (40X büyütme)

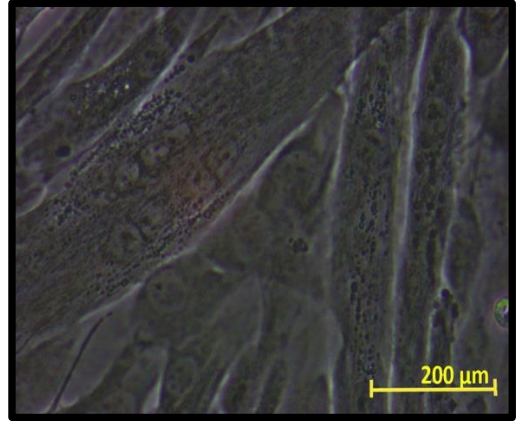
Şekil 4.4. Farklılaşma sonu kontrol grubu C2C12 hücrelerinin morfolojisi 10X (A) ve 40X (B) büyütmedeki görüntüleri.

Kontrol grubundaki hücrelerin düzenli aralıklarla farklılaşma besiyerleri değiştirilerek 192. saatte (farklılaşmanın 6.gününde) 10X ve 40X büyütmelerde fotoğrafları çekildi. Hücrelerin büyük çoğunluğunun beklendiği gibi miyotüp oluşturduğu gözlemlendi (şekil 4.4).

Farklılaşmanın sonu Melatonin grubu C2C12 hücrelerinin morfolojisi şekil 4.5 göstermektedir.



A) 192.saat sonunda (10X büyütme).

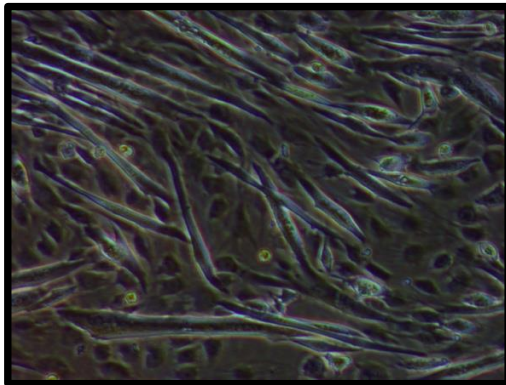


B) 192.saat sonunda (40X büyütme).

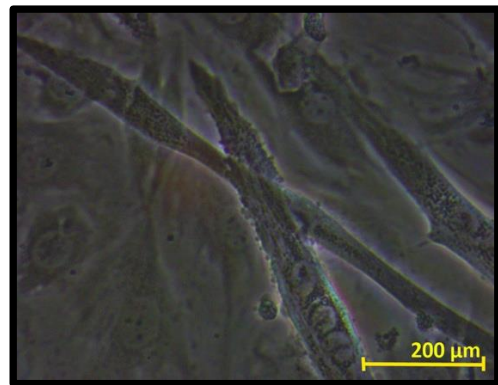
Şekil 4.5. Farklılaşmanın sonu melatonin grubu C2C12 hücrelerinin morfolojisi 10X (A) ve 40X (B) büyütmede görüntüleri.

Melatonin grubu hücrelerine 120-144 saatleri arasında 24 saat süre ile 100 μ M melatonin uygulaması yapıldı. Bu uygulamanın sonunda tekrar hücreler taze farklılaşma besisi yerinde 192. saate kadar tutuldu. Hücrelerin 192. saatte (farklılaşmanın 6.gününün sonunda) 10X ve 40X büyütmelerde fotoğrafları çekildi. Bu grupta da hücrelerin büyük çoğunluğunun beklendiği gibi miyotüp oluşturduğu gözlemlendi (şekil4.5).

Farklılaşmanın sonu H_2O_2 grubu C2C12 hücrelerinin morfolojisi şekil 4.6 göstermektedir.



A) 192.saat sonunda (10X büyütme).

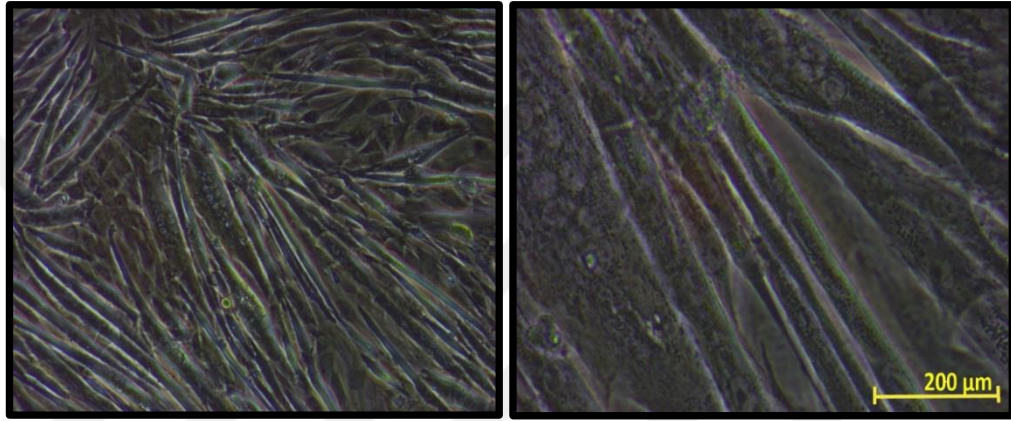


B) 192.saat sonunda(40X büyütme).

Şekil 4.6. Farklılaşmanın sonu H_2O_2 grubu C2C12 hücrelerinin morfolojisi 10X (A) ve 40X (B) büyütmede görüntüleri.

H₂O₂ grubu hücrelerine 144-168 saatleri arasında H₂O₂ 24 saat süre ile 50 µM konsantrasyonda uygulandı. Bu uygulamanın sonunda tekrar hücreler taze farklılaşma besisi yerinde 192. saate kadar tutuldu. Hücrelerin 192. saatte (farklılaşmanın 6.gününün sonunda) 10X ve 40X büyütmelemlerde fotoğrafları çekildi. Bu grupta da hücrelerin büyük çoğunluğunun beklendiği gibi miyotüp oluşturduğu gözlemlendi.

Farklılaşmanın sonu Melatonin+H₂O₂ grubu C2C12 hücrelerinin morfolojisi şekil 4.7 gösterilmektedir.



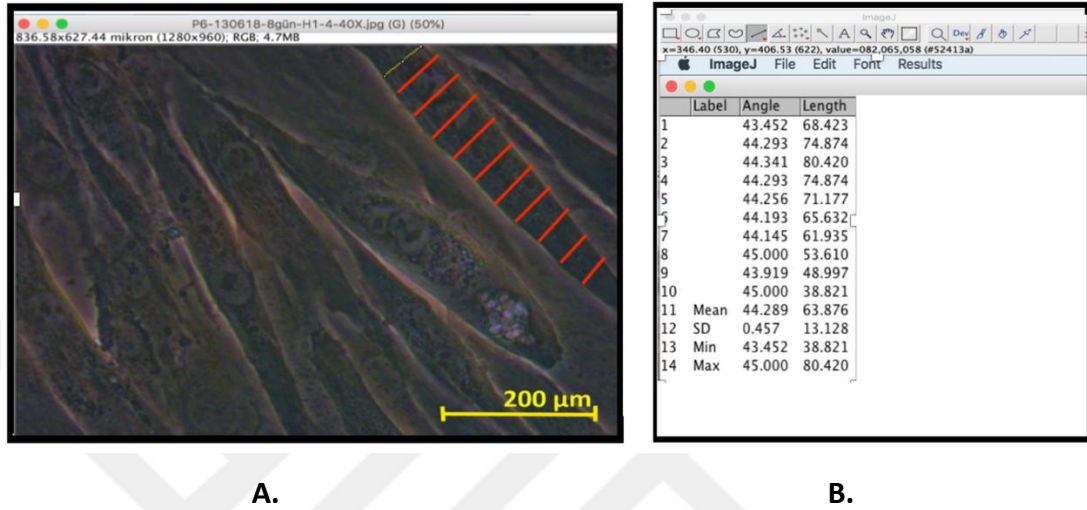
A) 72 – 192 saat sonunda (10X büyütme) B) 72 – 192 saat sonunda (40X büyütme).

Şekil 4.7. Farklılaşmanın sonu melatonin+H₂O₂ grubu C2C12 hücrelerinin morfolojisi 10X (A) ve 40X (B) büyütmede görüntüleri.

Melatonin+H₂O₂ grup hücrelerine 120-144 saatleri arasında melatonin 100 µM, devamında 144-168 saatleri arasında H₂O₂ 50 µM konsantrasyonda her biri 24 saat şeklinde uygulandı. Bu uygulamaların sonunda tekrar hücreler taze farklılaşma besiyerinde 192. saate kadar tutuldu. Hücrelerin 192. saatte (farklılaşmanın 6.gününün sonunda) 10X ve 40X büyütmelemlerde fotoğrafları çekildi. Bu grupta da hücrelerin büyük çoğunluğunun beklendiği gibi miyotüp oluşturduğu gözlemlendi.

4.3. Image J Programıyla Deney Gruplarının Morfolojik Değerlendirilmesi

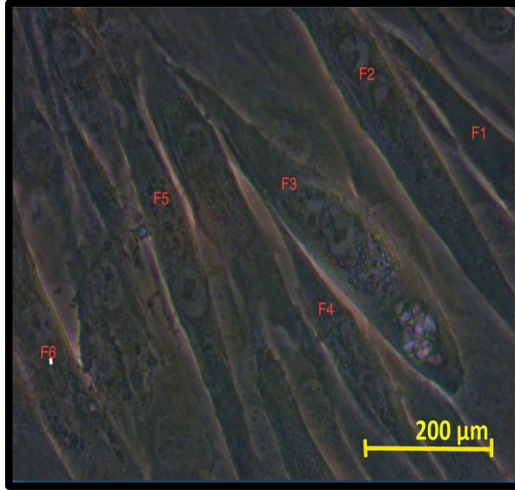
Farklılaşmanın 6. gününün sonunda 40X büyütmede çekilen fotoğraflar gereç ve yöntemlerde belirtildiği gibi image J programıyla değerlendirildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Image J programı ile miyotüp morfoloji ölçümü.

- A) Farklılaşmanın 6. gününün sonunda (192. saatte) 40X büyütmede gereç ve yöntemlerde belirtildiği gibi her bir mikroskop alanına düşen her bir miyotüp parçasının uzunluğu şekildeki örnek miyotüp fiberde gösterildiği gibi % 100 kabul edilerek 10 eşit parçaya bölünmüştür. Her miyotüp için çizilen bu çap çizgileri gereç ve yöntemlerde ayrıntısı verildiği gibi ortalama miyotüp çap ölçümünde kullanılmıştır. Şeklin altındaki ölçek barın uzunluğu 200 µm'dir.
- B) Image J tarafından hesaplanarak oluşturulan Şekil 4.8.A'daki örnek miyotüplerin *Microsoft Excel* programına aktarılmadan önceki ham data görünümü.

Image J programından elde edilen miyotüp morfolojik ölçüm dataları *Microsoft Excel* programına aktarıldı (Şekil 4.9).



A.

miyosit uzunluğu %	Fiber 1 Angle	Fiber 1 diameter (μm)	Fiber 2 Angle	Fiber 2 diameter (μm)
miyosit uzunluğu 10%	45.000	17,901	35.311	74,456
miyosit uzunluğu 20%	45.000	23,271	35.754	77,988
miyosit uzunluğu 30%	45.000	26,852	35.340	85,345
miyosit uzunluğu 40%	45.000	28,642	35.059	88,144
miyosit uzunluğu 50%	45.000	34,012	35.640	82,549
miyosit uzunluğu 60%	45.000	44,753	35.961	79,755
miyosit uzunluğu 70%	44.029	52,816	35.655	71,66
miyosit uzunluğu 80%	46.637	62,679	35.166	68,13
miyosit uzunluğu 90%	46.790	57,311	35.272	63,568
miyosit uzunluğu 100%	44.236	67,135	35.838	56,211
Avearage	45.169	41,537	35.500	74,781
Angle SD Avearage	0,89		0,308	

B.

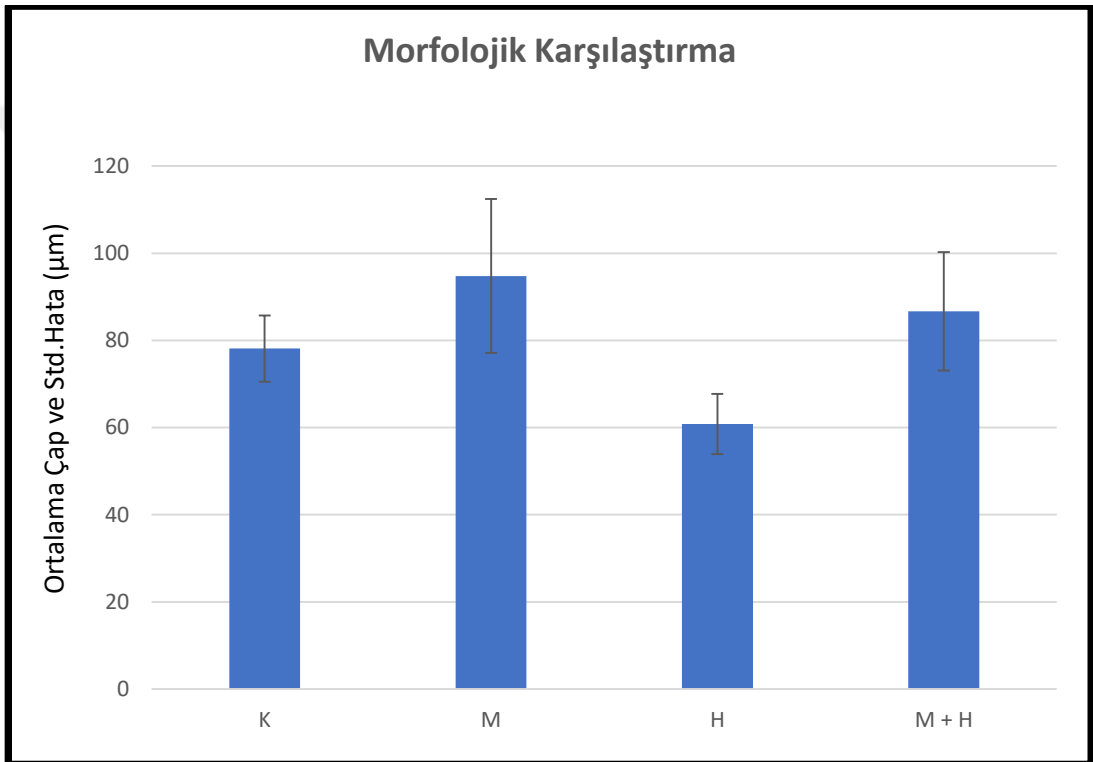
Şekil 4.9. İmage J programından elde edilen miyotüp morfolojik ölçüm datalarının *Microsoft Excel* programına aktarılması. Her bir 40X büyütmeli mikroskop görüntüsü içine düşen miyotüp kısımları F1, F2 vs şeklinde numaralanarak (A), gereç ve yöntemde ifade edildiği gibi program çıktısı her bir miyotüp için *Microsoft Excel* programına (B) aktarıldı (Şekil 4.9.B da miyotüpler, fiber olarak belirtilmiştir).

Şekil 4.9 da örneği gösterilen, image J programındaki her bir grubun 9 farklı bölgesinden alınan ölçümlerin, enine kesit (uzunluk) eşdeğeri ve enine açıları

Microsoft Excel programına aktarıldı. Her bir miyotüp enine çapının ve açılarının ortalamaları ve standart sapma'ları hesaplandı (Örn; Fiber 1 ve 2).

4.4. Deney Grupları Morfolojik Ölçüm Değerlerinin Karşılaştırılması

Deney gruplarındaki hücre farklılaşmasının 6.gününün sonunda miyotüp çap ölçümlerinin ortalaması Şekil 4.10'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Deney gruplarının farklılaşmanın 6. gününün sonunda miyotüp çaplarının ölçüm ortalamaları ve standart (std) hata çizgileri (n=9).

Deney grupların değerleri: Deney gruplarında ölçülen ortalama çaplar ve bunlara ilişkin $\pm$ standart sapmalar hesaplandı. Bu değerler K grubu ($78,12 \pm 7,61$), M grubu ($94,78 \pm 17,68$), H grubu ($60,83 \pm 6,89$), (M+ H) grubu ($86,69 \pm 13,60$) olarak tespit edildi.

Ortalama miyotüp çaplarının gruplar arası farklılıkları istatistiksel olarak değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirme için *Oneway* ANOVA testi kullanıldı. Anlamlı olarak $p < 0,05$ kabul edildi.

Tablo 4.3.'de iki yönlü ANOVA testin sonucunda gruplar arasındaki miyotüp çaplarının ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunduğu ($p \leq 0,000013$) gösterilmektedir.

Table 4.3. Deney grupları arasında yapılan Oneway ANOVA istatistiksel analiz sonucu.

ANOVA					
Çap					
	Karelerin Toplamı	df	Karelerin Ortalaması	F	Anlamlılık
Gruplar arası	5707,588315	3,000000	1902,529438	12,626518	0,000013
Gruplar içerisinde	4821,672964	32,000000	150,677280		
Toplam	10529,261279	35,000000			

Deney gruplar arasında bulunan farkın değerlendirmesi *Post Hoc* test ile yapıldı (Tablo 4.4). Anlamlılık (Sig. değeri) değeri $p \leq 0.05$ altında olanlar o grupların farkının kendi arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.4. Gruplar arasındaki farklılıkları göstermek için çoklu karşılaştırma yapmak amacıyla yapılan Post Hoc test sonuçları.

Post Hoc Tests						
çoklu karşılaştırma						
Bağımlı değişken	Çap					
Tukey HSD		%95 Güven Aralığı				
Grup		Ortalama Fark	Std.Hata	Anlamlılık	Alt Sınır	Üst Sınır
K	H	17,28833'	5,786522	0,026166	1,610552	32,966115
	M	-16,66144'	5,786522	0,033830	-32,339226	-0,983663
	M+H	-8,571111	5,786522	0,460239	-24,248893	7,106671
H	K	-17,28833'	5,786522	0,026166	-32,966115	-1,610552
	M	-33,94978'	5,786522	0,000009	-49,627559	-18,271996
	M+H	-25,85944'	5,786522	0,000512	-41,537226	-10,181663
M	K	16,66144'	5,786522	0,033830	0,983663	32,339226
	H	33,94978'	5,786522	0,000009	18,271996	49,627559
	M+H	8,090333	5,786522	0,509677	-7,587448	23,768115
M+H	K	8,571111	5,786522	0,460239	-7,106671	24,248893
	H	25,85944'	5,786522	0,000512	10,181663	41,537226
	M	-8,090333	5,786522	0,509677	-23,768115	7,587448

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda

1) K grubu ve H ve M gruplar arasında, miyotüp çapların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. K grubu ve (M+H) grubu arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı.

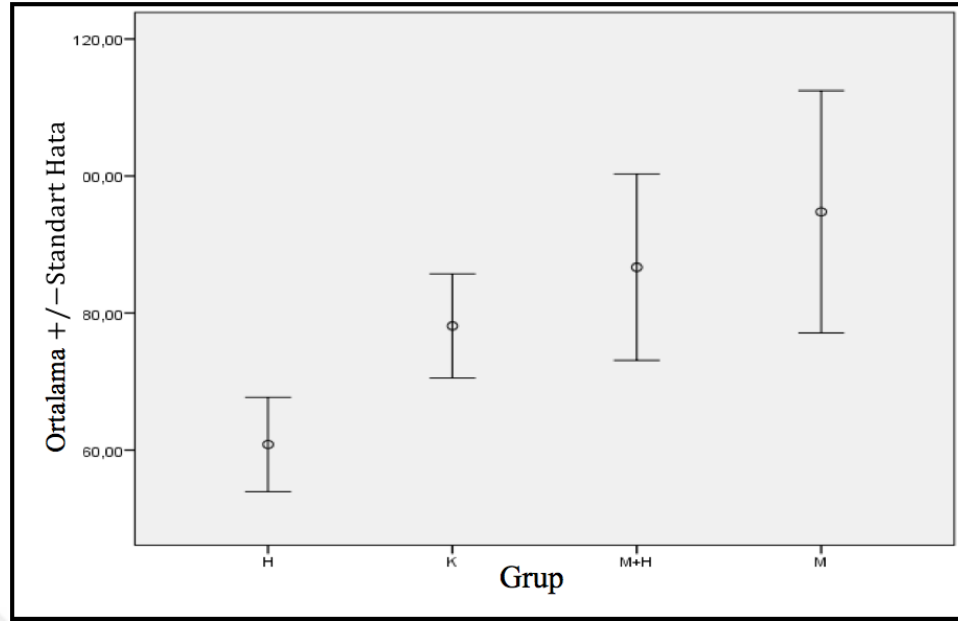
2) H grubu ve diğer gruplar arasında, miyotüp çaplarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu.

3) M grubu ve K ve H grupları arasında, miyotüp çapların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu; M grubu ve (M + H) grubu arasında, miyotüp çapların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı.

4) (M+H) grubu ve H grubu arasında, çapların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu.

5) (M+H) grubu ve K ve M grubu arasında, çapların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı.

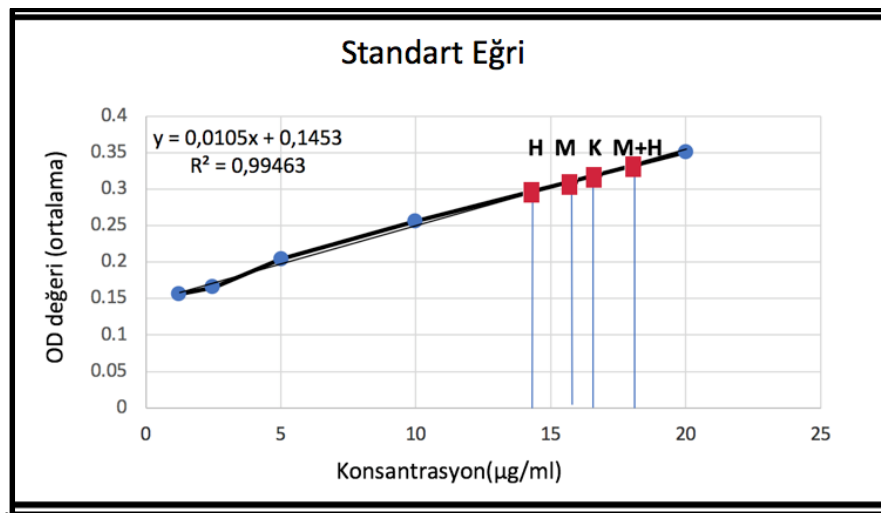
Şekil 4.11'de *Error Bar* grafik gösteriminde deney gruplarının ortalama miyotüp çapları ve standart sapma'ları gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Deney gruplarının ortalama miyotüp çapları ve SD değerlerinin “Error Bar grafiği” şeklinde SPSS program çıktısı olarak gösterimi.

Farklılaşmanın 6.gününün sonunda deney gruplarındaki C2C12 hücrelerinden elde edilen total protein lizatlarının konsantrasyonları (TPL) Bradford yöntemiyle belirlendi (Şekil 4.12)

4.5. Deney Gruplarından Elde Edilen Total Protein Lizatlarındaki Protein Konsantrasyonların Belirlenmesi



Şekil 4.12. Biorad kiti protein standartları ile hazırlanan grafiğinin üzerinde deney gruplarının total kalpain-1 protein miktarlarının gösterimi.

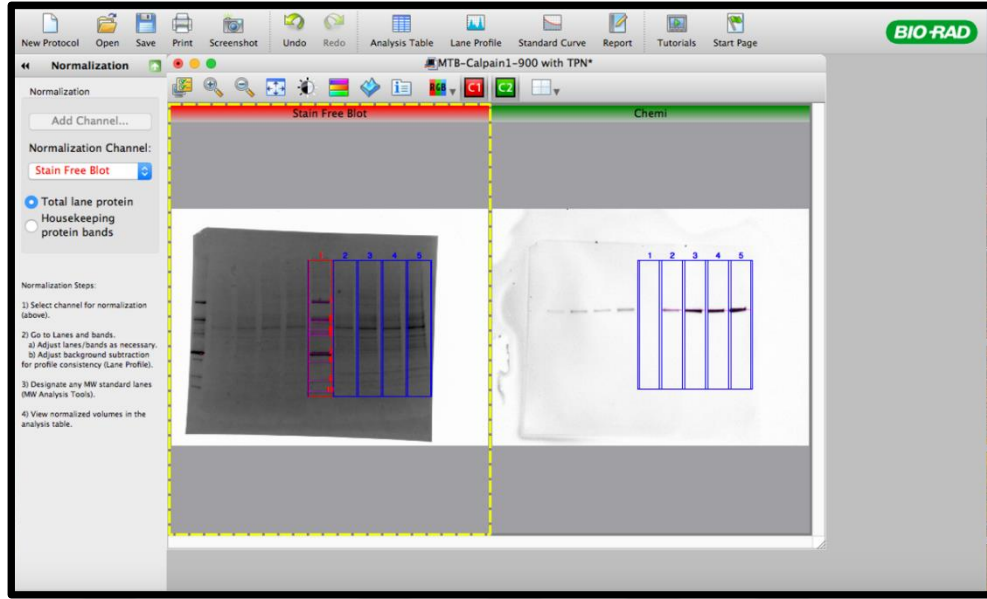
Bu ölçüm için kullanılan Biorad kitinin protein standartlarının lineer ölçüm aralığı 1,25-20 µg/ml idi. Konsantrasyonları bilinmeyen deney gruplarına ait TPL'daki protein konsantrasyonunun bu aralığa gelmesi için uygun şekilde sulandırıldı (Şekil 4.12' de belirtilen değerler 200 kat sulandırma ile bulunan değerlerdir). Yuvarlakla gösterilen değerler standart protein konsantrasyonlarını (mavi-yuvarlak), kare ile gösterilen değerler ise deney gruplarından elde edilen sulandırılmış TPL'ının protein konsantrasyonlarını (kırmızı-kare) göstermektedir (Şekil 4.12).

Deney grupları için sulandırma sonrası hesaplanan TPL protein konsantrasyon değerleri aşağıda verilmiştir.

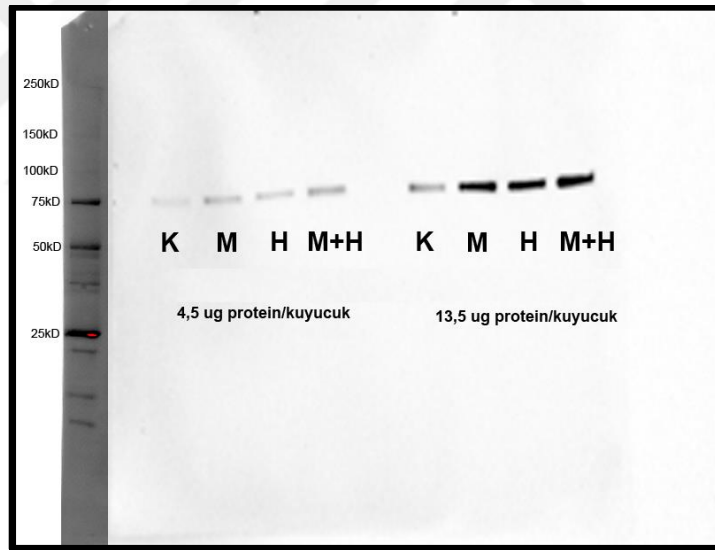
$$K = 16,447 \mu\text{g/ml}; M = 16,409 \mu\text{g/ml}; H = 14,061 \mu\text{g/ml}; M+H = 17,764 \mu\text{g/ml}$$

4.6. Kalpain 1 Protein İfadelemesinin Değerlendirilmesi ve Gruplar Arası Karşılaştırması

Western blot görüntüleme Image Lab yazılımı aracılığıyla yapıldı. Protein bantlar total protein normalizasyonu (TPN) metoduyla "*Stain free blot*" kullanarak değerlendirildi. Image Lab yazılımında protein bantlarının TPN metoduyla ölçüldü (Şekil 4.13). Western blot ile kalpain-1 proteinin iki farklı protein konsantrasyonu kullanılarak "*Biorad ChemiDoc XRS*" görüntüleme sisteminde Image Lab yazılımı kullanılarak görüntülendi (Şekil 4.14).

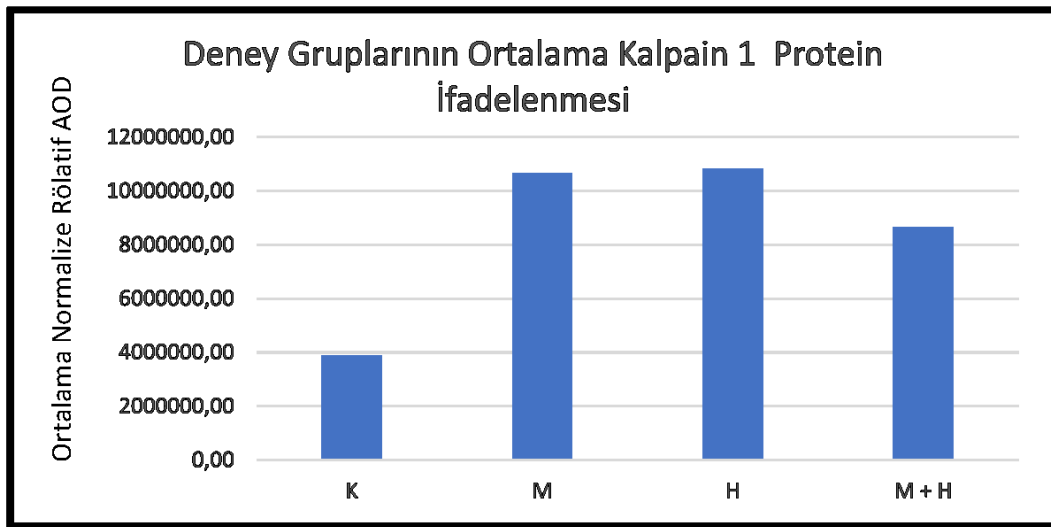


Şekil 4.13. Image Lab yazılımında protein bantlarının TPN metoduyla ölçümü.



Şekil 4.14. Western blot ile kalpain-1 proteinin iki farklı protein konsantrasyonu kullanılarak "Biorad ChemiDoc XRS + görüntüleme sisteminde Image Lab yazılımı kullanılarak görüntülenmesi.

Şekil 4.15'de deney gruplarında TPN ile normalize edilmiş kalpain-1 protein ifadenme seviyesinin ortalaması belirtilmiştir.



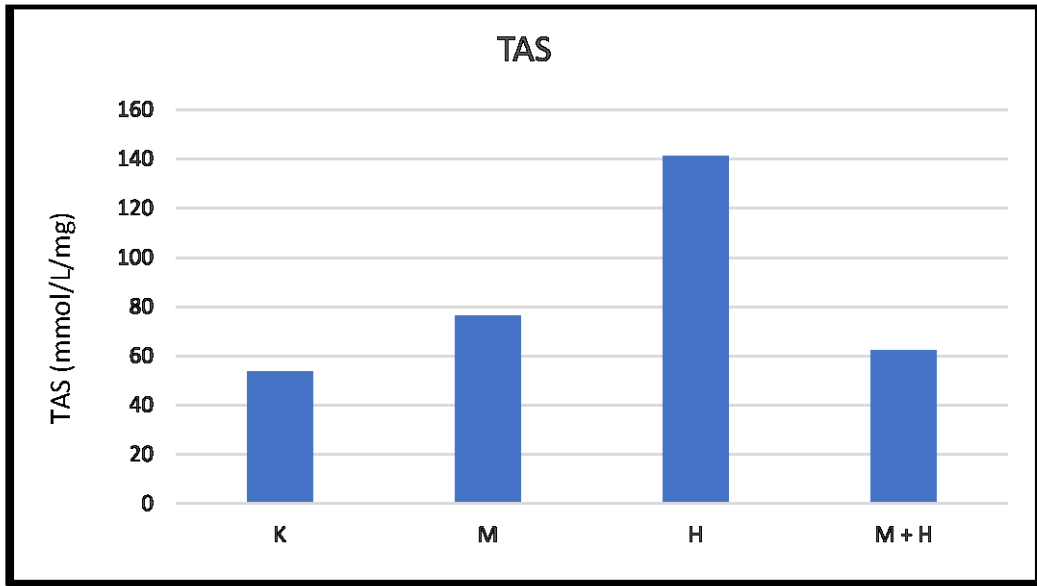
Şekil 4.15. Deney gruplarının kalpain-1 protein ifadenmesinin Rölaf *Arbitrary Optic Density* (AOD) ortalaması. Her grup için 2 tekrar yapılmıştır (n=2).

Bir biyolojik tekrar ve 2 adet teknik tekrar yapıldığı için değerlerde istatistiksel anlamlılık belirtilmemiştir.

İki tekrarın ortalama rölaf AOD değeri belirgin olarak, K grubunda diğer gruplara kıyasla daha düşük miktarda kalpain-1 protein ifadenmesini göstermektedir. Diğer gruplar bu yönden ortalama değerleri üzerinden karşılaştırıldıklarında; H deney grubu önde olmak üzere M grubunda da buna yakın, M+H grubunun ise H ve M den daha düşük ortalama Kalpain-1 proteini ifade ettiği görülmektedir.

4.7. TAS Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Gruplar Arası Karşılaştırması

TAS değerleri için bir biyolojik tekrar ve 2 adet teknik tekrar yapıldığı için değerlerde istatistiksel anlamlılık belirtilmemiştir. Şekil 4.16'da 2 teknikal tekrarın ortalaması olan TAS değerleri grafik de gösterilmiştir.



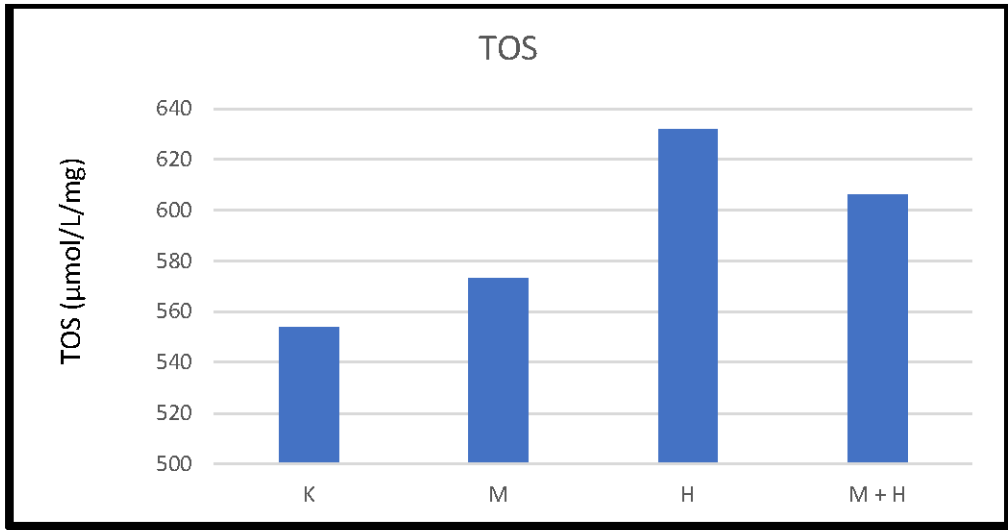
Şekil 4.16. Deney gruplarının ortalama TAS değerleri.

Elde edilen TAS değerlerine göre

H grubu en yüksek ortalama TAS değeri gösterirken, K grubu en düşük değeri göstermektedir. Bunun yanı sıra M grubunun ortalama TAS değeri M+H grubundan yüksektir.

4.8. TOS Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Gruplar Arası Karşılaştırması

TOS değerleri için bir biyolojik tekrar ve 2 adet teknikal tekrar yapıldığı için değerlerde istatistiksel anlamlılık belirtilmemiştir. Şekil 4.17’de 2 teknikal tekrarın ortalaması olan TAS değerleri grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Deney gruplarının ortalama TOS değerleri.

Elde edilen TOS değerlerine göre

H grubu en yüksek ortalama TOS değeri gösterirken K grubu en düşük değeri göstermektedir. Bunun yanı sıra M+H grubunun ortalama TOS değeri M grubundan yüksektir.

5.TARTIŞMA

Çalışmamızın sonuçları, H_2O_2 'in C2C12 hücrelerinde kas atrofisi oluşturduğunu ve melatoninin oluşan atrofiyi morfolojik olarak önlediğini göstermektedir. Kas atrofisi, hastalıkların yokluğunda kasın kullanılmamasına bağlı olarak da ortaya çıkabilir (22, 23). Kullanılmamaya bağlı atrofinin en önemli nedeninin oksidatif stres olduğu önceki araştırmalarda gösterilmiştir (61). Birçok in-vitro ve invivo araştırmada, kullanılmamaya bağlı atrofi oluşturmak için H_2O_2 kullanılmıştır (62-65). C2C12 fare miyoblast hücreleri kontraktıl miyotüpler oluşturma ve karakteristik kas proteinleri üretme kapasitesine sahiptirler (103). Bu özellikleri nedeniyle araştırmalarda *in vitro* olarak değişik kas modelleri oluşturmak için bu hücre hattı sıklıkla kullanılmaktadır (4, 70, 87). Bizim çalışmamızda da C2C12 hücre hattı bu özellikleri ve daha önce benzer çalışmalarda kullanılması nedeniyle kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılan aynı pasaj sayısında olan hücreler, büyüme ve farklılaşma süreçlerinde aynı koşullara maruz bırakılmışlardır. Bu nedenle gruplar arasında gözlenen farkın deney protokolünden kaynaklandığı ifade edilebilir. Daha önce yapılan bir araştırmada 25-50 μm H_2O_2 'in konsantrasyondaki atrofi oluşturmak için uygun olduğu belirtilmiştir (4). Bizim çalışmamızda MTT deneyleri sonucunda 24 saat süreyle 50 μm H_2O_2 'ye maruz bırakılan hücrelerin % 93,36 oranında canlılık göstermesi nedeniyle uygun doz olarak seçilmiştir. Bu dozda H_2O_2 uygulanan kullanılmamaya bağlı atrofi modelimizde miyotüp çaplarında kontrol grubuna göre % 23 azalma gözlemlenmiştir. Literatürde miyotüp çapının azalması atrofi belirteci olarak kabul edilmektedir (107).

Sivakumar ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yapılan araştırmada (70), C2C12 hücre hattında, oksidatif stresi azaltmak için H_2O_2 uygulamadan önce antioksidan olarak sunphenon ve polyphenon kullanmaları neticesinde oksidatif stres belirteçlerinde azaldığı gösterilmiştir. Bu güçlü antioksidanların oksidatif strese bağlı kas atrofilerini azaltabileceklerini bu bulgular ışığında öne sürmüşlerdir. Son zamanlarda yapılan iki çalışmada C2C12 hücrelerinde melatoninin bir antioksidan ve anti-apoptotik molekül olarak görev yapabildiği gösterilmiştir (87, 113).

Melatoninin önemli koruyucu etkisi esasen serbest radikal temizleyici olarak yüksek potansiyeli, düşük toksisitesi ve su-organik ortamlarda geçirgenliği temelinde olduğu gösterilmiştir (7, 85, 114). Melatoninin antioksidan etkisi ve kas atrofisi üzerindeki pozitif etkileri önceki çalışmalarda gösterilmesine rağmen, kas atrofisinin morfolojik incelenmesi daha önce yapılan çalışmalarda bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda melatoninin C2C12 modelinde kas atrofisi üzerinde morfolojik etkisi ilk kez gösterilmiştir. MTT deneyleri sonucunda 100 µm melatonine 24 saat süreyle maruz bırakılan C2C12 hücrelerinin % 95,72 canlı olduğu gösterilmiştir. Kullandığımız bu doz literatürde kullanılması önerilen doz ile uyumludur (87).

Melatonin ve H₂O₂ uygulanan hücre grubunda sadece H₂O₂ uygulanan gruba göre morfolojik ölçümü olan miyotüp çap azalması tümü ile ortadan kalkmıştır. Bu bulgu daha önce melatoninin etkisini kas atrofisi üzerinde inceleyen araştırmalarla uyumludur (115, 116). Sadece melatonin uygulanan grubun fiber çapında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu bulgumuz ile melatoninin atrofiyi önlemesinin yanı sıra C2C12 hücrelerinde hipertrofi yaptığı da ilk kez gösterilmiş olmaktadır.

Yapılan önceki araştırmalarda kas atrofisinin başlaması miyofibriler proteinlerin degradasyonu sarkomer yapısının bütünlüğünün bozulması gerektiği ortaya konulmuştur. Bu bütünlüğü bozan etkenlerden özellikle kalpainlerin kas atrofisinde sarkomer bütünlüğünün bozulmasında önemli rol aldıkları (3) ve aynı zamanda kullanılmamaya bağlı atrofilerde kalpainlerin miktarı ve aktivitelerin arttığı ortaya konmuştur (20, 42, 43). Talbert ve arkadaşları 2013 yılındaki çalışmalarında (46) kalpain inhibisyonunun sıçan soleus kasında kullanılmamaya bağlı atrofiyi önlemede yeterli olduğunu göstermişlerdir. Bununla beraber C2C12 hücre hattında atrofiyi önlemek için özellikle kalpainler arasında kalpain 1'in en önemli rolü oynadığı ve bu kalpainin aktivitesi ve miktarının azalmasıyla atrofinin %90 oranında gerilediği gösterilmiştir (4).

Samantaray ve arkadaşları spinal kord hasarlı fare modelinde, melatoninle ön tedavinin kalpain protein düzeyi ve aktivitesinde de azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir (117). Chetsawang ve arkadaşları amfetaminin indüklendiği

sıçanlarda substansa nigra da meydana gelen dejeneratif süreçten kısmen kalpainin aktivasyonunun sorumlu olduğu kanıtlamışlardır ve melatoninin bu etkiyi kalpain miktar ve aktivitesini azaltarak tersine çevirebileceği göstermişlerdir (11).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda melatoninin kas hücre hatlarında kalpain-1 üzerine etkisi araştırılmamıştır. Biz çalışmamızda bu etkiyi C2C12 hücre hattında inceledik. Bu amaçla kalpain-1 protein miktarını western blot yöntemiyle deney gruplarında inceledik. Western blot sonuçlarına göre H, M ve M +H gruplarında kalpain-1 proteinin ifadenme düzeyleri K grubuna kıyasla artış gözlemlenmiştir. Her ne kadar bizim bulgularımızda tekrar eksikliği nedeniyle istatistik anlamlılıkla ifade edilmemiş olsa da, kalpain-1 protein ifadenmesinde H grubundaki artış, H₂O₂ uygulandıktan sonra kalpain-1 gen ifadenmesinin arttığını gösteren çalışma ile uyumludur (70).

Bulgularımız arasında öngörmediğimiz en dikkat çeken, M grubundaki kalpain-1 protein ifadenmesindeki artış olarak karşımıza çıkmaktadır. Bizim çalışmamızda western blot yöntemi ile elde edilen kalpain-1 protein ifadenmesi Chetsawang ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yapılan araştırma (11) ile ilk bakışta uyumluluk göstermese de, söz konusu sıçan çalışmasında kalpain-1 ile ilgili miktar ve aktivite sonuçları üzerinden tartışma yürütülmüştür. Bizim çalışmamızda kalpain-1 aktivitesi ile ilgili deneysel değerlendirme yapılmamıştır. Diğer önemli dikkat edilmesi gereken husus da Chetsawang ve arkadaşlarının sıçanlarda substantia nigra da kalpain-1 seviyesine sistemik dolaşıma subkutanöz olarak verilen melatonin cevabına bakmasıdır. Bizim deney şartlarımızda ise direk olarak hücre kültüründe melatonin uygulamasını takiben kalpain-1 protein ifadenmesine bakılmıştır. Bulgularımız ışığında ilerde kalpain aktivitesiyle ilgili bir fikre sahip olmak için western blot aracılığıyla kalpain proteinin miktarı ile korele olarak kalpain aktivitesini ölçmek için literatürde yapıldığı gibi kalpainin oluşturduğu spektirin parçalanma ürünlerine (SBDP) bakılması veya total kalpain 1 düzeyinin yanı sıra aktif kalpain-1 (*Cleaved Calpain-1*) düzeyinde bakılmasının uygun olacağı düşünülmektedir (4, 11). M grubunda ilginç bir bulgu olarak gözlemlediğimiz kalpain-1 protein ifadenmesinin artmasına sebep olabilen diğer bir varsayımımız da, deney protokolümüzde

melatonin uygulandıktan sonra morfolojik değerlendirme için miyotüp oluşumunun 48 saat beklenme gereği ve sonrasında kalpain-1 protein ifadenmesine bakılması olabilir. Bu artışı açıklayan bir başka düşünce de melatoninin C2C12 hücre hattında daha karmaşık bir yolağı kullanarak etki edebileceğidir. Bu varsayımları denetlemek için deneyin tekrarlanması ve bekleme sürecini 24 saat azaltarak yeni deney düzeneklerinin kurulması ve önceden ifade edildiği gibi western blot'la aktif kalpain 1 ve/veya kalpain parçalama ürünlerine (SBDP) de bakılması öngörülmektedir.

Daha önce yapılan bir araştırmada melatonin tedavisinin miyotüplerdeki antioksidan etkisini, antioksidan genlerin ifadenmesini arttırarak yaptığı gözlemlenmiştir (88). Biz çalışmamızda hücrelerin deney sonunda redoks dengelerini belirlemek için, daha çok serum düzeyinde melatoninin redoks denge de etkisine bakan çalışmalarda kullanılan TAS ve TOS kitlerini kullandık (118, 119). Literatürde hücre hatlarında melatonin uygulanmasından sonra TAS ve TOS düzeylerinin incelenmesi yapılan hiç bir çalışmaya rastlamadık.

Bizim çalışmamızda TAS miktarında M grubunda K grubuna göre artış göstermiştir. Bu melatoninin antioksidan olarak etki göstermesiyle uyumlu bir bulgudur. Bununla beraber H grubunda TAS düzeyi diğer gruplardan daha yüksek tespit edilmiştir. Deney protokolümüzde H₂O₂ uygulanmasından 24 saat sonra TAS ve TOS düzeyine bakılmıştır. Bu artış H₂O₂'a maruz kalan hücrelerde oksidatif stresi ortadan kaldırmak için hücre antioksidan düzeyinde redoks dengeyi sağlamak için oluştuğunu bildiğimiz rebound bir artış sonucu olabilir (120). Bu bulgumuz ile açığa çıkan antioksidan artışını daha iyi değerlendirebilmek için 24 saatlik H₂O₂ uygulamasının sonrasında çeşitli aralıklarla TAS ve TOS düzeyine bakılabilir. Hayvanlar üzerinde yapılan bazı araştırmalarda melatonin uygulanması TAS düzeyinde anlamlı bir farklılık yaratmamıştır (118). Gene bazı hayvan çalışmalarında melatonin uygulanmasının TAS düzeyinde anlamlı bir artış sağladığı gözlemlenmiştir (119). M+H grubunun TAS değeri M ve H grubundan daha düşük olmasını oluşturan oksidatif stresin rebound artışı sağlayacak düzeyde olmaması şeklinde yorumladık.

Bizim çalışmamızda TOS düzeyinde H grubunda diğer gruplara göre artış görülmektedir. Bu çalışma öncesinde de öngördüğümüz cevap literatürle de

uyumludur (121). M grubu TOS düzeyi K grubuna göre artmıştır. Bu bulgumuz, Ossini ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan araştırmada melatoninin konsantrasyon ve inkübasyon süresine bağlı hücrelerde prooksidan etki gösterebileceği sonucu ile uyumludur. Söz konusu çalışmada daha çok glutatyon miktarı azalan hücrelerde bu durumun olduğu vurgulanmıştır (9). Aynı zamanda 2009 yılında Cristofanon ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada (10) melatoninin U937 hücrelere uygulanan 1 mM konsantrasyonda prooksidan etki gösterebileceğini ortaya koymuştur.

TAS ve TOS kitleri prensip olarak toplam antioksidan ve oksidan miktarını ölçerek bilgi vermekte, bu etkilerin detayını sorgulamak ise mümkün olmamaktadır. Bulgularımızda K grubuna göre M ve M+H gruplarında TOS değerlerinde artış olmasına karşın, bu artışın atrofik etki görmemesinin yanı sıra hipertrofik etki görülmesi bu etkilerin daha detaylı analizini gerektirmektedir. TAS çalışma prensibi ABTS radikallerinin antioksidanlar tarafından indirgenmesi prensibine dayanır. TOS çalışma prensibi ise demir iyonları şelatlayıcı kompleksinin oksidanlar tarafından oksidasyonu iledir. Her iki ölçümde de oksidan ve antioksidanların tipi belirlenmemektedir. Literatürde melatonin tedavisinde; GSH, katalaz ve hücrel SOD değişiminin farklı yolları aktive ederek farklı sonuçlar doğurduğu ifade edilmiştir (9, 10). Bulgularımızın çağrıştırdığı muhtemel etkileşimin daha ayrıntılı açıklanabilmesi amacı ile yukarıda belirtilen antioksidan enzimlerin yanı sıra malondialdehid (MDA) düzeyine de bakılması ile doku hasarının bir göstergesi olan lipid peroksidasyonu etkisi ile aralarındaki korelasyon bazı çalışmalarda ifade edildiği gibi gösterilebilir (118).

M+H grubu TOS düzeyi K ve M grubuna göre artmıştır. Ancak literatürde sıçanlarda radyasyona karşı melatoninin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, melatonin uygulanması ile TOS düzeyinde serumda anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir (119). Gene başka bir araştırmada Wistar sıçanlarda testis iskemi ve reperfüzyonuyla indüklemeye önceden melatonine maruz bırakılan grupta serum TOS düzeyinde anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir (118). Bizim çalışmamızda ilk defa melatoninin

hücresel düzeyde redoks dengesi üzerinde etkisine TAS ve TOS kiti kullanılarak bakılmıştır.

Çalışmamızda M grubunun TOS miktarı K grubuna göre artışı ile birlikte kalpain-1 protein ifadenmesinde de görülen artış; melatoninin C2C12 hücrelerinde görülen atrofinin önlenmesinde düşünülenlerin tersine, baskın olarak antioksidan etkisinden ziyade ayrı bir yolağı ve/veya multipotansiyel özelliklerini kullanarak oluşturduğunu düşünmekteyiz. Gene bulgularımızı açıklamada önemli bir limitasyonumuz da bizim deney protokolümüz gereği TAS/TOS ve kalpain-1 protein ifadenme analizlerinin zamansal olarak geç yapılmasıdır. Bu analizlerin gecikerek yapılması limitasyonu, morfolojik değişimin beklenmesi yerine atrofik etki oluşumunu literatürde belirtildiği gibi kasta erken dönemde etkinleşen Atrogin 1 ve MURF 1 genlerinin ifadenme düzeylerine bakılmasıyla bir ölçüde önlenabilir (122).

Kaur ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yayınlanan çalışmada (123), kreatin kinaz, laktat dehidrojenaz gibi atrofinin biokimyasal belirtçlerinin, atrogenlerle beraber değerlendirilmesi atrofiyle ilgili daha detaylı bilgi verebileceği gösterilmiştir. Bu analizlerin atrogenlerin ifadenmesiyle beraber bakılması atrofinin daha detaylı değerlendirilmesi için uygun olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- H grubunun ortalama miyotüp çaplarında diğer gruplara (K, M, M+H) göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir.
- M grubun ortalama miyotüp çapında, K ve H gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir.
- M grubunun K grubuna göre ortalama miyotüp çapındaki artış anlamlı bulunmuştur. Dolayısıyla melatonin uygulamasının miyotüplerde hipertrofi yapması literatürde ilk defa bizim çalışmamızla ortaya konmuştur.
- Çalışma grupları arasında ortalama miyotüp çapları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.
- Western blot sonuçlarına göre H, M ve M +H gruplarında kalpain-1 proteinin ifadenme düzeyinde K grubuna kıyasla artış gözlemlenmiştir.
- H grubunda ortalama TOS miktarı diğer gruplardan daha yüksek çıkmıştır.
- H grubundan sonraki ortalama TOS değerleri sırasıyla (M+H) ve M grubu iken en düşük ortalama TOS değeri K grubunda çıkmıştır.
- Çalışmamızda ortalama TAS miktarının M grubunda K grubuna göre artışı gözlemlenmiştir.
- En yüksek ortalama TAS değeri H grubunda çıkmıştır.
- H grubundan sonraki ortalama TAS değerleri sırasıyla M ve (M+H) grubu iken en düşük ortalama TAS değeri K grubunda gözlenmiştir.
- Çalışmamızın sonuçlarına göre, H₂O₂'in C2C12 hücrelerde kas atrofisi oluşturduğunu ve melatoninin oluşan atrofiyi morfolojik olarak önlediğini gösterilmiştir.

6.2. Öneriler

- İlerde bu konuyla ilgili yapılabilecek çalışmalarda kalpain-1'in aktivite düzeyi hakkında da fikre sahip olmak için kalpain protein ifadenme miktarı ile beraber kalpain aktivitesini ölçmek için kalpainin oluşturduğu spektirin

parçalanma ürünlerine (SBDP) bakılması veya total kalpain-1 düzeyi yanı sıra aktif kalpain-1 (Cleaved Calpain-1) düzeyine bakılmasının uygun olacağını düşünmekteyiz.

- Deney protokolümüzde melatonin uygulandıktan sonra morfolojik değerlendirme için 48 saat beklenme gereği ve sonrasında kalpain-1 protein ifadenmesinin değerlendirilmesinin sonuçları etkilememesi için n sayısını artırarak tekrarlanması ve bekleme sürecini 24 saat azaltarak zamansal faktörün etkisinin de ortaya konması önerilmektedir.
- Hacettepe Üniversitesi tarafından desteklenen projemiz kapsamında devam eden çalışmada morfolojik değişimin beklenmesi yerine atrofik etki oluşumunu literatürde belirtildiği gibi kasta erken dönemde etkinleşen Atrogin 1 ve MURF 1 genlerinin ifadenme düzeylerinin çalışılması planlanmaktadır. Böylece farklılaşmış C2C12 hücrelerinde atrofinin oluşturduğu morfolojiyi bekleme zorunluluğu olmadan atrofi yolağının uyarılması hakkında diğer parametrelerle beraber erken ön bilgi alınabileceği düşünülmektedir.
- Literatürde melatonin tedavisinde; GSH, katalaz ve hücreSEL SOD değişiminin farklı yolları aktive ederek farklı sonuçlar doğurduğu ifade edilmiştir. Bu antioksidan enzimlerin düzeyine bakmak da bu konuyu açıklığa kavuşturmak için önerilebilmektedir.
- Bulgularımızın işaret ettiği muhtemel etkileşimin daha ayrıntılı açıklanabilmesi amacı ile antioksidan enzimlerin yanı sıra malondialdehide (MDA) düzeyine de bakılması doku hasarının bir göstergesi olarak destekleyici bir bulgu olabilir.

7.KAYNAKLAR

1. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease models & mechanisms*. 2013;6(1):25-39.
2. Romanello V, Sandri M. Mitochondrial Quality Control and Muscle Mass Maintenance. *Frontiers in physiology*. 2015;6:422.
3. Huang J, Zhu X. The molecular mechanisms of calpains action on skeletal muscle atrophy. *Physiological research*. 2016;65(4):547-60.
4. McClung JM, Judge AR, Talbert EE, Powers SK. Calpain-1 is required for hydrogen peroxide-induced myotube atrophy. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009;296(2):C363-71.
5. McClung JM, Kavazis AN, Whidden MA, DeRuisseau KC, Falk DJ, Criswell DS, et al. Antioxidant administration attenuates mechanical ventilation-induced rat diaphragm muscle atrophy independent of protein kinase B (PKB Akt) signalling. *The Journal of physiology*. 2007;585(Pt 1):203-15.
6. Miller AA, Drummond GR, Sobey CG. Reactive oxygen species in the cerebral circulation: are they all bad? *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(7-8):1113-20.
7. Tan DX, Manchester LC, Qin L, Reiter RJ. Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and Dynamics. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(12).
8. Kato H, Tanaka G, Masuda S, Ogasawara J, Sakurai T, Kizaki T, et al. Melatonin promotes adipogenesis and mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of pineal research*. 2015;59(2):267-75.
9. Osseni RA, Rat P, Bogdan A, Warnet JM, Touitou Y. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life sciences*. 2000;68(4):387-99.
10. Cristofanon S, Uguccioni F, Cerella C, Radogna F, Dicato M, Ghibelli L, et al. Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF-kappaB activation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1171:472-8.
11. Chetsawang J, Mukda S, Srimokra R, Govitrapong P, Chetsawang B. Role of Melatonin in Reducing Amphetamine-Induced Degeneration in Substantia Nigra of Rats via Calpain and Calpastatin Interaction. *Journal of experimental neuroscience*. 2017;11:1179069517719237.
12. Vriend J, Reiter RJ. Melatonin and ubiquitin: what's the connection? *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2014;71(18):3409-18.
13. Tieland M, Trouwborst I, Clark BC. Skeletal muscle performance and ageing. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2018;9(1):3-19.
14. Sandri M. Autophagy in skeletal muscle. *FEBS letters*. 2010;584(7):1411-6.

15. Reid KF, Fielding RA. Skeletal muscle power: a critical determinant of physical functioning in older adults. *Exercise and sport sciences reviews*. 2012;40(1):4-12.
16. Otto H. [Type 2 diabetes in the middle aged. Strict goals from the very beginning!]. *MMW Fortschritte der Medizin*. 2003;145(21):30-2.
17. Stump CS, Henriksen EJ, Wei Y, Sowers JR. The metabolic syndrome: role of skeletal muscle metabolism. *Annals of medicine*. 2006;38(6):389-402.
18. Schnyder S, Handschin C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise. *Bone*. 2015;80:115-25.
19. Guyton, Hall. *Text book of Medical physiology*. 12 ed. Australia: SAUNDERS ELSEVIER; 2014.
20. Sandri M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013;45(10):2121-9.
21. Sartori R, Schirwis E, Blaauw B, Bortolanza S, Zhao J, Enzo E, et al. BMP signaling controls muscle mass. *Nature genetics*. 2013;45(11):1309-18.
22. Sieck GC, Mantilla CB. Effect of mechanical ventilation on the diaphragm. *The New England journal of medicine*. 2008;358(13):1392-4.
23. Salazar JJ, Michele DE, Brooks SV. Inhibition of calpain prevents muscle weakness and disruption of sarcomere structure during hindlimb suspension. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2010;108(1):120-7.
24. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science (New York, NY)*. 2001;294(5547):1704-8.
25. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(25):14440-5.
26. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(1):39-51.
27. Sackey JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, et al. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(1):140-55.
28. Lee SW, Dai G, Hu Z, Wang X, Du J, Mitch WE. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome

systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN. 2004;15(6):1537-45.

29. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular cell*. 2004;14(3):395-403.
30. Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene*. 2008;27(16):2276-88.
31. Milan G, Romanello V, Pescatore F, Armani A, Paik JH, Frasson L, et al. Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nature communications*. 2015;6:6670.
32. Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal muscle*. 2011;1(1):4.
33. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:425-79.
34. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2000;22(5):442-51.
35. Hershko A, Ciechanover A, Rose IA. Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *The Journal of biological chemistry*. 1981;256(4):1525-8.
36. Hasselgren PO. Pathways of muscle protein breakdown in injury and sepsis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 1999;2(2):155-60.
37. Tidball JG, Spencer MJ. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. *The Journal of physiology*. 2002;545(Pt 3):819-28.
38. Grune T, Davies KJ. The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Molecular aspects of medicine*. 2003;24(4-5):195-204.
39. Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, et al. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *The Journal of cell biology*. 2009;185(6):1083-95.
40. Lecker SH, Solomon V, Price SR, Kwon YT, Mitch WE, Goldberg AL. Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(10):1411-20.
41. Tawa NE, Jr., Odessey R, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(1):197-203.

42. Smuder AJ, Nelson WB, Hudson MB, Kavazis AN, Powers SK. Inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway does not protect against ventilator-induced accelerated proteolysis or atrophy in the diaphragm. *Anesthesiology*. 2014;121(1):115-26.
43. Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(1):115-23.
44. Badalamente MA, Stracher A. Delay of muscle degeneration and necrosis in mdx mice by calpain inhibition. *Muscle & nerve*. 2000;23(1):106-11.
45. Dayton WR, Goll DE, Zeece MG, Robson RM, Reville WJ. A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry*. 1976;15(10):2150-8.
46. Talbert EE, Smuder AJ, Min K, Kwon OS, Szeto HH, Powers SK. Immobilization-induced activation of key proteolytic systems in skeletal muscles is prevented by a mitochondria-targeted antioxidant. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2013;115(4):529-38.
47. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2005;37(11):719-27.
48. Ho PK, Hawkins CJ. Mammalian initiator apoptotic caspases. *The FEBS journal*. 2005;272(21):5436-53.
49. Sakamaki K, Satou Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *Journal of fish biology*. 2009;74(4):727-53.
50. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiological reviews*. 2003;83(3):731-801.
51. Elce JS, Hegadorn C, Arthur JS. Autolysis, Ca²⁺ requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(17):11268-75.
52. Nelson WB, Smuder AJ, Hudson MB, Talbert EE, Powers SK. Cross-talk between the calpain and caspase-3 proteolytic systems in the diaphragm during prolonged mechanical ventilation. *Critical care medicine*. 2012;40(6):1857-63.
53. Matsumoto A, Fujita N, Arakawa T, Fujino H, Miki A. Influence of electrical stimulation on calpain and ubiquitin-proteasome systems in the denervated and unloaded rat tibialis anterior muscles. *Acta histochemica*. 2014;116(5):936-42.
54. Kourie JL. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *The American journal of physiology*. 1998;275(1 Pt 1):C1-24.
55. Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Christiansen JA. Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie*. 1992;74(3):225-37.

56. Huang DY, Liu J, Wu XY, Liu HG, Wu AP, Jiang DW, et al. [Effects of neurally adjusted ventilatory assist on prevention of ventilator-induced diaphragmatic dysfunction in acute respiratory distress syndrome rabbits]. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi* = *Zhonghua jiehe he huxi zazhi* = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases. 2011;34(4):288-93.
57. Ba HV, Reddy BV, Hwang I. Role of calpastatin in the regulation of mRNA expression of calpain, caspase, and heat shock protein systems in bovine muscle satellite cells. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2015;51(5):447-54.
58. Saido TC, Kawashima S, Tani E, Yokota M. Up- and down-regulation of calpain inhibitor polypeptide, calpastatin, in postischemic hippocampus. *Neuroscience letters*. 1997;227(2):75-8.
59. Tangmansakulchai K, Abubakar Z, Kitiyanant N, Suwanjang W, Leepiyasakulchai C, Govitrapong P, et al. Calpastatin overexpression reduces oxidative stress-induced mitochondrial impairment and cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells by decreasing calpain and calcineurin activation, induction of mitochondrial fission and destruction of mitochondrial fusion. *Mitochondrion*. 2016;30:151-61.
60. Kondo H, Miura M, Itokawa Y. Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta physiologica Scandinavica*. 1991;142(4):527-8.
61. Powers SK. Can antioxidants protect against disuse muscle atrophy? *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 2014;44 Suppl 2:S155-65.
62. Li YP, Chen Y, Li AS, Reid MB. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *American journal of physiology Cell physiology*. 2003;285(4):C806-12.
63. Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, et al. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(3):362-70.
64. Higaki Y, Mikami T, Fujii N, Hirshman MF, Koyama K, Seino T, et al. Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;294(5):E889-97.
65. Prochniewicz E, Lowe DA, Spakowicz DJ, Higgins L, O'Connor K, Thompson LV, et al. Functional, structural, and chemical changes in myosin associated with hydrogen peroxide treatment of skeletal muscle fibers. *American journal of physiology Cell physiology*. 2008;294(2):C613-26.
66. Altenhofer S, Radermacher KA, Kleikers PW, Wingler K, Schmidt HH. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxidants & redox signaling*. 2015;23(5):406-27.

67. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016:4350965.
68. Bouzid MA, Filaire E, McCall A, Fabre C. Radical Oxygen Species, Exercise and Aging: An Update. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 2015;45(9):1245-61.
69. Powers SK, Hudson MB, Nelson WB, Talbert EE, Min K, Szeto HH, et al. Mitochondria-targeted antioxidants protect against mechanical ventilation-induced diaphragm weakness. *Critical care medicine*. 2011;39(7):1749-59.
70. Sivakumar AS, Hwang I. Effects of Sunphenon and Polyphenon 60 on proteolytic pathways, inflammatory cytokines and myogenic markers in H₂O₂-treated C2C12 cells. *Journal of biosciences*. 2015;40(1):53-9.
71. Oyewole AO, Birch-Machin MA. Mitochondria-targeted antioxidants. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2015;29(12):4766-71.
72. Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC, et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(7):4588-96.
73. Broome SC, Woodhead JST, Merry TL. Mitochondria-Targeted Antioxidants and Skeletal Muscle Function. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2018;7(8).
74. Smith RA, Murphy MP. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1201:96-103.
75. Lukashev AN, Skulachev MV, Ostapenko V, Savchenko AY, Pavshintsev VV, Skulachev VP. Advances in development of rechargeable mitochondrial antioxidants. *Progress in molecular biology and translational science*. 2014;127:251-65.
76. Stehle J, Reuss S, Riemann R, Seidel A, Vollrath L. The role of arginine-vasopressin for pineal melatonin synthesis in the rat: involvement of vasopressinergic receptors. *Neuroscience letters*. 1991;123(1):131-4.
77. Tan DX, Manchester LC, Sanchez-Barcelo E, Mediavilla MD, Reiter RJ. Significance of high levels of endogenous melatonin in Mammalian cerebrospinal fluid and in the central nervous system. *Current neuropharmacology*. 2010;8(3):162-7.
78. Dawson D, Encel N. Melatonin and sleep in humans. *Journal of pineal research*. 1993;15(1):1-12.
79. Reiter RJ, Tamura H, Tan DX, Xu XY. Melatonin and the circadian system: contributions to successful female reproduction. *Fertility and sterility*. 2014;102(2):321-8.

80. Waldhauser F, Ehrhart B, Forster E. Clinical aspects of the melatonin action: impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions. *Experientia*. 1993;49(8):671-81.
81. Pardridge WM, Mietus LJ. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry*. 1980;34(6):1761-3.
82. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *Journal of pineal research*. 2007;42(1):28-42.
83. Tan DX, Manchester LC, Liu X, Rosales-Corral SA, Acuna-Castroviejo D, Reiter RJ. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *Journal of pineal research*. 2013;54(2):127-38.
84. Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Manchester LC. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2013;13(3):373-84.
85. Venegas C, Garcia JA, Escames G, Ortiz F, Lopez A, Doerrier C, et al. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *Journal of pineal research*. 2012;52(2):217-27.
86. Sakaguchi K, Itoh MT, Takahashi N, Tarumi W, Ishizuka B. The rat oocyte synthesises melatonin. *Reproduction, fertility, and development*. 2013;25(4):674-82.
87. Salucci S, Baldassarri V, Canonico B, Burattini S, Battistelli M, Guescini M, et al. Melatonin behavior in restoring chemical damaged C2C12 myoblasts. *Microscopy research and technique*. 2016;79(6):532-40.
88. Maarman GJ, Andrew BM, Blackhurst DM, Ojuka EO. Melatonin protects against uric acid-induced mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and triglyceride accumulation in C2C12 myotubes. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2017;122(4):1003-10.
89. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta biochimica Polonica*. 2003;50(4):1129-46.
90. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of pineal research*. 2004;36(1):1-9.
91. Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Experimental neurology*. 2007;208(1):1-25.

92. Maguire-Zeiss KA, Federoff HJ. Future directions for immune modulation in neurodegenerative disorders: focus on Parkinson's disease. *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria : 1996). 2010;117(8):1019-25.
93. Good PF, Olanow CW, Perl DP. Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: a LAMMA study. *Brain research*. 1992;593(2):343-6.
94. Padurariu M, Ciobica A, Lefter R, Serban IL, Stefanescu C, Chirita R. The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Psychiatria Danubina*. 2013;25(4):401-9.
95. Acuna-Castroviejo D, Coto-Montes A, Gaia Monti M, Ortiz GG, Reiter RJ. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life sciences*. 1997;60(2):PI23-9.
96. Wang J, Xiao X, Zhang Y, Shi D, Chen W, Fu L, et al. Simultaneous modulation of COX-2, p300, Akt, and Apaf-1 signaling by melatonin to inhibit proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells. *Journal of pineal research*. 2012;53(1):77-90.
97. Alvarez-Garcia V, Gonzalez A, Alonso-Gonzalez C, Martinez-Campa C, Cos S. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvascular research*. 2013;87:25-33.
98. Aparicio-Soto M, Alarcon-de-la-Lastra C, Cardeno A, Sanchez-Fidalgo S, Sanchez-Hidalgo M. Melatonin modulates microsomal PGE synthase 1 and NF-E2-related factor-2-regulated antioxidant enzyme expression in LPS-induced murine peritoneal macrophages. *British journal of pharmacology*. 2014;171(1):134-44.
99. Holkova B, Grant S. Proteasome inhibitors in mantle cell lymphoma. *Best practice & research Clinical haematology*. 2012;25(2):133-41.
100. Wolfler A, Caluba HC, Abuja PM, Dohr G, Schauenstein K, Liebmann PM. Prooxidant activity of melatonin promotes fas-induced cell death in human leukemic Jurkat cells. *FEBS letters*. 2001;502(3):127-31.
101. Spencer MJ, Mellgren RL. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Human molecular genetics*. 2002;11(21):2645-55.
102. Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. 1977;270(5639):725-7.
103. Alwan R, Bruel AL, Da Silva A, Blanquet V, Bouhouche K. An siRNA-based screen in C2C12 myoblasts identifies novel genes involved in myogenic differentiation. *Experimental cell research*. 2017;359(1):145-53.
104. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.

105. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*. 1986;89(2):271-7.
106. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer research*. 1987;47(4):936-42.
107. Menconi M, Gonnella P, Petkova V, Lecker S, Hasselgren PO. Dexamethasone and corticosterone induce similar, but not identical, muscle wasting responses in cultured L6 and C2C12 myotubes. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;105(2):353-64.
108. Belviranli M, Okudan N. Exercise Training Protects Against Aging-Induced Cognitive Dysfunction via Activation of the Hippocampal PGC-1alpha/FNDC5/BDNF Pathway. *Neuromolecular medicine*. 2018;20(3):386-400.
109. Gilda JE, Gomes AV. Western blotting using in-gel protein labeling as a normalization control: stain-free technology. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2015;1295:381-91.
110. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*. 2005;38(12):1103-11.
111. Latocha M, Zieba A, Polaniak R, Kusmierz D, Nowosad A, Jurzak M, et al. MOLECULAR EFFECTS OF AMINE DERIVATIVES OF PHENOTHIAZINE ON CANCER CELLS C-32 AND SNB-19 IN VITRO. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2015;72(5):909-15.
112. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*. 2004;37(4):277-85.
113. Kim CH, Kim KH, Yoo YM. Melatonin protects against apoptotic and autophagic cell death in C2C12 murine myoblast cells. *Journal of pineal research*. 2011;50(3):241-9.
114. Coto-Montes A, Boga JA, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a Potential Agent in the Treatment of Sarcopenia. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(10).
115. Park JH, Chung EJ, Kwon HJ, Im SS, Lim JG, Song DK. Protective effect of melatonin on TNF-alpha-induced muscle atrophy in L6 myotubes. *Journal of pineal research*. 2013;54(4):417-25.
116. Abd Allah ESH, Mahmoud AM. Melatonin attenuates chronic immobilization stress-induced muscle atrophy in rats: Influence on lactate-to-pyruvate ratios and Na(+)/K(+) ATPase activity. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology*. 2018.

117. Samantaray S, Sribnick EA, Das A, Knaryan VH, Matzelle DD, Yallapragada AV, et al. Melatonin attenuates calpain upregulation, axonal damage and neuronal death in spinal cord injury in rats. *Journal of pineal research*. 2008;44(4):348-57.
118. Koksall M, Oguz E, Baba F, Eren MA, Ciftci H, Demir ME, et al. Effects of melatonin on testis histology, oxidative stress and spermatogenesis after experimental testis ischemia-reperfusion in rats. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2012;16(5):582-8.
119. Cakmak Karaer I, Simsek G, Yildiz A, Vardi N, Polat A, Tanbek K, et al. Melatonin's protective effect on the salivary gland against ionized radiation damage in rats. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2016;45(6):444-9.
120. Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1999;39:67-101.
121. Dinc E, Ayaz L, Kurt AH. Protective Effect of Combined Caffeic Acid Phenethyl Ester and Bevacizumab Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in Human RPE Cells. *Current eye research*. 2017;42(12):1659-66.
122. Lee S, Shin J, Hong Y, Lee M, Kim K, Lee SR, et al. Beneficial effects of melatonin on stroke-induced muscle atrophy in focal cerebral ischemic rats. *Laboratory animal research*. 2012;28(1):47-54.
123. Kaur N, Gupta P, Saini V, Sherawat S, Gupta S, Dua A, et al. Cinnamaldehyde regulates H₂ O₂ -induced skeletal muscle atrophy by ameliorating the proteolytic and antioxidant defense systems. *Journal of cellular physiology*. 2018.

Ek 1. Orjinallik Ekran Çıktısı

NAZLI KARIMISAKHVIDI

65 Sayfa

HİDROJEN PEROKSİTE MARUZ KALAN FARE KAS HÜCRE
HATTINDA OLUŞAN ATROFİYE, MELATONİN
UYGULANMASININ KALPAİN-1 İFADELENMESİNE VE
ATROFİK MORFOLOJİYE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

%**3**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

biyologlar.com

İnternet Kaynağı

%**1**

2

Submitted to Celal Bayar Ā niversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

3

neu.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

proteincapture.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

d-nb.info

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

www.tfbd.org.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

polen.itu.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

Submitted to TechKnowledge Turkey

Ek 2. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin **Turnitin**'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Nazli Karimi Sakhvidi
Ödev başlığı: tez 2
Gönderi Başlığı: HİDROJEN PEROKSİTE MARUZ KA..
Dosya adı: F_NAL-Tez-111118-t_rnitin.docx
Dosya boyutu: 12.73M
Sayfa sayısı: 65
Kelime sayısı: 11,677
Karakter sayısı: 84,019
Gönderim Tarihi: 20-Kas-2018 04:07PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1042547476



ÖZGEÇMİŞ

Nazli Karimi Sakhvidi, M.D.PHD

Ev Adresi: Birlik mah, 393.Cad No:21 /4
Çankaya, Ankara, TÜRKİYE
Ev telefonu: +90-3124953789
Cep telefonu: +90-5392930043

İş Adresi: Hacettepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Ana Bilim Dalı
Sihhiye, Ankara, 06100
TÜRKİYE
Telefon: +90-312-305-1567
Faks: +90-312-305-2186
Email: nkarimi@hacettepe.edu.tr, nazlikarimi61@yahoo.com

Vatandaşlık: IRAN

Konuşulan diller: Persian (Akıcı)
Turkish (Akıcı)
English (İleri)

Eğitim:
2001-2004 B.S.Urmia Üniversitesi Tıp Fakültesi, Urmia-Iran
2004-2008 M.D.Urmia Üniversitesi Tıp Fakültesi, Urmia-Iran
2013- Present Ph.D.Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı

Deneyimler:
2009-2010 Kan Bankası Direktörü, Ulusal Kan Bankası, Urmia-Iran
2010-2011 Aile Hekimliği, Ulusal Hükümet Hastanesi, Urmia-Iran
Nikkhah bölgesi nüfusundan sorumlu (~9000 kişi)
2011-2012 Pratisiyen Hekim, Ostadan Kliniği, Urmia-Iran

Diploma: Iran (06/10/2009)

Diğer Profesyonel Deneyimler:

2005-2006	Urmia Üniversitesi Araştırma Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Urmia-Iran
2010-2011	Araştırma Veri Uzmanı, Urmia Üniversitesi İmam Khumeyni Hastanesi Acil Servisi, Urmia-Iran
2010-2011	Urmia Üniversitesi İmam Khumeyni Hastanesi Araştırma Görevlisi Acil Servisi, Urmia-Iran
2013-2018	Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi, Ankara ,Turkey

Seminerler:

Iran	Prevalence of Obsessive-Compulsive disorders in Urmia University, Urmia-Iran, 2006.
	Mitochondrial physiology, Hacettepe university, Physiology Department -2014
	Mitochondrial dysfunctional disease research methods, Hacettepe university, Physiology Department -2014
	Psoriasis disease and oxidative stress, Hacettepe university Physiology Department -2016
	Transfection methods and cell culture, Hacettepe university, Physiology Department -2018

Pratisiye Hekimlik tezi: Relationship between BMI and Pilonidal Sinus in Imam Khomeini Hospital”, Urmia University, Urmia-Iran, 2007.

Beceri: Microsoft software (Word, Excel, PowerPoint, Keynote) İmage J (İmageJ is a public domain, Java-based image processing program developed at the National Institutes of Health)

Biopac Studentlaboratory Program (i.e.; Data Acquisition Program) Cell culture experiments

Başlıca Araştırma Alanları:

1. Mitochondrial targeted therapy applications to prevent the oxidative stress.
2. Skeletal muscle atrophy and underlying signaling pathways.
3. Cell culture
4. Aging Physiology
5. Neuroscience