

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IN VITRO HİPOKSİ-REPERFÜZYON İLE
İNDÜKLENEN İNSAN KORONER ARTER
ENDOTEL HÜCRE HASARINA YEŞİL ÇAY
BİLEŞENLERİNDEN (EPİGALLOKATEŞİN-3-
GALAT VE POLİFENON 60)'INVE KOENZİM
Q10'UN OLASI KORUYUCU ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

UZM. DR. PÜREDA YAZICI

BİYOKİMYA
DOKTORA TEZİ
İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2006970012

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IN VİTRO HİPOKSİ-REPERFÜZYON İLE
İNDÜKLENEN İNSAN KORONER ARTER
ENDOTEL HÜCRE HASARINA YEŞİL ÇAY
BİLEŞENLERİNDEN (EPİGALLOKATEŞİN-3-
GALAT VE POLİFENON 60)'INVE KOENZİM
Q10'UN OLASI KORUYUCU ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

BİYOKİMYA
DOKTORA TEZİ

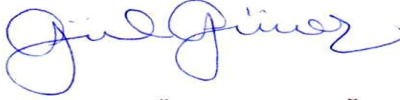
UZM. DR. PÜREDA YAZICI

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Gül Akdoğan-Güner

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2006.KB.SAG.009 sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2006970012

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya
Doktora programı öğrencisi **Püreda YAZICI** ‘**In vitro hipoksi-reperfüzyon ile indüklenen
insan koroner arter endotel hücre hasarına yeşil çay bileşenlerinden (epigallocateşin-3
galat ve polifenon 60)’ın koenzim Q10’un olası koruyucu etkisinin incelenmesi**’ konulu
doktora tezini 24/06/2016 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN
(DEÜ Tıp Fak. Biyokimya AD.)
BAŞKAN



Prof. Dr. Canan ÇOKER
(DEÜ Tıp Fak. Biyokimya AD.)
ÜYE



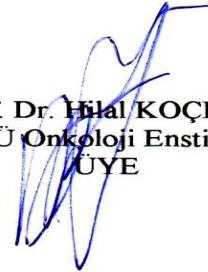
Prof. Dr. Taner ONAT
(EÜ Tıp Fak. Biyokimya AD.)
ÜYE

Prof. Dr. Halil RESMİ
(DEÜ Tıp Fak. Biyokimya AD.)
ÜYE

Prof. Dr. Hilal KOÇDOR
(DEÜ Onkoloji Enstitüsü)
ÜYE



Prof. Dr. G. Hüseyin İŞLEKEL
(DEÜ Tıp Fak. Biyokimya AD.)
YEDEK ÜYE



Doç. Dr. Ebru SEZER
(EÜ Tıp Fak. Biyokimya AD.)
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	iii
KISALTMALAR.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2

1 GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi.....	3
1.2. Araştırmanın Amacı.....	3
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	4

2 GENEL BİLGİLER

2.1. EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un yapısı ve çözünürlükleri.....	5
2.2. EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un farmakokinetikleri.....	8
2.3. Yeşil çayın kardiyovasküler etkileri.....	8
2.4. Yeşil çayın lipid profiline etkisi.....	10
2.5. Yeşil çay ve obezite.....	12
2.6. Yeşil çayın antioksidan etkisi.....	13
2.7. Yeşil çay hücre proliferasyonunu önüyor.....	13

2.7.1. Prostat kanseri.....	13
2.7.2. Mesane kanseri.....	13
2.7.3. Meme kanseri.....	14
2.7.4. Kolon kanseri.....	15
2.7.5. Melanoma.....	15
2.8. Koenzim Q10 güçlü antioksidan.....	15
2.9. Endotel hücresi.....	15
2.10. Hipoksi ve Kalp.....	17
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1 Gereç.....	18
3.2 Yöntem.....	19
3.2.1 Hücre kültürü.....	19
3.2.1.1 Ortam hazırlanması.....	20
3.2.1.2 Hücrenin çözülmesi.....	21
3.2.1.3 Hücrenin beslenmesi.....	21
3.2.1.4 Hücrenin pasajlanması.....	21
3.2.1.5 Tripan Blue boyama.....	22
3.2.1.6 96 kuyulu plağa ekim.....	23
3.2.2 Fluorometrik yöntemle ROS ölçümü.....	23
3.2.3 Spektrofotometrik yöntemle LDH ölçümü.....	24
3.2.4 İstatistik analiz.....	24
4 BULGULAR.....	25

4.1	Reaktif oksijen radikali (ROS).....	25
4.2	Laktat dehidrojenaz (LDH).....	57
5	TARTIŞMA.....	72
6	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	76
7	KAYNAKLAR.....	77
8	ETİK KURUL BELGESİ.....	81
9	TEZDEN TÜREYEN YAYINLAR.....	83
10	ÖZGEÇMİŞ.....	92



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Yeşil çay ve siyah çayın karşılaştırılması

Tablo 2: Yeşil çay ekstraktı ve Polifenon 60 bileşim yüzdeleri

Tablo 3: AR 25 katekol olarak adlandırılan yeşil çayın 5 hf kronik kullanımı sonrası lipid profili ve okside LDL düzeyleri

Tablo 4: Yeşil çayın lipid profiline etkisi

Tablo 5a: Normoksik plak (33 saat)

Tablo 5b: (24 saat adezyon-2 saat enkübasyon-6 saat hipoksi-1 saat reoksijenizasyon) uygulaması

Tablo 5c: Normoksik plak (36 saat)

Tablo 5d: (24 saat adezyon-2 saat enkübasyon-6 saat hipoksi-4 saat reoksijenizasyon) uygulaması

Tablo 5e: Normoksik plak (50 saat)

Tablo 5f: (24 saat adezyon-2 saat enkübasyon-6 saat hipoksi-18 saat reoksijenizasyon) uygulaması

Tablo 6: 1. Deney seti grup numaralarının isimleri

Tablo 7: 1. deney seti verilerinin istatistik karşılaştırmaları (p değeri)

Tablo 8a: Normoksik plak (72 saat 15 dk)

Tablo 8b: (24 saat adezyon-24 saat enkübasyon-24 saat hipoksi-15 dk reoksijenizasyon) uygulaması

Tablo 8c: Normoksik plak (73 saat)

Tablo 8d: (24 saat adezyon-24 saat enkübasyon-24 saat hipoksi-1 saat reoksijenizasyon) uygulaması

Tablo 8e: Normoksik plak (75 saat)

Tablo 8f: (24 saat adezyon-24 saat enkübasyon-24 saat hipoksi-3 saat reoksijenizasyon) uygulaması

Tablo 9: 2. Deney seti grup numaralarının isimleri

Tablo 10: 2. deney seti istatistik verilerinin karşılaştırılması (p değeri)

Tablo 11a: (48 saatlik) uygulama plağı

Tablo 11b: (48 saat+15 dk) uygulama plağı

Tablo 11c: (48 saat+1 saat) uygulama plağı

Tablo 11d: (48 saat+3 saat) uygulama plağı

Tablo 12: 3. Deney seti grup numaralarının isimleri

Tablo 13: 3. deney seti istatistik verilerinin karşılaştırılması (p değeri)

Tablo 14a: (48 saat +15 dk) normoksi plağı

Tablo 14b: (24 saat adezyon+24 saat (enkübasyon+hipoksi)-15 dk reoksijenizasyon) uygulaması

Tablo 15: 4. Deney seti grup numaralarının isimleri

Tablo 16: 4. deney seti istatistik verilerinin karşılaştırılması (p değeri)

Tablo 17a: Normoksik plak (72 saat 15 dk)

Tablo 17b: (24 saat adezyon-24 saat enkübasyon-24 saat (hipoksi+enkübasyon)-15 dk reoksijenizasyon) uygulaması

Tablo 18: 5. Deney seti grup numaralarının isimleri

Tablo 19: 5. deney seti istatistik verilerinin karşılaştırılması (p değeri)

Tablo 20a. Normoksik plak (72 saat 15 dk)

Tablo 20b: (24 saat adezyon-24 saat enkübasyon-24 saat (hipoksi+enkübasyon)-15 dk reoksijenizasyon) uygulaması

Tablo 21: 6. Deney seti grup numaralarının isimleri

Tablo 22: 6. deney seti istatistik verilerinin karşılaştırılması (p değeri)

Tablo 23: PBS, optimem ve EGM-2 ortamlarının normoksik ve farklı süre hipoksik koşullarda LDH düzeyi

Tablo 24: Hücre sayısı denemesi (ROS)

Tablo 25: 0-4-16-30-54 saat normoksi ve hipoksi koşulları için maksimum hücre nekrozu koşuluna oranla hesaplanan % sitotoksisite değerleri

Tablo 26: LDH ölçümü yapılan 2. deney setindeki verilerin grup numaralarının isimleri

Tablo 27: LDH ölçümü yapılan 2. deney setindeki verilerin istatistiksel olarak karşılaştırılması (p değeri)

Tablo 28: Hipoksi ve farklı sürelerdeki reoksijenizasyonun LDH düzeyine etkisi

Tablo 29: LDH deneyi 3. deney seti verilerinin grup numaralarının isimleri

Tablo 30: LDH deneyi 3. deney seti verilerinin istatistiksel karşılaştırılması (p değeri)

Tablo 31: Kontrol grubunda optimem, deney grubunda PBS kullanılan LDH % sitotoksisite ölçüm sonuçları

Tablo 32: LDH deneyi 4. deney seti verilerinin grup numaralarının isimleri

Tablo 33: LDH deneyi 4. deney seti verilerinin istatistiksel karşılaştırılması (p değeri)

Tablo 34: 5. deney seti uygulama plağı dizilimi

Tablo 35: EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10 ile yapılan 5 saat inkübasyon sonucu LDH % sitotoksisite değerleri

Tablo 36: LDH deneyi 5. deney seti verilerinin grup numaralarının isimleri

Tablo 37: LDH deneyi 5. deney seti verilerinin istatistiksel karşılaştırılması (p değeri)



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Yeşil çay ve siyah çayın etken maddeleri

Şekil 2: Koenzim Q10'un yapısı

Şekil 3: EGCG (2 mg/kg) alınımı sonrası 7 kişiye ait EGCG plazma konsantrasyonunun zamana bağlı grafiği

Şekil 4: Kateşinlerin etkileri

Şekil 5: EGCG' nin obeziteye etkisi

Şekil 6: EGCG' nin hücre proliferasyonuna etkisi

Şekil 7: Mesane tümör volümü

Şekil 8: Mikrodamar yoğunluğu

Şekil 9: Endotelde salgılanan veya eksprese edilen maddeler

Şekil 10: Hipoksik kabin

Şekil 11: HCAEC hücrelerinin mikroskopda görüntüsü

Şekil 12: HCAEC hücrelerinin tripan blue boyasıyla boyanmış thoma lamındaki görüntüsü

Şekil 13a: Normoksik plak

Şekil 13b: Uygulama plağı

Şekil 14a: ROS düzeyi

Şekil 14b: ROS düzeyi

Şekil 14c: ROS düzeyi

Şekil 15a: Normoksik plak

Şekil 15b: Uygulama plağı

Şekil 16a: ROS düzeyi

Şekil 16b: ROS düzeyi

Şekil 16c: ROS düzeyi

Şekil 17a: Normoksik plak

Şekil 17b: Uygulama plağı

Şekil 18a: ROS düzeyi

Şekil 19: (48 saat+15 dk) uygulaması

Şekil 20: ROS düzeyi

Şekil 21: (72 saat+15dk) uygulaması

Şekil 22: ROS düzeyi

Şekil 23: (72 saat+15 dk) uygulaması

Şekil 24: ROS düzeyi

Şekil 25: 2. deney seti akış şeması

Şekil 26: LDH ölçümü

Şekil 27: 3. deney seti akış şeması

Şekil 28: 3. deney seti sütun grafiği LDH % sitotoksitesi

Şekil 29: LDH % sitotoksitesi

Şekil 30: 4. deney seti akış şeması

Şekil 31: LDH % sitotoksiste

Şekil 32: LDH % sitotoksiste



KISALTMALAR

HCAEC: İnsan Koroner Arter Endotel Hücresi
EGCG: Epigallokateşin-3-galat
PBS: Fosfat tuzlu tampon
GTE: Yeşil çay ekstraktı
ROS: Reaktif oksijen radikali
LDH: Laktat dehidrojenaz
SAM: S-adenozil metiyonin
AR25 katekol: Camillia Sinensisin alkol ekstresi
KVH: Kardiyovasküler hastalık
PAF: Trombosit aktive edici faktör
ICAM: İntersellüler adezyon molekülü
VCAM: Vasküler hücre adezyon molekülü
NO: Nitrik oksit
MCP-1: Monosit kemoatraktan protein
IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü
GLUT: Glikoz taşıyıcısı
BBN: N-bütil-N-4-hidroksibütil-nitrozamin
“HPF: high power field”
GTP: Yeşil çay polifenolü
HRG: Heregulin-b 1
VEGF: Vasküler endoteliyel büyüme faktörü
Hıf-1: Hipoksi indükleyici faktör
VEGFR: Vasküler endoteliyel büyüme faktörü reseptörü
EGM-2: Endotel büyüme ortamı
TNS: Tripsin nötralize edici solüsyon
HEPES: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit tamponu
HPF: Hidroksi fenil fluoressan
PGI₂: Prostoglandin I₂
AT III: Antitrombin III
tPA: Doku plazminojen aktivatörü
vWF: von Willebrand faktör
TXA₂: Tromboksan A₂
PAF: Trombosit aktive edici faktör

PAI-1: Trombosit aktive edicisini inhibe edici faktör 1

PAI-2: Trombosit aktive edicisini inhibe edici faktör 2

PDGF: Trombositlerden derive olan büyüme faktörü

EDGF: Endotelden derive olan büyüme faktörü

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

TGF-b: Tümör büyüme faktörü beta

GM-CSF: Granülosit monosit- koloni uyarıcı faktör

G-CSF: Granülosit koloni uyarıcı faktör

ACE: Anjiotansini çevirici enzim

TXF_{2a}: Tromboksan F_{2a}

PGE₂: Prostaglandin

IL-1: İnterlökin 1

IL-6: İnterlökin 6

IL-8: İnterlökin 8

LTB₄: Lökotrien B₄

LTC₄: Lökotrien C₄

LTD₄: Lökotrien D₄

LTE₄: Lökotrien E₄

MCP-1: Monosit kemoatraktan protein 1

MCP-2: Monosit kemoatraktan protein 2

Teşekkürler;

Biyokimya doktora eğitimim boyunca desteğini, esirgemeyen tez hocam Sayın Prof. Dr. Gül Akdoğan Güner'e, tez izleme komite üyeleri Prof. Dr. Halil Resmi ve Prof. Dr. Kemal Kürşad Genç (eski üye) ve yeni üye Doç. Dr. Hilal Koçdor'a; ARLAB çalışanlarına ve Biyokimya ABD ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çalışanlarına ve Sayın Eski Rektör Emin Alıcı, ve Genel Sekreter Yardımcısı babam Sayın Murat Yazıcı' ya ağabeyim Mehmet Yazıcı ve arkadaşım Hamza Duygu'ya tezimi gerçekleştirmemde imkan tanıdıkları için teşekkür ederim.

Uzm. Dr. Püreda Yazıcı

Özet

Giriş: Bu tezde *in vitro* İnsan Koroner Arter Endotel Hücrelerinde (HCAEC) hipoksi/reoksijenizasyon ve veya iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturularak yeşil çay (epigallokateşin-3-galat=EGCG, Polifenon 60) ve Koenzim Q10'un bu hasardan koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırıldı. EGCG; yeşil çayın% 60 'ını oluşturan anti-oksidan özelliği en yüksek olduğu düşünülen bileşiğidir. Polifenon 60 ise yeşil çayın içinde bulunan EGCG, epikateşin, galat, epikateşin, epigallokateşin gibi bileşenlerin bir karmasıdır. Yeşil çay ve koenzim Q10 antioksidan özellikleriyle bilinen maddelerdir.

Yöntem: Deneyler ticari olarak 3. pasajda satın alınan HCAEC hücrelerinde yapıldı. Hipoksi oluşturmak için %95 N₂, %5 CO₂ içeren tüple havalandırıldı. Reoksijenizasyon için %5 CO₂-%95 hava karışımı içeren 37°C CO₂ inkübatörü kullanıldı. Oksidan dengeyi değerlendirmek için reaktif oksijen radikali (ROS), hücre canlılığını değerlendirmek için laktat dehidrojenaz (LDH) ölçümü yapıldı. Hücre kültür ortamı olarak % 5 serum içeren EGM-2, düşük serum içerikli optimem, ve beslenme faktörlerinden yoksun fosfat tamponlu tuz (PBS) kullanıldı.

Bulgular: EGCG' ın antioksidan ve prooksidan, Polifenon 60'ın prooksidan, Koenzim Q10'un antioksidan özellikte olduğu saptandı (p<0.05). Fizyolojik dozda EGCG'ın ve Polifenon 60'ın hücre nekrozunu azalttığı bulundu (p<0.05). Yüksek doz (100µM) Koenzim Q10 'un hücre nekrozuna neden olduğu bulundu (p<0.05).

Sonuç: *In vitro* hipoksi+iskemi modelinde; fizyolojik dozda EGCG (200 µM) ve Koenzim Q10'un (10 µM) hücreleri oksidan hasardan koruduğu, hipoksi modelinde gene fizyolojik dozda EGCG (200 µM) ve Polifenon 60'ın (10 µg/ml) hücre nekrozunu önlediği bulunmuştur. Kalp krizinin deneysel bir modeli olan çalışmamızda yeşil çay ve Koenzim Q10 tedavide olumlu bakış açısı oluşturmaktadır.

Anahtar sözcükler: Hipoksi, iskemi, HCAEC, green tea, koenzim Q10

Abstract

Introduction: In this thesis, *in vitro* in Human Coronary Artery Endothelial Cells by forming hypoxia/reoxygenation and or ischemia/reperfusion injury; it is investigated that green tea (epigallocatechin-3 gallate=EGCG, Polyphenon 60) and Coenzyme Q10 is protective from that injury or not. EGCG is the component by thought the greatest antioxidant property and is the 60.th percent of green tea. Polyphenon 60 is also in green tea; EGCG, epicatechin galat, epicatechin, epigallocatechin like components mixture. Green tea and Coenzyme Q10 are the components by known their antioxidant properties.

Method: Experiments is done in HCAEC that is buy with commercially in 3.th passage. For forming hypoxia it is aerated by %95 N₂, %5 CO₂ tube. For reoxygenation; which has %5 CO₂-%95 air mixture; CO₂ incubator is used. For oxidant balance assessments reactive oxygen species (ROS) and for cell viability determination lactate dehydrogenase (LDH) test is measured. And for cell culture medium EGM-2 with %5 serum, and optimum with low grade serum, and phosphate buffered saline (PBS) without nutrition factors is used.

Results: EGCG is both anti and prooxidant, Polyphenon 60 is prooxidant, Coenzyme Q10 is antioxidant being determined ($p<0.05$). Its found that in physiologic doses both EGCG and Polyphenon 60 are reduced cell necrose ($p<0.05$) and found that high dose Coenzyme Q10 (100 μ M) is resulted with cell necrose ($p<0.05$).

Conclusion: In our *in vitro* hypoxia+ischemia model; in physiologic doses EGCG (200 μ M) and Coenzyme Q10 (10 μ M) is protected cells from oxidant injury; and in hypoxia model also in physiologic doses 200 μ M EGCG and 10 μ g/ml Polyphenon 60 are prevented the cell necrose; is found. In myocard injury model of our experiments, green tea and coenzyme Q10 can be useful in treatment.

Keywords: Hypoxia, ischemia, HCAEC, green tea, coenzyme Q10

1. Giriş ve Amaç

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Kardiyovasküler hastalıklardan 2004 yılında 17.1 milyon kişi ölmüştür; bu, toplam ölümlerin %29' udur. Olguların 7.2 milyonu koroner arter hastalığı, 5.7 milyonu inmedir. Kalp hastalıkları için genetik etkenler % 20' yi oluştururken %80'i çevresel etkenler (yaşam tarzı, beslenme alışkanlıkları) ile ilişkilidir. Yeşil çay içenlerde kardiyovasküler hastalıklar daha az sıklıkla görülmektedir (1). Ayrıca yeşil çay total kolesterol ve okside LDL düzeylerini düşürmektedir (2). Kan şekerini düşürerek Tip 2 diyabetten korunma sağlamaktadır (3). Obeziteyi önlemektedir (4). Uzun süre EGCG kullanımının metabolik sendrom bulgularını düzelttiğinden bahsedilmektedir (5).

Koenzim Q10 ise konjestif kalp yetmezliklerinde kalp performansını artırıcı, iskemik kalp hastalıklarında ise myositlerde oksidan stresi azaltıcı işleve sahiptir; antioksidanlar NO inaktivasyonunu engelleyerek endotel fonksiyonunu iyileştirmektedirler (6).

Epigallokateşin galat (EGCG); içerdiği galloil gruplarıyla yeşil çayın % 60'ını oluşturan bileşenidir. Polifenon 60 ise EGCG ve diğer yeşil çay bileşenlerinin bir karışımıdır. Koenzim Q10 ise güçlü antioksidan özelliğiyle bilinen bir maddedir.

Yeşil çay ve Koenzim Q10'un kalp damar sistemi ve endoteli üzerine olan olumlu etkileri düşünüldünce insan koroner arter endotel hücrelerinde (HCAEC) hipoksi ve veya iskemi modeli çalışmak mantıklı bulunacaktır. Yapılan literatür araştırmasında bu üç bileşiğin *in vitro* insan koroner arter endotel hücre ortamında hipoksik durumda etkileri üzerine bir çalışmaya rastlanmamıştır.

1.2. Bu araştırmanın amacı

İnsan koroner arter hücrelerinin, *in vitro* hipoksi/reoksijenizasyon hasarına; EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un olası etkilerini araştırmaktır. Bu amaç doğrultusunda şu hedefler belirlenmiştir.

- EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un hipoksi-reoksijenizasyon ile oluşturulan reaktif oksijen radikalleri (ROS) üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

- EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un hipoksi-reoksijenizasyon ve hipoksi ile oluşturulan hücre nekrozuna etkisinin LDH ile değerlendirilmesi

1.3. Bu araştırma aşağıdaki hipotezlerden oluşmaktadır

- EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10; insan koroner arter endotel hücrelerini; in vitro ortamda hipoksi-reoksijenizasyon ile oluşturulan, ROS hasarından korumaktadır.
- EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10; insan koroner arter endotel hücrelerini; in vitro ortamda hipoksi-reoksijenizasyon ve hipoksi ile oluşturulan hücre nekrozundan korumaktadır.



2. Genel Bilgiler

2.1. EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un yapısı ve çözünürlükleri

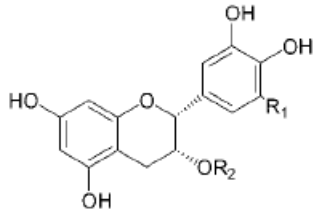
Yeşil çay; son yıllarda zencefilli, bergamotlu, kafeinsiz, ballı, ACE vitaminli, çilekli, tarçınlı karanfilli, yaseminli, limonlu, naneli, nane-limonlu, ginkgolü veya sade çeşitleriyle içime sunulmuştur. Siyah çay tüketimi de hala hız kaybetmeden devam etmektedir. Siyah çayla yeşil çay arasında ne gibi farklılıklar vardır?

Yeşil çay fermente olmadan içilirken, siyah çay demlenme sırasında fermente olmaktadır. Yeşil çay ise eğer pH bazaya kayarsa veya uzun süre demlenirse otoksidasyona uğramaktadır. Tablo 1' de görüldüğü gibi normal şartlar altında yeşil çayın oksidasyon oranı daha düşüktür.

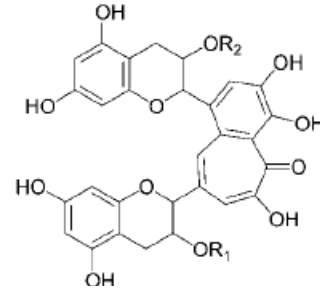
Bileşik	Yeşil çay	Siyah çay
Protein	15	15
Aminoasit	4	4
Fibril	26	26
Karbonhidrat	7	7
Lipid	7	7
Pigment	2	2
Mineral	5	5
Fenolik bileşikler	30	5
Okside fenolik bileşikler	0	25

Tablo 1: Yeşil çay ve siyah çayın karşılaştırılması (7)

Flavanoller



Teflavinler



	R ₁	R ₂		R ₁	R ₂
Epikateşin	H	H	teflavin	H	H
Epigallokateşin	OH	H	Teflavin-3-monogalat	galat	H
Epikateşingalat	H	galat	Teflavin-3'-monogalat	H	galat
Epigallokateşin galat	OH	galat	Teflavin-3,3'-digalat	galat	galat

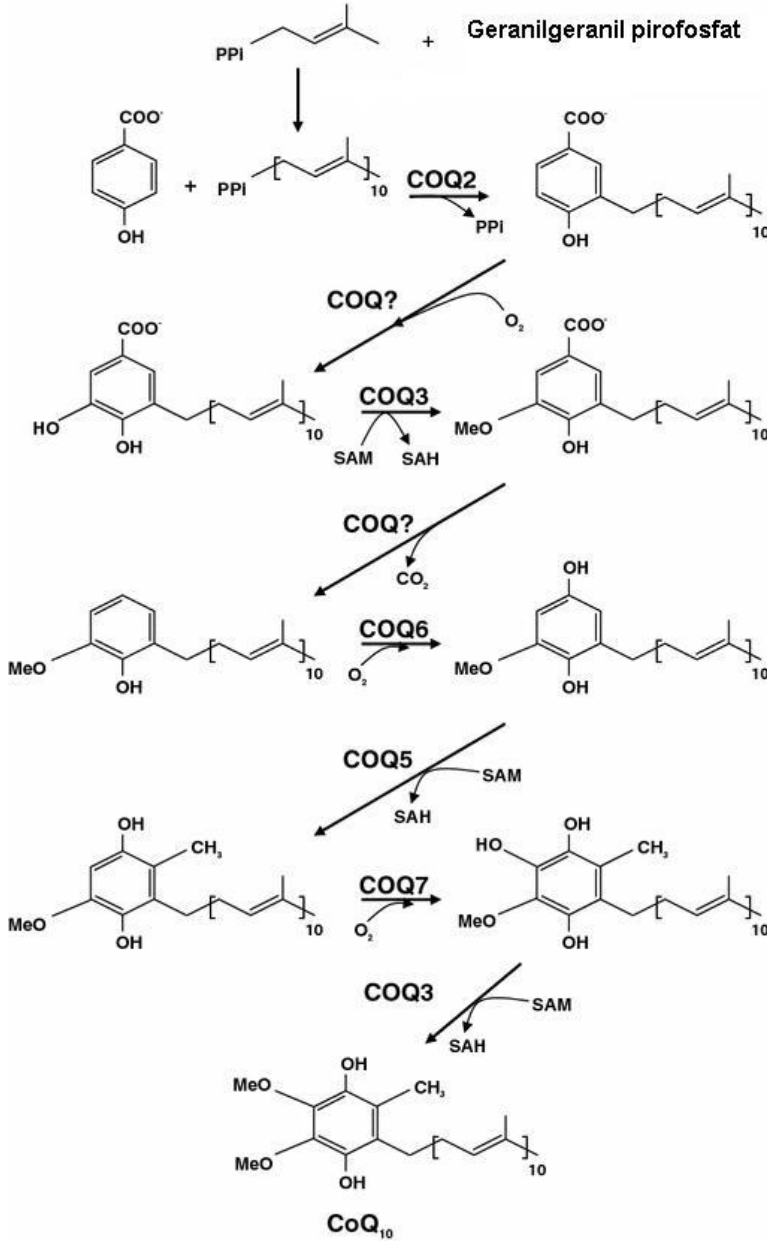
Şekil 1: Yeşil çay ve siyah çayın etken maddeleri (8)

Polifenon 60; ise belli oranlarda yeşil çayın etken maddelerini içeriyor. Yayınlar da kullanılanlar “green tea extract” (GTE)(yeşil çay ekstraktı) veya Polifenon 60 olarak geçmektedir. Bunların içeriklerini tablo 2’den görebiliriz. Bu tezde Polifenon 60 kullanıldı.

Tablo 2: GTE ve Polifenon 60 bileşim yüzdeleri (9)

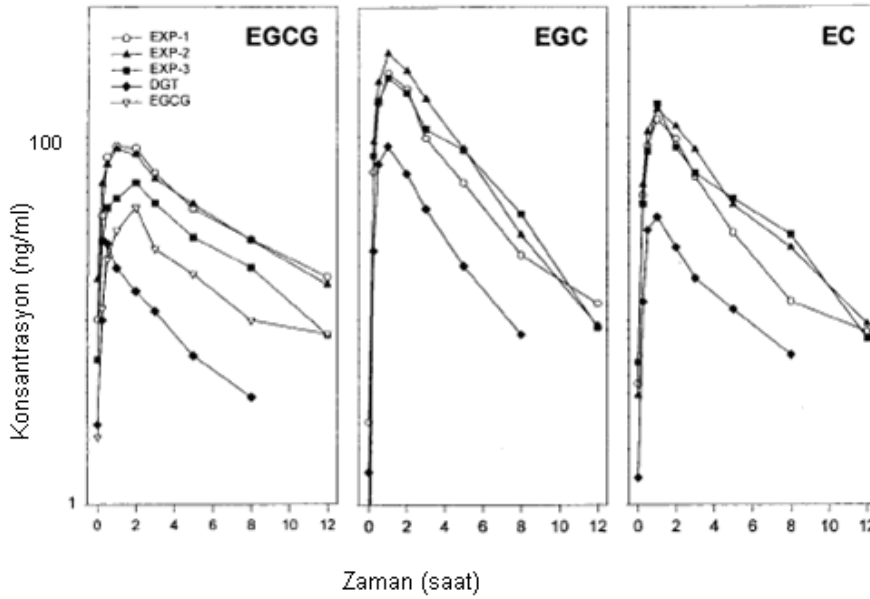
Madde	Kuru ağırlığın yüzdesi	
	GTE	Polifenon 60
Kafein	5.2	Hiç yok
Epigallokateşin	12.2	16.7
Epigallokateşin galat	6.6	34.0
Epikateşin galat	3.6	8.7
Gallokateşin	2.3	saptanamadı
Gallokateşin galat	2.1	2.8
Epikateşin	1.2	7.3
Kateşin galat	0.7	0.5
Kateşin	0.4	saptanamadı
Total kateşinler	29.1	70.0

EGCG ve Polifenon 60; suda çözünüyor, Koenzim Q10 ise kloroformda çözünüyor. Koenzim Q10 ise S-adenozil metiyonin (SAM) kullanılan bir yolakla sentezleniyor (Şekil 2). Koenzim Q aynı zamanda elektron taşıma sisteminin bir elemanıdır.



Şekil 2: Koenzim Q10' un yapısı (10) (Me:metil, SAM: S-adenozil metiyonin)

2.2. EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un farmakokinetikleri



Şekil 3: EGCG (2mg/kg) alınımı sonrası 7 kişiye ait EGCG plazma konsantrasyonunun zamana bağlı grafiği şekilde görülmektedir. (11)

Şekilde görüldüğü üzere EGCG konsantrasyonu yaklaşık olarak 2. saatte pik yaparak 85 ng/ml değere ulaştıktan sonra azalmaktadır. EGCG; idrarda atılmayıp son ürünleri idrara geçmektedir (11). Bir başka çalışmaya göre maksimum plazma konsantrasyonu 326 ng/ml bulunmuş. EGCG' nin yarı ömrünün (5-5.5saat) EGC ve EC' den daha uzun olduğundan bahsedilmektedir (12).

Polifenon 60; bir karışımdır, maddelerin tek tek yarılanma ömürlerini saptamak gerekir.

Döteryum işaretli Koenzim Q10 ile yapılan araştırmada, Koenzim Q10 vücuda alındıktan sonra 6.5 ± 1.5 saat ve 24. saatlerde iki pik yapıyor. Yarılanma ömrü ise 33.19 ± 5.32 saat (13).

2.3. Yeşil çayın kardiyovasküler etkileri

Ayrıca yeşil çay az da olsa hipertansiyonu düşürmektedir (14). İzole sıçan kalpleri 30 dakika iskemi-2 saat reperfüzyona tabi tutuluyor. İskemiden 10dk önce EGCG ile 40dk inkübe ediliyor. Kontrolde $27.2 \pm 1.4\%$ olan infarkt alanı, iskemi-reperfüzyon sonrası 1 mM EGCG ile $14.5 \pm 2.5\%$ 'e, 10 mmol ile $4.0 \pm 1.7\%$ 'e düşüyor ($p < 0.05$) (15).

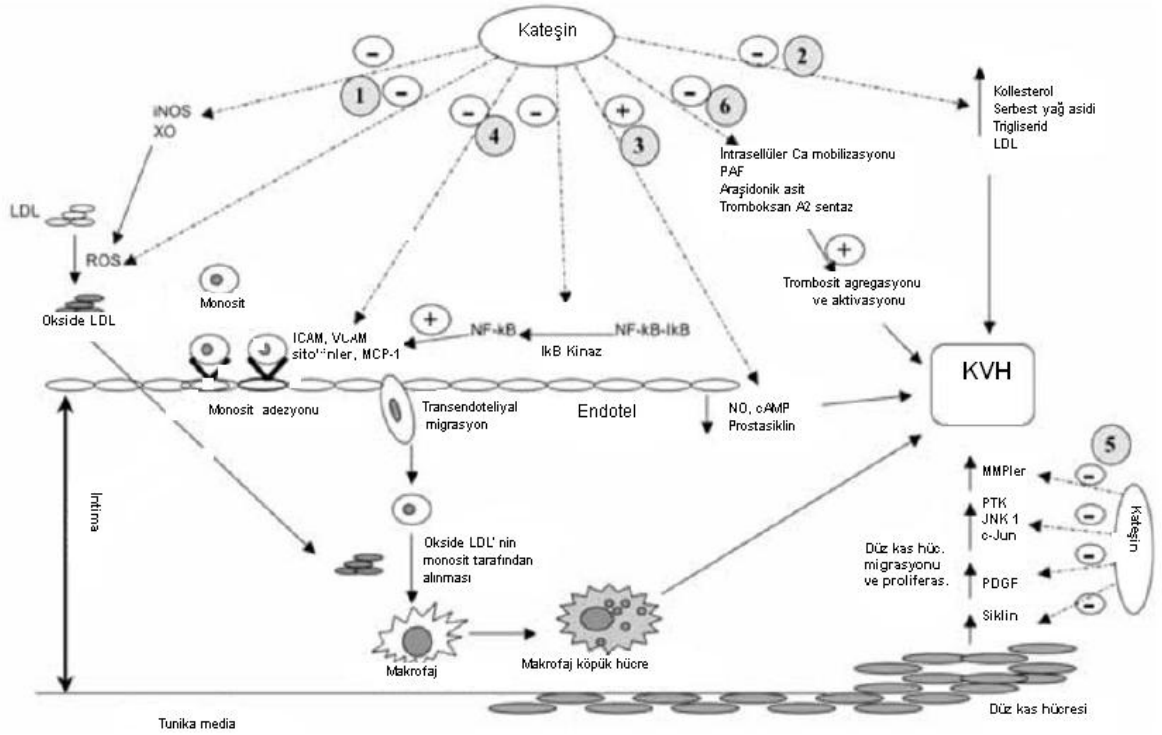
14 sağlıklı kadında 5hf kronik AR25 katekol denilen Camillia Sinensisin alkol ekstresi kullanımı sonrası lipid profilinde iyileşme, okside LDL düzeylerinde düşme görülmektedir (Tablo 3). Bu da aklımıza yeşil çayın aterosklerozdan da koruyucu olduğu fikrini getirmektedir (2).

Tablo 3: AR 25 katekol olarak adlandırılan yeşil çayın 5 hf kronik kullanımı sonrası lipid profili ve okside LDL düzeyleri (* p<0.05)(2)

	Plasebo	Tedavi
Total kolesterol (mg/dl)	176.7	168.3
HDL (mg/dl)	57.9	54.9
LDL (mg/dl)	104.5	101.7
TG (mg/dl)	71.9*	58.1*

Okside LDL (TBARS) (nmol MDA/mg LDL protein)	14.8*	9.2*
--	-------	------

Kateşinlerin topluca etkilerini şekil 4’ de görebiliriz.



Şekil 4: Kateşinlerin etkileri (16) (KVH: Kardiyovasküler hastalık)

2.4.Yeşil çayın lipid profiline etkisi

250 mg günlük 8hf boyunca yeşil çay kapsülü uygulanan 38 hiperkolesterolemik kişi üzerinde yapılan araştırmanın sonuçları tablo 4’de yer almaktadır.

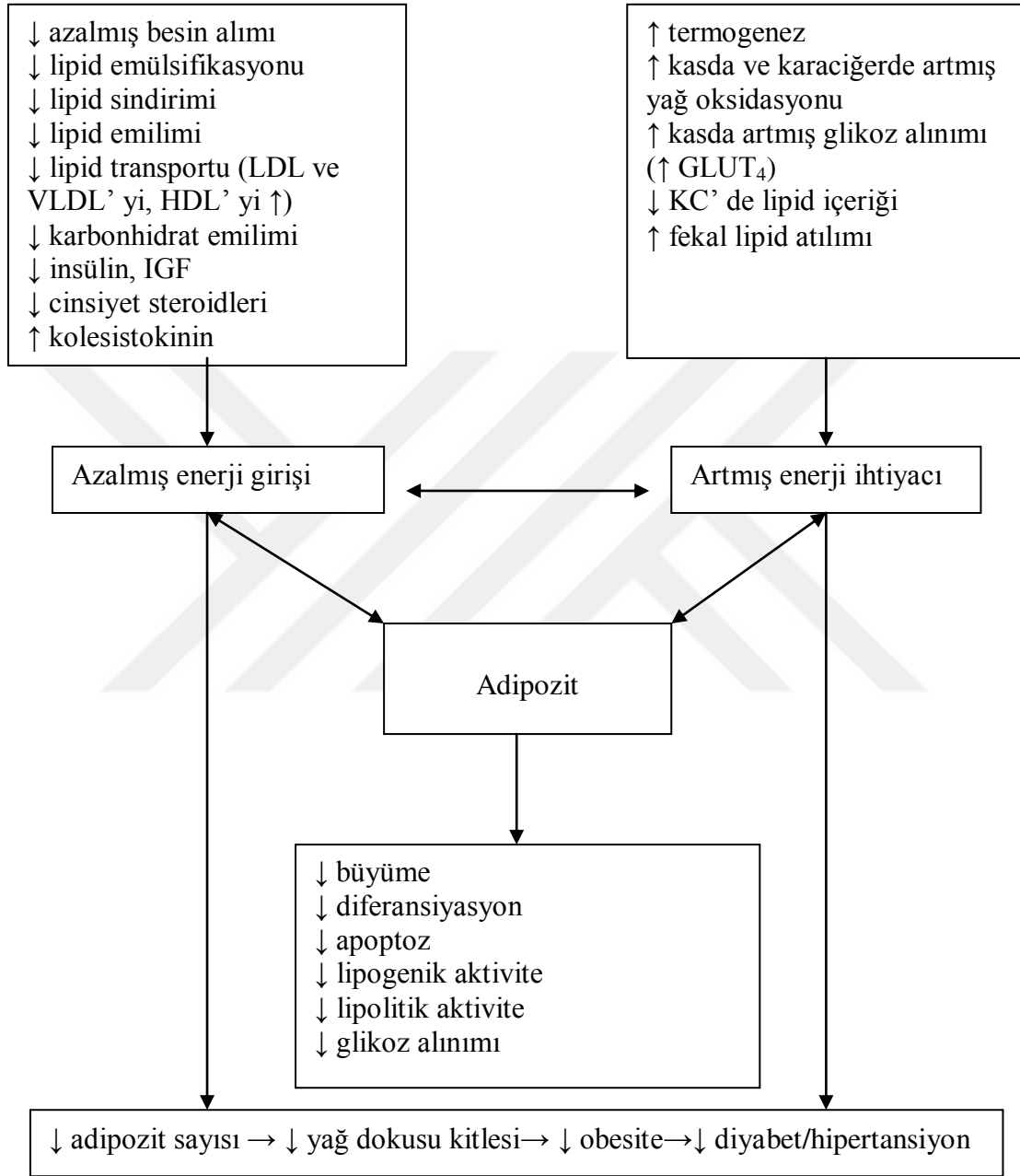
Tablo 4: Yeşil çayın lipid profiline etkisi (17)



Total kollersterol	Ortalama± SD	(Minumum- maksimum)	p
Çay öncesi	246.5 ± 35.5	(177.0 - 327.0)	0.006
Çay sonrası	235.3 ± 28.9	(181.0 - 299.0)	
LDL			
Çay öncesi	155.0 ± 31.4	(89.2 - 235.0)	0.026
Çay sonrası	145.7 ± 25.6	(90.0 - 190.2)	
HDL			
Çay öncesi	57.6 ± 14	(36.0 - 67.0)	0.218
Çay sonrası	56.1 ± 8.4	(40.0 - 77.0)	
TG			
Çay öncesi	165.8 ± 66.6	(84.0 - 342.0)	0.807
Çay sonrası	168.2 ± 61.4	(69.0 - 327.0)	
Apo B			
Çay öncesi	116.0 ± 23.2	(73.0 - 152.0)	0.180
Çay sonrası	119.7 ± 21.9	(81.3 - 159.0)	

2.5.Yeşil çay ve obezite

300 mg EGCG/gün alan (2 gün boyunca) 6 erkek obez hastada yapılan çalışmaya göre EGCG kiloyu azaltırken enerji tüketimini artırmaktadır (18).



Şekil 5: EGCG' nin obeziteye etkisi (18)

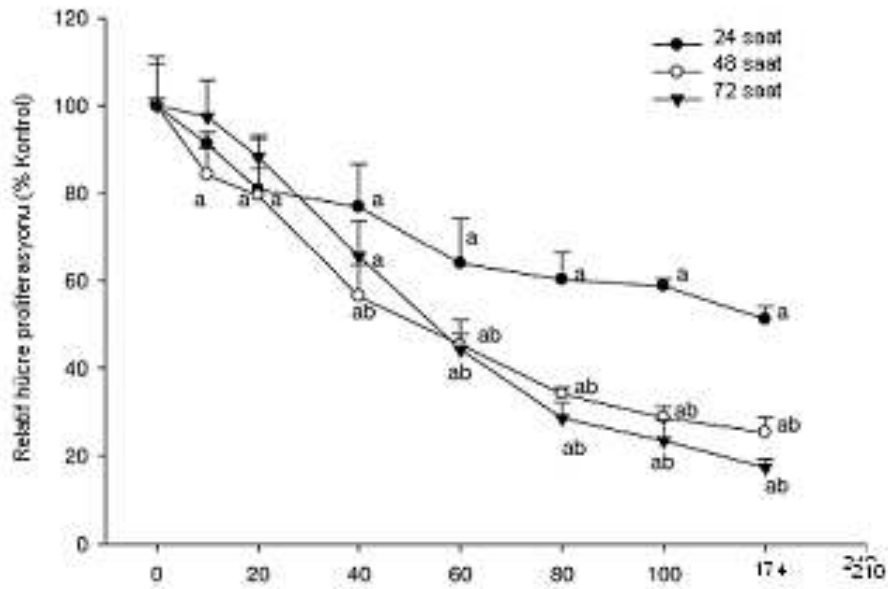
2.6.Yeşil çayın antioksidan etkisi

Yeşil çayın antioksidan etkisi kateşin gruplarından kaynaklanmaktadır. Ortamdaki O₂ tüketimine dayanan bir yöntemle yeşil çay bileşenlerinin antioksidan özellikleri sırasıyla EC, EGC, ECG, EGCG; 0.857, 0.566, 0.568, 0.459 bulunmuştur (19).

2.7.Yeşil çay hücre proliferasyonunu önlüyor

2.7.1. Prostat kanseri

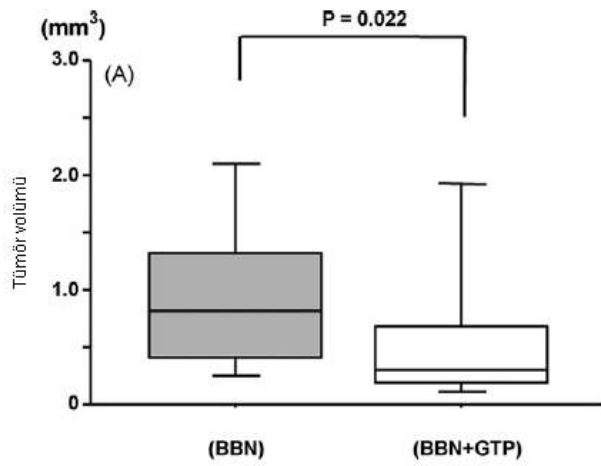
Yeşil çayın antikanserojen etkisiyle ilgili bir çok makale vardır. Yeşil çayın prostat adenokanser hücre hattında (LNCaP) hücre proliferasyonunu azaltıcı etkisi aşağıdaki şekilde görülmektedir.



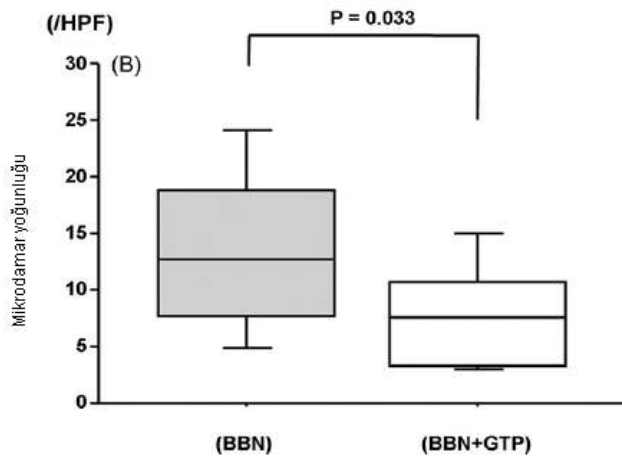
Şekil 6: EGCG' nin hücre proliferasyonu üzerine etkisi (20)

2.7.2. Mesane kanseri

N-bütül-N-4-hidroksibütül-nitrozamin (BBN)' in 24 hafta boyunca 0.05% konsantrasyonda uygulanması sonucu oluşturulan sıçan mesane kanser modelinde %0.5 ' lik yeşil çay uygulaması ile remisyon görülmüştür.



Şekil 7: Mesane tümör volümü, (BBN: N-bütıl-N-4-hidroksibütıl-nitrozamin, GTP: yeşıl çay polifenol) (21)



Şekil 8: Mikrodamar yoğunluğu “(HPF: high power field)”(21)

2.7.3. Meme kanseri

Heregulin-b 1 (HRG) ile indüklenen meme kanser hücre hattında EGCG, tümör migrasyonunu ve invazyonunu azaltmaktadır (22).

2.7.4. Kolon kanseri

Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF) kolon kanserlerinde tümör gelişimini indüklemektedir. Hıf-1 α ise VEGF' yi artırarak anjiogenezi indüklemektedir. 3 saat EGCG uygulaması Hıf-1 α ve VEGF düzeylerini düşürmektedir. 6 saat EGCG uygulamasıyla vasküler endoteliyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR-2), fosforile vasküler endoteliyal büyüme faktörü reseptörü (p-VEGFR-2), fosforile insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (p-IGF-1), p-ERK ve p-Akt protein düzeyleri düşmektedir (23).

2.7.5. Melanoma

Yaşlı sıçanlarda yeşil çay kullanımı yaşla azalan NK aktivitesini idame ettirerek melanoma hücrelerinin akciğer metastazını azaltmaktadır (24).

2.8. Koenzim Q10 güçlü antioksidan

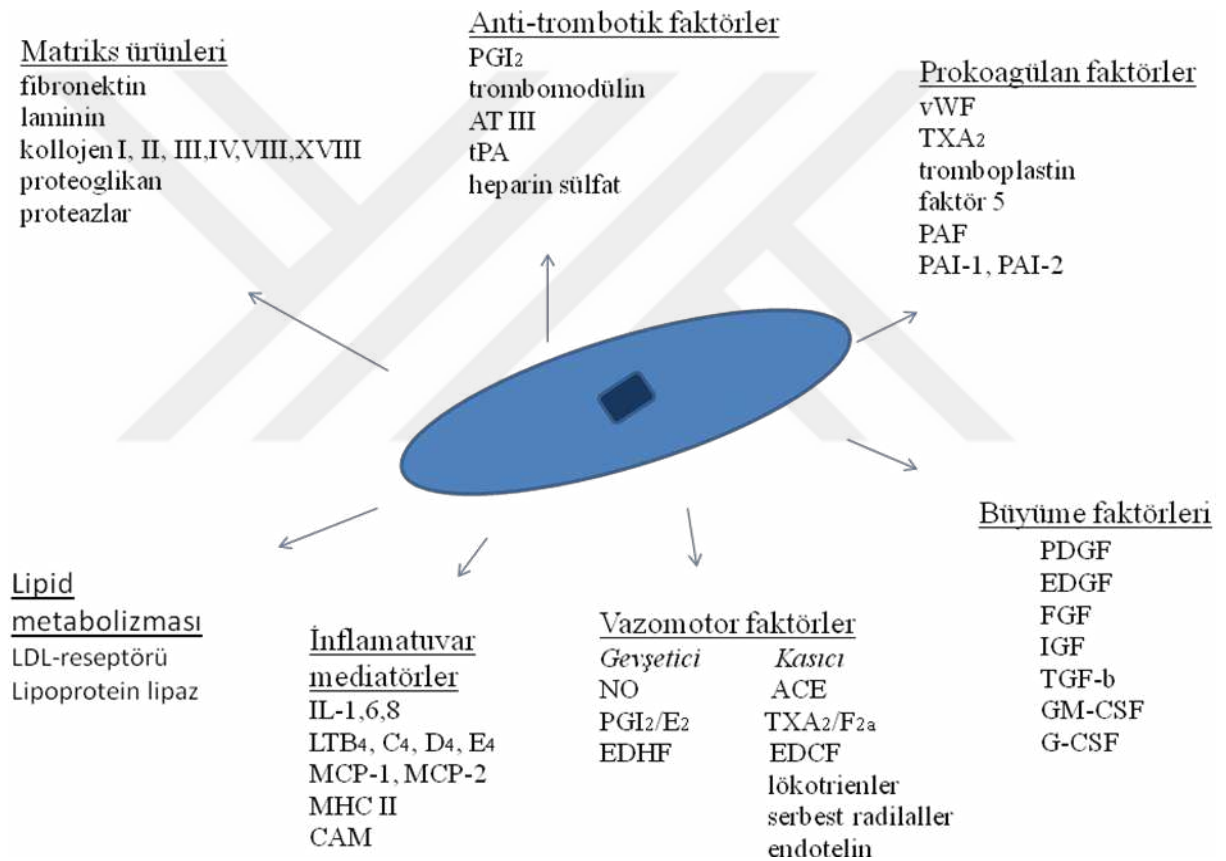
İç mitokondri membranında bulunup oksidatif fosforilasyon sırasında oluşan serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Nörodejenaratif hastalıklardan (Alzheimer, Parkinson, Hungtinton Koresi) koruma potansiyeline sahiptir (25). Ayrıca mitokondriyel miyopatilerde kullanımı vardır (26).

2.9. Endotel hücresi

Endotel hücreleri mezoderm orijinlidir. $(1-6) \times 10^{13}$ hücre yaklaşık 1 kg organa tekabül etmektedir (27). İnsan endotel hücreleri damarların, gastrointestinal sistem, genito-üriner sistem ve sekretuar glandların iç yüzünü döşerler. Bu hücrelerin gerek insan gerekse hayvanlardan alınıp kültüre edilerek çeşitli özelliklerinin deneylerde kullanılması mümkündür (28). Bu tezde İnsan Koroner Arter Endotel Hücreleri üzerine çalışılmıştır. Endotel tipine göre belli bazı uyarılara cevap vermektedir. Her endotelde bulunan yapısal elemanlar farklıdır. Bu gerek immunohistokimya çalışmalarıyla gerek RT-PCR veya akış sitometresi analizleriyle gösterilebilir (29,27) (Şekil 9).

Endotel hücrelerinden salgılanan çeşitli vazoaktif maddeler ile endotel hücreleri damarın kasılıp gevşemesine aracılık etmektedir. Damar gevşediğinde endotel hücreleri arasındaki permeabilite artarak gerekli maddeler dokuya geçerken ayrıca bir bariyer görevi görmektedir. Endotelde prokoagülan ve anti-koagülan maddeler salınarak kanın uygun akışkanlıkta damarı

tıkamadan dokulara taşınmasını sağlamaktadır ki bu en önemli görevlerinden biridir. Ayrıca inflamatuvar hücrelerin kaskad şeklinde aktivasyonunda görevli sitokinlerin salınması ve sitokinlerin sayılarının dengelenmesinde koloni stimüle edici faktörlerin salgılanması gene endotelden gerçekleşmektedir. Yüksek LDL düzeyleri aterom plakları oluştururken özellikle oksidasyona uğrayınca endotel altına geçerek köpük hücrelerini meydana getirip damar sertliğinin temel yapısını inşa ederken endotel savunma mekanizmaları önem arz etmektedir.



Şekil 9. Endotelde salgılanan ve eksprese edilen maddeler (27)

Bu çalışmada hipoksi reoksijenizasyon uygulanacağı için ve kalp hipoksiye en çok maruz kalan organ olduğu için kalbi besleyen damarlar olan koroner arter endoteli kullanılmıştır.

2.9. Hipoksi ve kalp

Hipoksi dokuya az oksijen gelmesi, iske mi ise az kan gelmesidir. O₂ hemoglobine baēlı olarak taşınır ve O₂ basıncının dūřuk olduēu periferik dokuda serbestleşir ve akciēerde tekrar baēlanır. Bu şekilde dōngüsünü tamamlar. İske mi anında ise dokuya kan ulařmadıēı iēin doku beslenme faktōrlerinden uzak kalır. Beslenme faktōrlerinden en ۆnemlisi oksidatif veya O₂ yokluēunda fermentasyon yoluyla dokuya Adenozin Trifosfat (AT) kazandırmak iēin yıkılan enerji kaynaēını oluşturan glikozdur. Tam veya kısmi damar tıkanıklıēında oēu zaman O₂ azlıēına dokunun beslenememesi eşlik eder. Kardiyovasküler hastalıklar ve inme ile yakından ilişkilidir. Hipoksik strese maruz kalan hūcreler adaptasyon gōstererek glikoliz ve anjiogenezi artırırlar. Adaptif cevaplar ile başarı saēlanamazsa hūcre ۆlümü olur (30). LDH hūcre ۆlümü olduēunun gōstergesi olarak ۆlū hūcrelerden ekstrasellūler alana salınır. Tekrar oksijenlenme gerēekleřirse oksijenden serbest radikaller (ROS) oluşur. Serbest radikaller çiftleşmemiş ē iēerdikleri iēin diēer dokulara saldırarak ē ‘larını eşlemeye çalışırlar. Bu da doku hasarını artırır. Kısmi ve tekrarlayan tıkanmalarda ROS’un başlıbaşına hūcre nekrozu yaptıēı tezimizde gōsterilmiřtir (şekil 28).

3. Gereç ve yöntem

1.1 Gereç

HCAEC hücreleri Cambrex ve Promocell' den tedarik edildi. Otomatik pipetler Thermo, tek kullanımlık pipetler (2-5-10-20ml'lik) Greiner markasına sahipdi. HCAEC ortamı olarak Cambrex endotel büyüme ortamı (EGM-2) her 2 hücre için kullanıldı. Tripsin, tripsin nötralize edici solüsyon (TNS), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit tamponu (HEPES); Cambrex kullanıldı. PBS; biological industries) kullanıldı. Hipoksi oluşturmak için %95 N₂, %5 CO₂ ile havalandırılan hipoksi kabini kullanıldı. ROS ölçümü için invitrogen marka hidroksi fenil fluoresan (HPF) probuyla fluorometrik ölçüm yapıldı. LDH ölçümü için spektrofotometrik analize uygun roche sitotoksite saptama kiti kullanıldı. Hücre kültürü için HERA Safe, Heraeus kabinet içinde çalışmalar yapıldı, REVCO marka CO₂ inkübatörü normal hücrelerin idame ortamı olarak 37°C ve %5CO₂ içinde bekletildi, Nikon ECLİPSE TS100 inverted mikroskop kullanılarak hücreler gözlemlendi ve ona bağlanan Nikon marka kamerada görüntü alındı, Rotofix 32 Hettich ve Sigma 2K15C marka santrifüjler sırasıyla 15mL' lik tüp ve ependorf için kullanıldı, VELP Scientifica marka vorteks ve ELGA MAXIMA/USF/PRIMA marka saf su sistemi su tedariki için kullanıldı. ROS ve LDH okumaları BioTek Synergy HT Marka Eliza Plak Okuyucu' da yapıldı.



Şekil 10: Hipoksik kabin

4.2. Yöntem

- HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cell) hücrelerinde farklı sürelerde hipoksi+iskemi (PBS= phosphate buffered saline) ile)-reoksijenizasyon+reperfüzyon (ortam EGM-2) uygulanarak ROS çalışıldı.
- HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cell) hücrelerinde farklı sürelerde hipoksi (EGM-2)+reoksijenizasyon (EGM-2), hipoksi (azaltılmış serum içerikli ortam optimem) +reoksijenizasyon (optimem) ve hipoksi-iskemi (PBS)-reoksijenizasyon +kısmi reperfüzyon (optimem) uygulanarak LDH çalışıldı.
- EGM-2; %5 serum içerdiğinden tam perfüzyon, optimem ise <%5 serum içerdiğinden kısmi reperfüzyon olarak değerlendirildi.
- EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un oluşturulan bu hasar modellerinde koruyuculuklarının olup olmadığı farklı inkübasyon süreleriyle ve farklı dozlarda değerlendirildi.
- Ve hangi hasar tipinden, hangi doz ve hangi sürede koruyup korumadığı sorusuna yanıt arandı?
- ROS ve LDH sonuçları 96 kuyulu plak okuyucuda (fluorometrik (490 ex-528 em) ve spektrofotometrik (492 nm) olarak değerlendirildi.

4.2.1. Hücre kültürü

- Deneyler alttaki prosedürlere göre yapıldı.



Şekil 11: HCAEC hücrelerinin mikroskopda görüntüsü (20x)

Tez çalışmamızda 6 veya 7. pasaj kullanıldı. Biz hücrelerimizi 3. pasajda satın almıştık ve hücrelerinin en fazla 8 pasaja kadar ilerlediği görüldü. Dolayısıyla 3. pasajı ortalama 3. dekad 5-6. pasajı miyokard enfaktüsünün en fazla yaşandığı 5-6. dekad olarak düşünebiliriz.

4.2.1.1. Ortam hazırlanması

- Kabinet ve pipetler % 70' lik alkolle silinerek hazır hale getirildi
- Ortam sıvısı ve yanında birlikte gelen büyüme faktörleri, serum ve antibiyotikler % 70' lik alkolde temizlendi.
- Büyüme faktörleri, serum ve antibiyotiklerin kapakları dikkatlice açılarak 500 ml sıvısı içine kondu.
- 25 ml serum 500 ml ortam içine konunca hücreler %5'lik serumda idame ettirilmiş oldu.
- Kapağı kapatılıp dikkatlice çalkalanarak, 50 ml'lik falcon tüplere dağıtıldı.
- Ağızları her işlemde parafilmle kapatılarak +4°' lik buzdolabında saklandı.

4.2.1.2. Hücrenin çözülmesi

- Su banyosu 37°'ye getirilerek önceden hazırlandı.
- +4°' lik buzdolabında saklanan 5 ml hazır EGM-2 ortamı 37°' lik fırında tutularak (30 dk) ısısının 37°' ye gelmesi sağlandı.
- Kabinet ve pipetler % 70' lik alkolle silinerek hazır hale getirildi.
- Nitrojen sıvı azot tankında saklanan hücre tanktan çıkarılarak hızlı bir şekilde su banyosunda tutularak en kısa sürede (2-3 dk) çözünmesi sağlandı.
- Toplam hacmi 5 ml'ye tamamlanacak şekilde yavaşça pipetle EGM-2 ortamı içinde dağıtıldı.
- Hücreli ortam 25 cm² 'lik flaska konarak 37°' lik % 5 CO₂ 'ile havalandırılan CO₂ inkübatörüne kondu.

4.2.1.3. Hücrenin beslenmesi

- Kabinet ve pipetler % 70' lik alkolle silinerek hazır hale getirildi.
- +4°' lik buzdolabında saklanan 5 ml hazır EGM-2 ortamı 37°' lik fırında tutularak (30 dk) ısısının 37°' ye gelmesi sağlandı.
- 25cm²'lik flask CO₂ inkübatöründen çıkarıldı. Hücreler flaskın tabanına yapışmıştı. Mikroskopda gözlemlendi.
- 5 ml eski ortam çekilerek yerine yeni ortam pipetlendi.

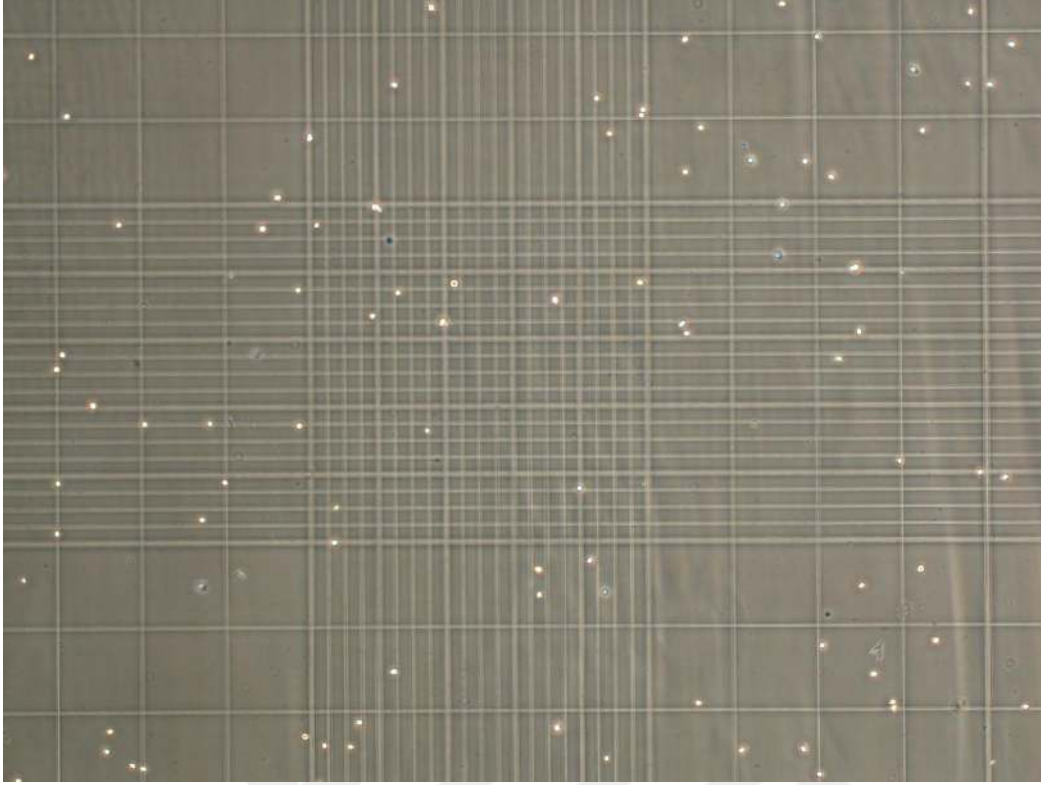
4.2.1.4. Hücrenin pasajlanması

- Yaklaşık %80 oranında flaskı kaplayınca pasajlama kararı alındı.
- Kabinet ve pipetler % 70' lik alkolle silinerek hazır hale getirildi.
- +4°' lik buzdolabında saklanan 10 ml hazır EGM-2 ortamı, tripsin, tripsini nötralize edici solüsyon (TNP), PBS 37°' lik fırında tutularak (30 dk) ısısının 37°' ye gelmesi sağlandı.
- 25cm²'lik flask CO₂ inkübatöründen çıkarıldı. Hücreler flaskın tabanına yapışmıştı. Mikroskopda gözlemlendi.
- 5 ml eski ortam çekilerek atıldı.

- 2ml PBS ile yıkandı.
- Flaska 2 ml tripsin konu.
- Flask 2 dk sonra elle vurularak hücrelerin tabandan ayrılması sağlandı.
- Mikroskopda hücrelerin ayrıldığı gözlemlendi.
- 4 ml TNP konu.
- Karıştırılarak 15 ml'lik falkon tüpe alındı. 2 ml PBS ile flaska yapışık hücre kalmasını diye flaskın dibi yıkayıp bu da falcon tüpe konu.
- 1000 g'de 7dk çevrilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlandı.
- 200 µL bırakılarak gerisi çekilip atıldı.
- EGM-2 ile 2 ml'ye tamamlanarak, hücreler 2 ml yeni EGM-2 içinde dağılsın diye pipetaj yapıldı.
- 50 µL'si çekilerek tripan boyama için ayrıldı.
- 2ml 'nin yaklaşık 1 ml'si 5ml'ye tamamlanarak bir flaska, diğer 1 ml de 5ml'ye tamamlanarak diğer flaska konu. Hücreler dağılsın diye pipetaj yapıldı.
- Eskiden 1 flaskda bulunan hücreler 2 flaska alınmış oldu.

4.2.1.5. Tripan Mavi boyama

- 50 µL'si çekilerek tripan boyama için ayrılmıştı.
- 50 ml PBS katılarak ½ sulandırıldı.
- 100 µL tripan blue boyası konu.
- 6dk beklendi.
- Thoma lamına lamel kapatıldı.
- 200 µL'den 10 µL'si çekilerek lam ile lamelin arasına bırakıldı.
- 1 büyük karedeki hücreler sayıldı: 12 hücre
- Hücre sayısı= $12 \times 2 \times 2 \times 10^4 = 480.000$ hücre varmış bu flaskın tamamında
- Hücre sayısı= Bir büyük karedeki hücre sayısı*dilüsyon*toplam kaç ml hücre var* 10^4
- Şekil 11'de bir büyük karede 2 ölü (mavi boyalı), 12 canlı HCAEC hücresi görülmektedir.



Şekil 12: HCAEC hücrelerinin tripan blue boyasıyla boyanmış thoma lamındaki görüntüsü (10x)

4.2.1.6. 96 kuyulu plağa ekim

- Her kuyuya ROS deneyleri için 10000, LDH deneyleri için 8000 hücre ekildi. ROS deneyleri için floresan plak, LDH deneyleri için normal plak kullanıldı.
- Yukarıdaki flaskla deney yapacağımızı düşünelim. 2 ml’de 480.000 hücre varsa, diyelim ki 16 kuyu ekeceğiz. 160.000 hücre lazım. 2 ml’de 480.000 hücre varsa, 160.000 hücre kaç ml’ de var? 0.66 ml’de var. Her bir kuyuya 200 μ L eksek, 16 kuyuya 3200 μ L eder. O zaman 0.66 ml ‘lik hücre karışımını 3.2 ml’ye taze ortamla tamamlayıp, 200 μ L olarak 16 kuyuya dağıtacağız.

4.2.2. Fluorometrik yöntemle ROS ölçümü (27)

- 10.000 hücre/kuyu 96 kuyulu plağa ekim yapılmıştır.
- Hücrelerin adhere olması için 24 saat beklenmiştir.
- Deney protokolü uygulanmıştır.
- 200 μ L PBS ile hücrelerin dibe yapıştığı kuyular yıkanmıştır.
- Daha sonra PBS (fosfat tamponlu tuz) içinde hazırlanmış 10 μ M hidroksi fenil floresan (HPF) probu ile 30 dk inkübe edilerek, fazla HPF’ nin uzaklaştırılması için

tekrar kuyular 200 µL PBS ile yıkandıktan sonra, 200 µL PBS kuyulara eklenerek okuma yapılmıştır.

- Prob Invitrogen marka 5mM HPF stok solüsyon olarak tedarik edilmiştir. Invitrogen bilgi notunda 1-10 µM HPF ile 5-60 dk inkübe edilerek çalışılması ve oluşan fluoresansın 492–495/517–527nm eksitasyon ve emisyon dalga boyunda okunması vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda 1000, 5000 ve 10.000 hücre ile ve HPF konsantrasyonu 1-5-10 µM olarak deneyler yapılmıştır (Tablo 24). Sonuç olarak 10 µM ve 30 dk inkübasyon süresi sonunda okuma yapılmıştır.

4.2.3. Spektrofotometrik yöntemle LDH ölçümü (28)

- 10.000 hücre/kuyu 96 kuyulu plağa ekim yapılmıştır.
- Hücrelerin adhere olması için 24 saat beklenmiştir.
- Deney protokolü uygulanmıştır.
- ROCHE' un bilgi notuna göre solüsyonlar hazırlanarak çalışılmıştır. EGCG, P60 ve Koenzim Q10 'un ayrı konsantrasyonları için, uygun konsantrasyondaki solüsyonlar da eklenerek ayrı ayrı körler yapılmıştır.
- Catalyst (Diaphorase/NAD⁺ karışımı) (Şişe 1)
- Dye Solution (INT and sodyum laktat karışımı) (Şişe 2)
- 100 test için 250 µL şişe 1 ile 11.25 mL şişe 2 karışımı hazırlanmıştır. Şişe 1; liyofilize olup 1 mL distile su içinde çözündürülüp kullanılırken, şişe 2 kullanıma hazırdır.
- Hücre içermeyen supernatant substrat (Catalyst ve Dye Solution) karışımı ile 30dk inkübe edilerek 500nm' de absorbanslar okunmuştur. LDH aktivitesi eşleşmiş enzimatik reaksiyon ile ölçülmüştür. Bu reaksiyon sırasında Tetrazolium tuzunun INT formazana dönüşümü ve formazan boyasıyla absorbansın saptanması şeklinde ilerlemiştir.

3.2.4 İstatistik analiz

İstatistik analiz için SPSS-15 paket programı kullanılmıştır. Ölçüm sayıları non-parametriğe uyduğu için ikili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. P=0.05' den küçük değerler istatistik açıdan anlamlı kabul edilerek yıldız * işareti ve kırmızı ile gösterilmiştir.

5 Bulgular

5.1. Reaktif oksijen radikali (ROS)

1.deney seti

% Kontrol değerleri fluoressan intensite üzerinden hesaplanmıştır. Kontrol değerleri esas kabul edilerek bir nevi 100' lik sistemde veriler değerlendirilmiştir. Her deney seti için bu yüzlük sistem yeniden oluşturulmuştur. Çünkü son 2 deneyi cihaz okumayınca high well 60000' e ayarlanmıştır. Oysa ilk 3 deneyde high well değerleri farklıdır. Aynı deney setinde high well aynıdır. Bu yüzden her deney seti kendi içinde değerlendirilmelidir.

(EGCG) 50 μ M=22.9 μ g/ml

100 μ M= 45.8 μ g/ml

200 μ M= 91,6 μ g/ml

500 μ M= 229 μ g/ml

2000 μ M= 916 μ g/ml

Amaç (1. deney seti): Bu deneyde amacımız farklı hipoksi-reoksijenizasyon süreleri deneyerek, bazal düzeye kıyasla ROS artışına neden olan süreyi bulmaktır. Ayrıca EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10 'un ROS düzeyine etkisini incelemektir.

Tablo 5a: Normoksik plak (33 saat)

24 saat adezyon-2 saat enkübasyon-6 saat hipoksi-1 saat reoksijenizasyon süresi boyunca normoksi	
Fluoresan intensite	11092
% Kontrol $\pm$ SE	89.12 1s
	12852 104.01
	13125 106.22
	12356* 100.00* $\pm$ 5,36
* Mean olup 3 değerin ortalamasıdır.	

Tablo 5b: (24 saat adezyon- 2 saat enkübasyon- 6 saat hipoksi- 1 saat reoksijenizasyon) uygulaması

24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon (EGM-2+maddeler)-6 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)									
	Madde (-)	EGCG			Polifenon 60			Koenzim Q10	
	(-)	50µM	100 µM	200 µM	31.25 µg/ml	62.5 µg/ml	125 µg/ml	10 µM	50 µM
	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A	10A
İntensite	14572	16261	15788	16027	12474	10368	12067	10169	10239
% Kontrol	117.93	131.60	127.77	129.71	100.95	83.91	97.66	82.30	82.86
	10667	13457	13693	12671	11374	11138	12572	10965	12845
	86.33	108.91	110.82	102.54	92.05	90.14	101.74	88.74	103.95
	14031	12112	12569	11300	9668	11729	10368	12511	9577
	113.55	98.02	101.72	91.45	78.24	94.92	83.91	101.25	77.50
	12144	12764	9606	10658	8971	11177	9943	8606	9459
	98.28	103.30	77.74	86.25	72.60	90.45	80.47	69.65	76.55
	12853*	13648*	12914*	12664*	10651*	11103*	11237*	10562*	10530*
	104.02*	110.45*	104.51*	102.49*	85.96*	89.85*	90.94*	85.48*	85.22*
	± 7.24	± 7.38	± 10.42	± 9.68	± 6.45	± 2.26	± 5.17	± 6.58	± 6.39
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE									

Tablo 5c: Normoksik plak (36 saat)

24 saat adezyon-2 saat enkübasyon-6 saat hipoksi-4 saat reoksijenizasyon süresi boyunca normoksi	
Fluoresan intensite	11852
% Kontrol	95.92 1B
	12899
	104.39
	11873
	96.09
	12208*
	98.80* ± 1.97
* Mean olup 3 değerin ortalamasıdır ± SE	

Tablo 5d: (24 saat adezyon- 2 saat enkübasyon- 6 saat hipoksi- 4 saat reoksijenizasyon) uygulaması

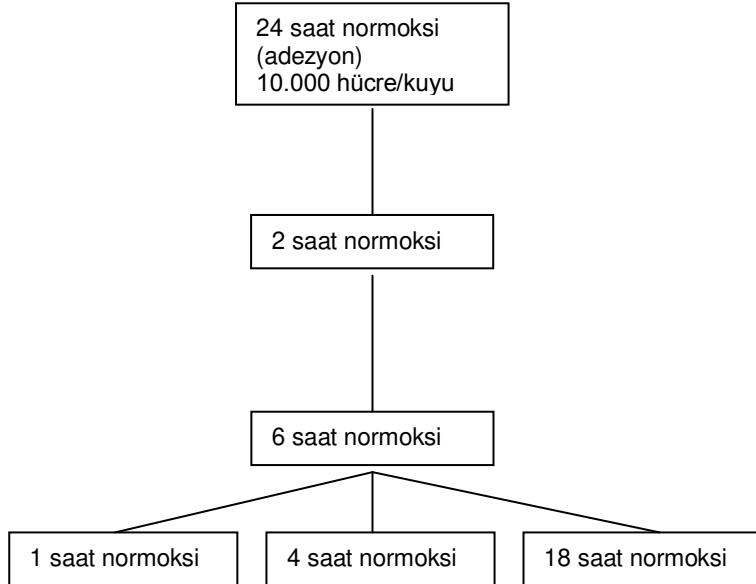
24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon (EGM-2+maddeler)-6 saat hipoksi (PBS)-4 saat reoksijenizasyon (EGM-2)										
	Madde (-)	EGCG			Polifenon 60			Koenzim Q10		Boş plak
	(-)	50µM	100 µM	200 µM	31.25 µg/ml	62.5 µg/ml	125 µg/ml	10 µM	50 µM	
	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	
İntensite	12338	16149	16752	16132	15303	15014	15001	14877	14394	12317
% Kontrol	99.85	130.69	135.57	130.56	123.85	121.51	121.40	120.40	116.49	99.68
	14954	13044	14575	15063	12447	13885	17385	12662	14631	7009
	121.02	105.56	117.95	121.90	100.73	112.37	140.70	102.47	118.41	56.72
	9528	5303 (-)	11850	12067	11732	13911	13052	11812	10303	13921
	77.11	42.91	95.90	97.66	94.94	112.58	105.63	95.59	83.38	112.65
	14419	14534	12483	14324	12450	11751	14850	9303	12765	8295
	116.69	117.62	101.02	115.92	100.76	95.10	120.18	75.29	103.31	67.13
	12809*	14575*	13915*	14396*	12983*	13647*	15072*	12163*	13023*	10385*
	103.66*	117.95*	112.61*	116.51*	105.07*	110.44*	121.98*	98.43*	105.39*	84.04*
	± 5.07	± 19.45	± 8.98	± 6.96	± 6.4	± 5.52	± 7.19	± 9.32	± 8.06	
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE										

Tablo 5e: Normoksik plak (50 saat)

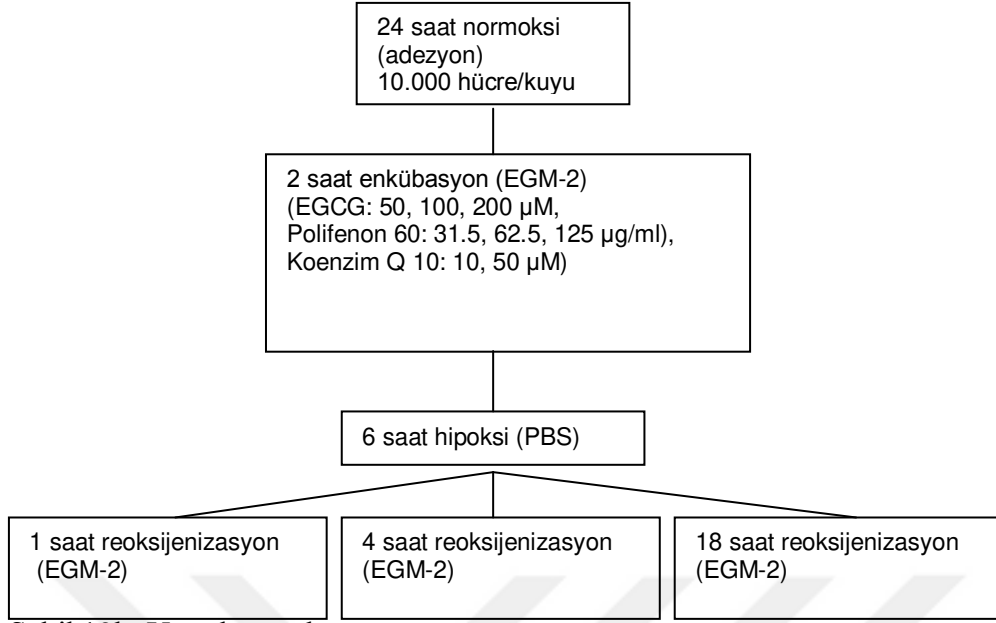
24 saat adezyon-2 saat enkübasyon-6 saat hipoksi-18 saat reoksijenizasyon süresi boyunca normoksi	
Fluoresan intensite	13204
% Kontrol	106.86 1C
	11112
	89.93
	13316
	107.77
	12544*
	101.52* ± 4.1
* Mean olup 3 değerin ortalamasıdır ± SE	

Tablo 5f: (24 saat adezyon- 2 saat enkübasyon- 6 saat hipoksi- 18 saat reoksijenizasyon) uygulaması

24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon (EGM-2+maddeler)-6 saat hipoksi (PBS)-18 saat reoksijenizasyon (EGM-2)										
	Madde (-)	EGCG			Polifenon 60			Koenzim Q10		Boş plak
	(-)	50µM	100 µM	200 µM	31.25 µg/ml	62.5 µg/ml	125 µg/ml	10 µM	50 µM	
	2C	3C	4C	5C	6C	7C	8C	9C	10C	
İntensite	10627	17565	13282	20334	15139	16082	18623	17570	16544	13395
% Kontrol	86.00	142.15	107.49	164.56	122.52	130.15	150.72	142.19	133.89	108.40
	12671	11748	13511	18357	16155	14387	12355	13175	14115	12633
	102.54	95.07	109.34	148.56	130.74	116.43	99.99	106.62	114.23	102.23
	11649	14539	11141	15719	15668	12767	14647	13880	12092	9942
	94.27	117.66	90.16	127.21	126.80	103.32	118.54	112.33	97.86	80.46
	14045	12521	13317	13938	13030	15420	12947	15616	12597	8739
	113.66	101.33	107.77	112.80	105.45	124.79	104.78	126.38	101.95	70.72
	12248*	14093*	12812*	17087*	14998*	14664*	14643*	15060*	13837*	11177*
	99.12*	114.05*	103.69*	138.28*	121.38*	118.67*	118.50*	121.88*	111.98*	90.45*
	± 5.9	± 10.5	± 4.52	± 11.43	± 5.56	± 5.84	± 11.43	± 7.94	± 8.08	
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE										



Şekil 13a: Normoksik plak



Şekil 13b: Uygulama plağı

Tablo 6: 1. Deney seti grup numaralarının isimleri

1A: [24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon (EGM-2)-6 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)] süresi boyunca normoksi
2A: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (-)]-6 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
3A: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (50µM EGCG)]-6 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
4A: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (100µM EGCG)]-6 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
5A: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (200µM EGCG)]-6 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
6A: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (31.25 µg/ml Polifenon 60)]-6 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
7A: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (62.5 µg/ml Polifenon 60)]-6 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
8A: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (125 µg/ml Polifenon 60)]-6 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
9A: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (10 µM Koenzim Q10)]-6 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
10A: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (50 µM Koenzim Q10)]-6 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
1B: [24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon (EGM-2)-6 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)] süresi boyunca normoksi
2B: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (-)]-6 saat hipoksi (PBS)-4 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
3B: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (50µM EGCG)]-6 saat hipoksi (PBS)-4 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
4B: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (100µM EGCG)]-6 saat hipoksi (PBS)-4 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
5B: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (200µM EGCG)]-6 saat hipoksi (PBS)-4 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
6B: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (31.25 µg/ml Polifenon 60)]-6 saat hipoksi (PBS)-4 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

7B: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (62.5 µg/ml Polifenon 60)]-6 saat hipoksi (PBS)-4 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

8B: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (125 µg/ml Polifenon 60)]-6 saat hipoksi (PBS)-4 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

9B: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (10 µM Koenzim Q10)]-6 saat hipoksi (PBS)-4 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

10B: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (50 µM Koenzim Q10)]-6 saat hipoksi (PBS)-4 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

1C: [24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon (EGM-2)-6 saat hipoksi (PBS)-18 saat reoksijenizasyon (EGM-2)] süresi boyunca normoksi

2C: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (-)]-6 saat hipoksi (PBS)-18 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

3C: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (50µM EGCG)]-6 saat hipoksi (PBS)-18 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

4C: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (100µM EGCG)]-6 saat hipoksi (PBS)-18 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

5C: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (200µM EGCG)]-6 saat hipoksi (PBS)-18 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

6C: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (31.25 µg/ml Polifenon 60)]-6 saat hipoksi (PBS)-1 8saat reoksijenizasyon (EGM-2)

7C: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (62.5 µg/ml Polifenon 60)]-6 saat hipoksi (PBS)-18 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

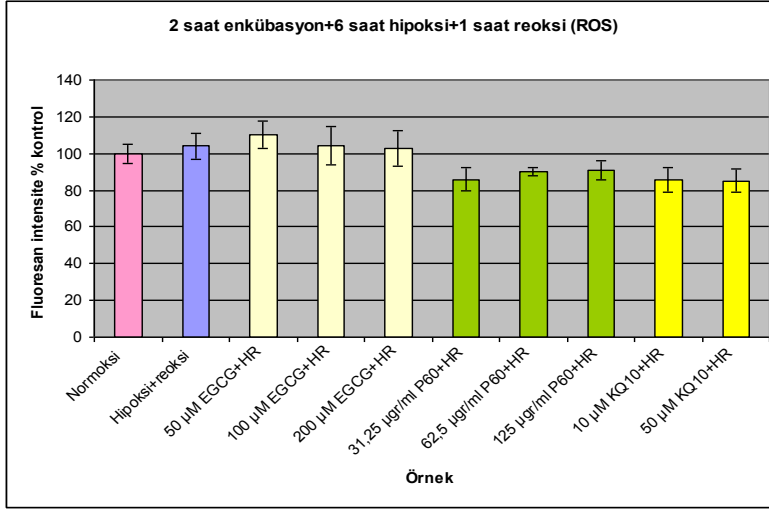
8C: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (125 µg/ml Polifenon 60)]-6 saat hipoksi (PBS)-18 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

9C: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (10 µM Koenzim Q10)]-6 saat hipoksi (PBS)-18 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

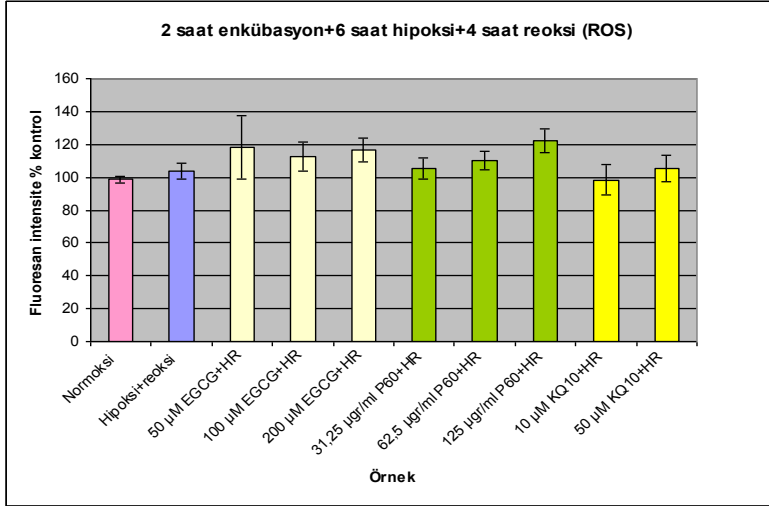
10C: 24 saat adezyon (EGM-2)-2 saat enkübasyon [EGM-2+madde (50 µM Koenzim Q10)]-6 saat hipoksi (PBS)-18 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

Tablo 7: 1. deney seti verilerinin istatistik karşılaştırmaları (Grup numaraları 1. deney seti tablosu içinde kırmızı ile yazılmıştır.) (p değeri)

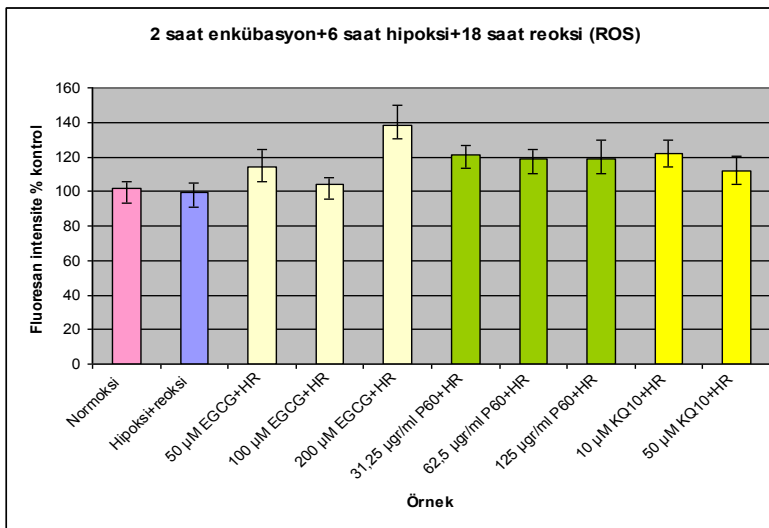
1A-2A=0.857 (p)	<u>Dozlar arası</u>	<u>Süreye göre (EGCG)</u>
2A-3A=0.88	3A-4A=0.88	3A-3B=0.34
2A-4A=1	3A-5A=0.34	3A-3C=1
2A-5A=0.88	4A-5A=1	3B-3C=0.68
2A-6A=0.20	6A-7A=0.88	5A-5B=0.34
2A-7A=0.20	7A-8A=0.88	5A-5C=0.11
2A-8A=0.20	9A-10A=1	5B-5C=0.34
2A-9A=0.20		4A-4B=0.88
2A-10A=0.114		4A-4C=0.88
		4B-4C=0.68
1B-2B=0.629	<u>Dozlar arası</u>	<u>Süreye göre (P60)</u>
2B-3B=0.20	3B-4B=0.22	6A-6B=0.20
2B-4B=1	3B-5B=0.48	6A-6C=0.029
2B-5B=0.48	4B-5B=0.40	6B-6C=0.11
2B-6B=0.88	6B-7B=0.68	7A-7B=0.029
2B-7B=0.88	6B-8B=0.20	7A-7C=0.029
2B-8B=0.20	7B-8B=0.48	7B-7C=0.34
2B-9B=0.68	9B-10B=0.68	8A-8B=0.029
2B-10B=1		8A-8C=0.05/0.043
		8B-8C=0.48
1C-2C=0.85		
2C-3C=0.34	<u>Dozlar arası</u>	<u>Süreye göre (KoQ10)</u>
2C-4C=0.68	3C-4C=0.68	9A-9B=0.34
2C-5C=0.057	3C-5C=0.20	9A-9C=0.029
2C-6C=0.057	4C-5C=0.029	9B-9C=0.11
2C-7C=0.057	6C-7C=0.68	10A-10B=0.11
2C-8C=0.20	7C-8C=0.88	10A-10C=0.11
2C-9C=0.11	9C-10C=0.48	10B-10C=1
2C-10C=0.34		



Şekil 14a: ROS düzeyi



Şekil 14b: ROS düzeyi



Şekil 14c: ROS düzeyi

- 6 saat hipoksi/1-4-18 saat reoksijenizasyon; kontrol gruplarına göre ROS düzeylerinde yeterli artışa neden olmadı ($p=0.850, 0.620, 0.850$).
- 200 μM EGCG ile inkübasyon 100 μM EGCG ile inkübasyona göre daha yüksek ROS düzeylerine neden olmuştur ($p=0.029$).
- 31.25 $\mu\text{g/ml}$ Polifenon 60 dozunda 18 saat reoksijenizasyon 1 saat reoksijenizasyona göre daha yüksek ROS düzeylerine neden olmuştur ($p=0.029$).
- 62.50 $\mu\text{g/ml}$ Polifenon 60 dozunda 4 ve 18 saat reoksijenizasyon 1 saat reoksijenizasyona göre yüksek ROS düzeylerine neden olmuştur. ($p=0.029, p=0.029$).
- 125 $\mu\text{g/ml}$ Polifenon 60 dozunda 4 ve 18 saat reoksijenizasyon 1 saat reoksijenizasyona göre yüksek ROS düzeylerine neden olmuştur ($p=0.029, p=0.050$).
- 10 μM Koenzim Q10 dozunda 18 saat reoksijenizasyon 1 saat reoksijenizasyona göre daha yüksek ROS düzeylerine neden olmuştur ($p=0.029$).
- Sonuç olarak; reoksijenizasyon süresinin uzatılması ROS düzeyi artışı ile paraleldir.
- Reoksijenizasyon süresi 1 saat olduğunda: Polifenon 60 (31.5, 62.5, 125 $\mu\text{g/ml}$), ve Koenzim Q10 (10, 50 μM) inkübasyonu; madde uygulanmayan kontrol grubuna göre ROS düzeylerini düşürmüştür, ancak istatistiksel anlamlı olacak kadar etki etmemiştir ($p= 0.20,0.20,0.20,0.20,0.114$)
- Reoksijenizasyon süresi 4 saat olduğunda: 50 μM EGCG; madde uygulanmayan kontrol grubuna göre ROS düzeylerini artırmıştır, ancak istatistiksel anlamlı olacak kadar etki etmemiştir ($p=0.20$)
- Reoksijenizasyon süresi 18 saat olduğunda: 200 μM EGCG; madde uygulanmayan kontrol grubuna göre ROS düzeylerini artırmıştır, ancak istatistiksel anlamlı olacak kadar etki etmemiştir ($p=0.057$). Polifenon 60 (31.5, 62.5, 125 $\mu\text{g/ml}$) inkübasyonu; madde uygulanmayan kontrol grubuna göre ROS düzeylerini artırmıştır, ancak istatistiksel anlamlı olacak kadar etki etmemiştir ($p=0.057, 0.057, 0.20$). 18 saat reoksijenizasyon grubunda 5 μM Koenzim Q10; kontrol grubuna göre ROS düzeylerini artırmıştır, ancak istatistiksel anlamlı olacak kadar etki etmemiştir ($p=0.11$).
- Sonuç olarak enkübasyondan 3 saat sonra (2 saati enkübasyon) Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un ROS azaltıcı etkisi belirginken, 20 saat sonra (2 saati enkübasyon) ROS artırıcı etkileri ortaya çıkmıştır. Bu da muhtemelen ortamdaki yeşil çayın zamanla otooksidasyonu ile açıklanabilir. Ayrıca EGCG' nin otooksidasyonu daha erken başlarken, Polifenon 60' ın otooksidasyonu daha geç başlayıp daha uzun

sürmektedir. Koenzim Q10'un ROS düşürücü etkisi Polifenon 60'dan daha fazladır, bu reoksijenizasyonun 1. saatinde belirgin olarak görülmektedir.

2. deney seti

Amaç (2. deney seti): Bazal düzeye göre yani kontrol grubuna göre ROS artışına neden olan hipoksi-reoksijenizasyon süresinin bulunması 2. deney setinin amacıdır. 1. deney de bu amaçla yapılmıştı, fakat sonuca ulaşılammıştı. Ayrıca 24 saat preinkübasyon olarak uygulanan EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un ROS düzeylerine etkisi incelenmek istenmiştir.

Tablo 8a: Normoksik plak (72 saat 15dk)

24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+maddeler)-24 saat hipoksi (PBS)-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2) süresi boyunca normoksi	
Fluoresan intensite	14537
% Kontrol	128 1
	12160
	107
	10207
	89
	13174
	116
	10553
	93
	7450
	65
	11346*
	100* ± 9.09
* Mean olup 6 değerin ortalamasıdır ± SE	

Tablo 8b: (24 saat adezyon-24 saat enkübasyon- 24 saat hipoksi- 15 dk reoksijenizasyon) uygulaması

24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile EGCG (200 µM), Polifenon 60 (62.5 µg/ml), Koenzim Q10 (10 µM)]-24 saat hipoksi (PBS)-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)				
	Maddeler (-) 2	EGCG (200 µM) 3	Polifenon 60 (62.5 µg/ml) 4	Koenzim Q10 (10 µM) 5
Fluoresan intensite	15078	23186	28781	23952
% Kontrol	132	204	253	211
	18309	14090	27218	22364
	161	124	202	197
	18147	16741	27431	11752
	159	147	241	103
	14701	20293	25511	17661
	129	178	224	155
	16558*	18577*	27235*	18932*
	145* ± 8.54	163* ± 17.51	240* ± 11.06	166* ± 24.28
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE				

Tablo 8c: Normoksik plak (73 saat)

24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+maddeler)-24 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2) süresi boyunca normoksi	
Fluoresan intensite	9562
% Kontrol	84 6
	14023
	123
	13204
	116
	14900
	131
	11458
	100
	14210
	125
	12892*
	113* ± 7.27
* Mean olup 6 değerin ortalamasıdır ± SE	

Tablo 8d: (24 saat adezyon- 24 saat enkübasyon- 24 saat hipoksi- 1 saat reoksijenizasyon) uygulaması

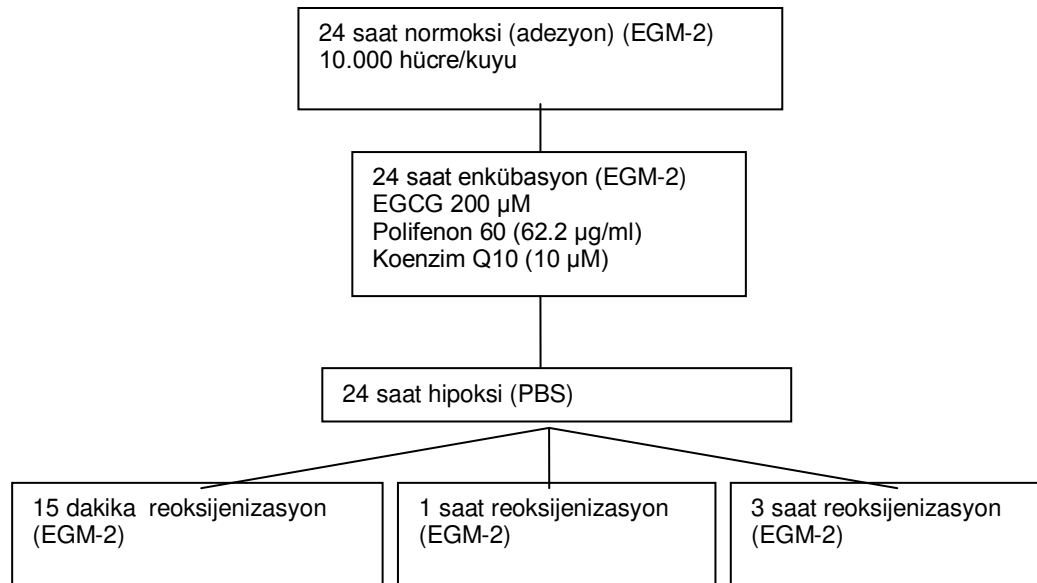
24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile EGCG (200 µM), Polifenon 60 (62.5 µg/ml), Koenzim Q10 (10 µM)]-24 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)				
	Maddeler (-) 7	EGCG (200 µM) 8	Polifenon 60 (62.5 µg/ml) 9	Koenzim Q10 (10 µM) 10
Fluoresan intensite	14214	19824	22016	19857
% Kontrol	125	174	194	175
	15016	15132	24314	15013
	132	133	214	132
	14208	15137	13623	17041
	125	133	120	150
	15215	13087	19413	12705
	134	115	171	111
	14663*	15795*	19841*	16154*
	129* ± 2.34	139* ± 12.49	174* ± 20.25	142* ± 13.58
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE				

Tablo 8e: Normoksik plak (75 saat)

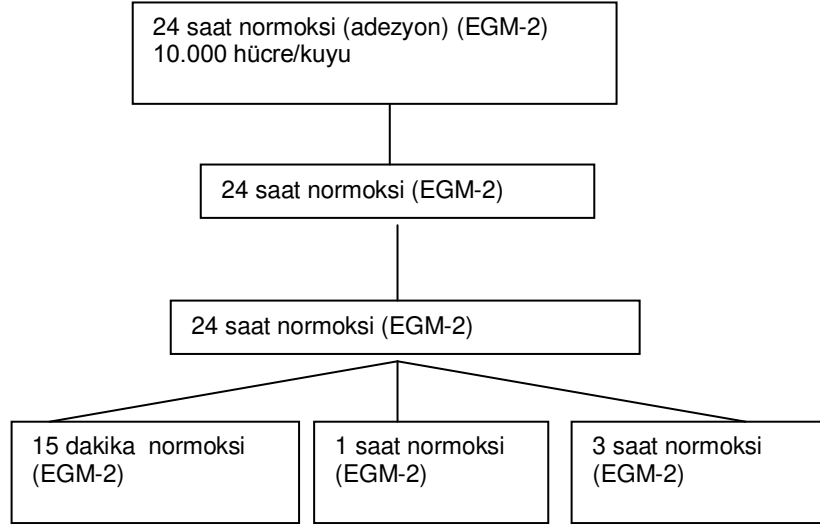
24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+maddeler)-24 saat hipoksi (PBS)-3 saat reoksijenizasyon (EGM-2) süresi boyunca normoksi	
Fluoresan intensite	12203
% Kontrol	107 11
	10589
	93
	11562
	101
	13986
	123
	12690
	111
	12182
	107
	12202*
	107* ± 4.09
* Mean olup 6 değerin ortalamasıdır ± SE	

Tablo 8f: (24 saat adezyon- 24 saat enkübasyon- 24 saat hipoksi- 3 saat reoksijenizasyon) uygulaması

24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile EGCG (200 µM), Polifenon 60 (62.5 µg/ml), Koenzim Q10 (10 µM)]-24 saat hipoksi (PBS)-3 saat reoksijenizasyon (EGM-2)				
	Maddeler (-) 12	EGCG (200 µM) 13	Polifenon 60 (62.5 µg/ml) 14	Koenzim Q10 (10 µM) 15
Fluoresan intensite	15516	22443	30117	18737
% Kontrol	136	197	265	165
	19107	22522	20192	16807
	168	198	177	148
	20376	17040	18765	11684
	179	150	165	102
	16602	18012	18458	21752
	146	158	162	191
	17900*	20004*	21883*	17245*
	157* ± 9.86	176* ± 12.66	192* ± 24.46	151* ± 18.71
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE				



Şekil 15a: Normoksik plak



Şekil 15b: Uygulama plâğı

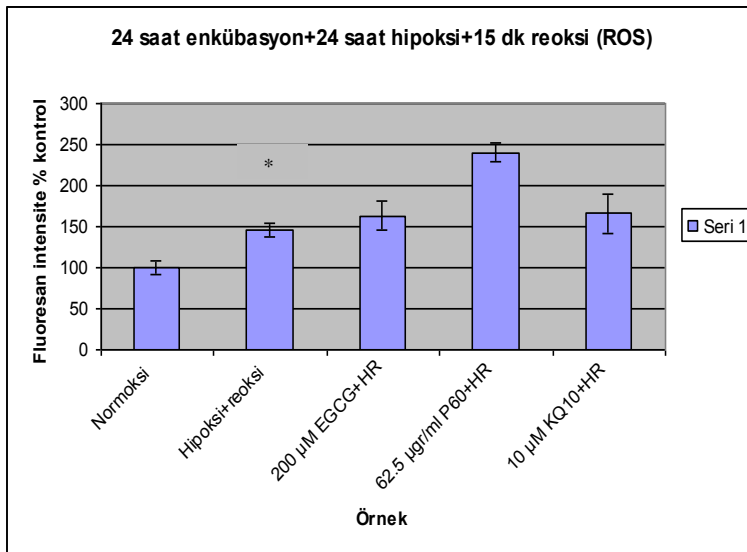
Tablo 9: 2. Deney seti grup numaralarının isimleri

- 1: [24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2)-24 saat hipoksi (PBS)-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)] süresi boyunca normoksi
- 2: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile madde (-)]-24 saat hipoksi (PBS)-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 3: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile EGCG (200 µM)]-24 saat hipoksi (PBS)-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 4: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile Polifenon 60 (62.5 µg/ml)]-24 saat hipoksi (PBS)-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 5: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile Koenzim Q10 (10 µM)]-24 saat hipoksi (PBS)-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 6: [24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2)-24 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)] süresi boyunca normoksi
- 7: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile madde (-)]-24 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
- 8: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile EGCG (200 µM)]-24 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
- 9: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile Polifenon 60 (62.5 µg/ml)]-24 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
- 10: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile Koenzim Q10 (10 µM)]-24 saat hipoksi (PBS)-1 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
- 11: [24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2)-24 saat hipoksi (PBS)-3 saat reoksijenizasyon (EGM-2)] süresi boyunca normoksi
- 12: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile madde (-)]-24 saat hipoksi (PBS)-3 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
- 13: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile EGCG (200 µM)]-24 saat hipoksi (PBS)-3 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
- 14: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile Polifenon 60 (62.5 µg/ml)]-24 saat hipoksi (PBS)-3 saat reoksijenizasyon (EGM-2)
- 15: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [EGM-2 ile Koenzim Q10 (10 µM)]-24 saat hipoksi (PBS)-3 saat reoksijenizasyon (EGM-2)

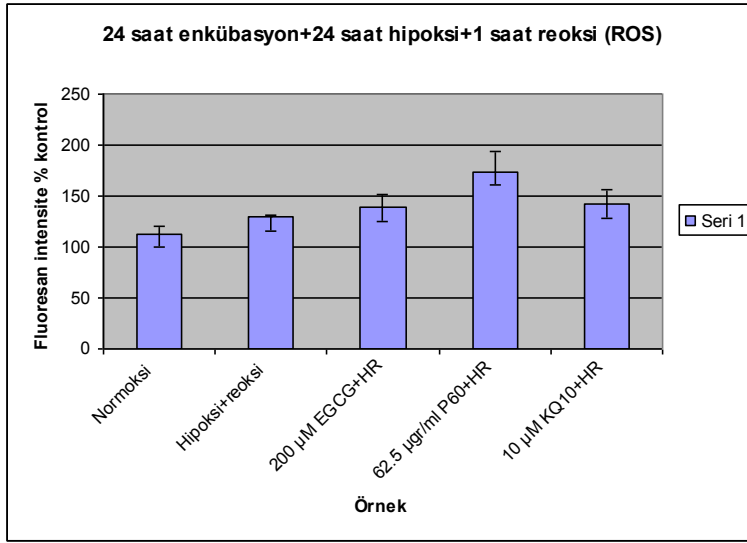
Tablo 10: 2. deney seti istatistik verilerinin karşılaştırılması (p değeri)

15 Dk	(p)	Hipoksi
1-2=0.010		2-7=0.20
2-3=0.686		2-12=0.343
2-4=0.029		7-12=0.029
2-5=0.686		<u>EGCG</u>
<u>1 saat</u>		3-8=0.343
6-7=0.067		3-13=0.686
7-8=0.686		8-13=0.029
7-9=0.343		<u>Polifenon 60</u>
7-10=0.686		4-9=0.029
<u>3 saat</u>		4-14=0.343
11-12=0.010		9-14=1
12-13=0.343		<u>Koenzim Q10</u>
12-14=0.486		5-10=0.486
12-15=1		5-15=0.486
		10-15=0.886

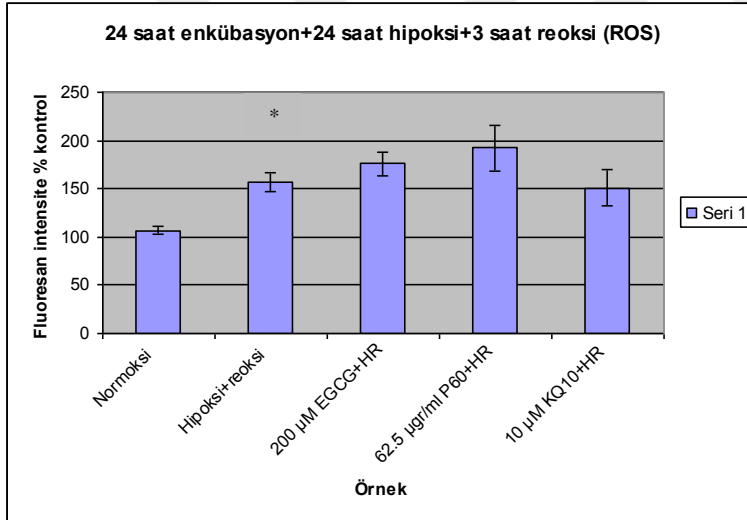
Şekil 16a: ROS düzeyi



Şekil 16b: ROS düzeyi



Şekil 16c: ROS düzeyi



- 24 saat hipoksi+15 dakika reoksijenizasyon; kontrol grubuna göre ROS düzeyini artırdı ($p=0.010$).
- 24 saat hipoksi+1 saat reoksijenizasyon; kontrol grubuna göre ROS düzeyini değiştirmede ($p=0.067$).
- 24 saat hipoksi+3 saat reoksijenizasyon; kontrol grubuna göre ROS düzeyini artırdı ($p=0.010$).
- Sonuç olarak; hipoksi süresi uzadıkça ROS düzeyinde biri 1. saatte ikincisi 3. saatte artan 2 pik yapıyor.
- 15 dakika reoksijenizasyon plağında, 62.5 µg/ml Polifenon 60; madde uygulanmayan kontrol grubuna göre ROS düzeylerini artırmıştır ($p=0.029$).

- Sonuç olarak; EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10 uygulanan gruplarda normoksi ve hiçbir madde uygulanmayan kontrol gruplarına göre ROS düzeyleri yüksektir. 24 saat enkübasyon, 24 saat hipoksi toplam 48 saat sonra; ortamdaki EGCG ve Polifenon 60'ın otooksidasyonunun çok yüksek ROS düzeylerine neden olduğu sonucuna varılabilir. Polifenon 60 otooksidasyonu EGCG otooksidasyonundan daha yüksek düzeyde olup ROS'u daha çok yükseltmiştir. Muhtemelen EGCG' nin yarı ömrü daha kısa olup, EGCG düşerken Polifenon 60' ın yükseldiği döneme denk gelmektedir.



3. deney seti

Amaç (3. deney seti): Bazal düzeye göre ROS artışı 24 saat hipoksi-15dk ve 3 saat reoksijenizasyon sürelerinde 2. deney setinde saptanmıştır. 3. deney setinde ise 2. deney setinde bulduğumuz verileri tekrar elde edebiliyormuyuz diye konfirme etmek amaçlanmıştır.

Tablo 11a: (48 saatlik) uygulama plağı

	24 saat adezyon + 24 saat normoksi 1	24 saat adezyon + 24 saat hipoksi 2
Fluoresan intensite	44455	55987
% Kontrol	105.76	133.20
	44881	41546
	106.78	98.84
	44756	40175
	106.48	95.58
	34031	45902*
	80.96	109.71*
	42030*	45743
	100.00* ± 6.34	109.33 ± 8.50
* Mean olup 4/3 değerin ortalamasıdır ± SE		

Tablo 11b: (48 saat + 15 dk) uygulama plağı

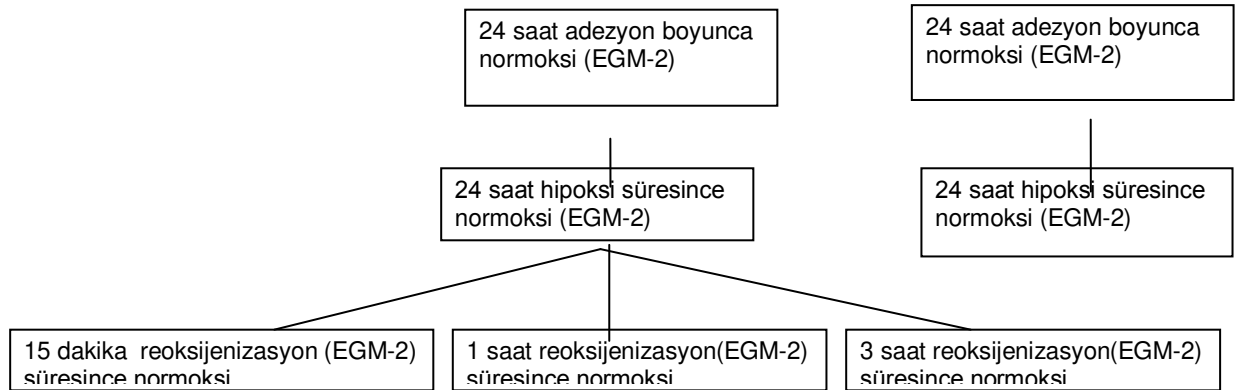
	24 saat adezyon + 24 saat +15 dakika reoksijenizasyon süresi boyunca normoksi 3	24 saat adezyon + 24 saat hipoksi+15 dakika reoksijenizasyon 4
Fluoresan intensite	42156	58978
% Kontrol	100.29	140.32
	38562	54805
	91.74	130.39
	45682	60082
	108.68	142.95
	42013	60579
	99.95	144.13
	42103*	58611*
	100.17* ± 3.45	139.45* ± 3.12
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE		

Tablo 11c: (48 saat + 1 saat) uygulama plağı

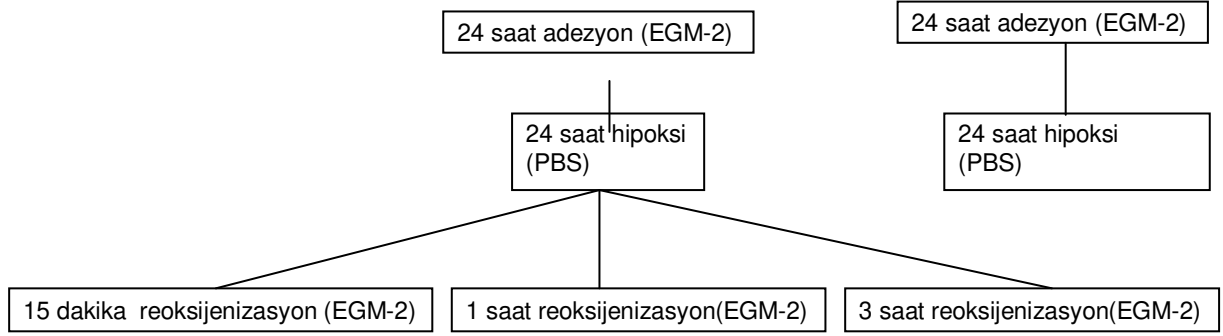
	24 saat adezyon + 24 saat +1 saat reoksijenizasyon süresi boyunca normoksi 5	24 saat adezyon + 24 saat hipoksi+1 saat reoksijenizasyon 6
Fluoresan intensite	43610	56879
% Kontrol	103.75	135.32
	40123	60863
	95.46	144.80
	44102	49593
	104.92	117.99
	41425	43481
	98.56	103.45
	42315*	52704*
	100.67* ± 2.22	125.39* ± 9.18
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE		

Tablo 11d: (48 saat + 3 saat) uygulama plağı

	24 saat adezyon + 24 saat +3 saat reoksijenizasyon süresi boyunca normoksi 7	24 saat adezyon + 24 saat hipoksi+3 saat reoksijenizasyon 8
Fluoresan intensite	45120	55054
% Kontrol	107.35	130.98
	45115	61351
	107.33	145.96
	36529	55670
	86.91	132.45
	43112	58424
	102.57	139.00
	42469*	57624*
	101.04* ± 4.84	137.10* ± 3.43
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE		



Şekil 17a: Normoksik plak



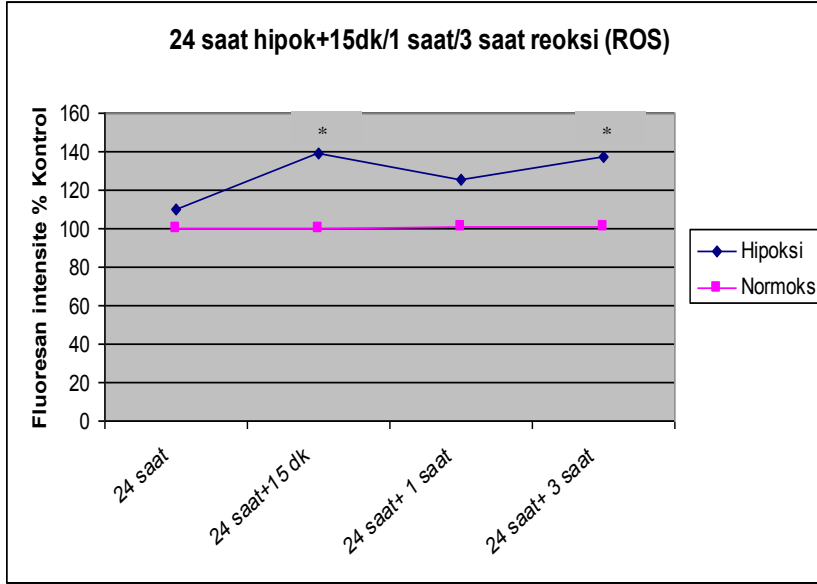
Şekil 17b: Uygulama plağı

Tablo 12: 3. Deney seti grup numaralarının isimleri

1: 24 saat adezyon + 24 saat normoksi
2: 24 saat adezyon + 24 saat hipoksi
3: [24 saat adezyon + 24 saat +15 dakika reoksijenizasyon] süresi boyunca normoksi
4: 24 saat adezyon + 24 saat hipoksi+15 dakika reoksijenizasyon
5: [24 saat adezyon + 24 saat +1 saat reoksijenizasyon]süresi boyunca normoksi
6: 24 saat adezyon + 24 saat hipoksi+1 saat reoksijenizasyon
7: [24 saat adezyon + 24 saat +3 saat reoksijenizasyon] süresi boyunca normoksi
8: 24 saat adezyon + 24 saat hipoksi+3 saat reoksijenizasyon

Tablo 13: 3 deney seti istatistik verilerinin karşılaştırılması (p değeri)

	<u>Reoksijenizasyon</u>	<u>Normoksi</u>
1-2=0.68 (p)		
3-4=0.029/0.021	4-6=0.48	3-5=1
5-6=0.114/0.083	4-8=0.88	3-7=0.88
7-8=0.029/0.021	6-8=0.48	5-7=0.68



Şekil 18a: ROS düzeyi

- 24 saat hipoksi, 24 saat normoksiye göre ROS düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı ($p=0.68$).
- 24 saat hipoksi+15 dakika reoksijenizasyon; kontrol grubuna göre ROS düzeyini artırdı ($p= 0.029$).
- 24 saat hipoksi+1 saat reoksijenizasyon; kontrol grubuna göre ROS düzeyini değiştirmede ($p= 0.114$).
- 24 saat hipoksi+3 saat reoksijenizasyon; kontrol grubuna göre ROS düzeyini artırdı ($p= 0.029$).
- Sonuç olarak; hipoksi süresi uzadıkça ROS düzeyinde biri 1. saatte ikincisi 3. saatte artan 2 pik yapıyor.

4. deney seti

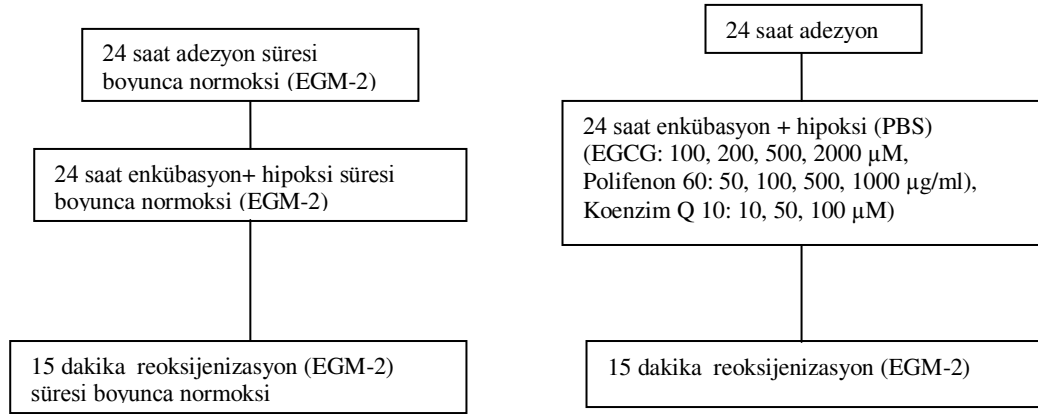
Amaç (4.deney seti): Kontrol grubuna göre ROS düzeyi artışına neden olan hipoksi-reoksijenizasyon süresi 2. deney setinde saptanmıştı. Biz bu deney setinde ROS düzeyi artışı yapan bu sürelerden birini seçerek, bu artışı geriye çevirebilecek EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un farklı dozlarını deneyerek, artan ROS' u düşürebilecek madde arayışı içine girerek 4. deney setini planladık. Ayrıca preinkübasyon uygulamamızda ROS' da düşüşe neden olan EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10 dozu bulamadığımızdan, 4. deney setinde inkübasyonumuzu eş zamanlı olarak uyguladık.

Tablo 14a: (48 saat + 15 dk) normoksi plağı

24 saat adezyon+24 saat enkübasyon+hipoksi+15 dk reoksijenizasyon boyunca normoksi	1
91450	
100.76	
91536	
100.85	
88570	
97.58	
91478	
100.79	
90758*	
100.00 ± 0.62	
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE	

Tablo 14b: (24 saat adezyon- 24 saat enkübasyon+ hipoksi- 15 dk reoksijenizasyon) uygulaması

24 saat adezyon (EGM-2)+24 saat enkübasyon+hipoksi (PBS)+15 dk reoksijenizasyon											
	EGCG				Polifenon 60				Koenzim Q10		
Madde (-)	100 µM	200 µM	500 µM	2000 µM	50 µg/ml	100 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	10 µM	50 µM	100 µM
2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
94131	94065	94183 (-)	93436	94978	93590	94855	94652	95207	93720	93132	92816
103.71	103.64	103.77	102.95	104.64	103.12	104.51	104.29	104.90	103.26	102.61	102.26
94039	95297	81836	87367	94932	94932	95133	94953	92308	91692	93003	93102
103.61	105.00	90.16	96.26	104.59	104.59	104.82	104.62	101.70	101.02	102.47	102.58
91182	90546	80023	76629	94336	94336	95051	95097	93710	92372	91883	91813
100.46	99.76	88.17	84.43	103.94	103.94	104.73	104.78	103.25	101.77	101.23	101.16
93977	94392	89959	94295	95185	95185	95560	93839	92401	92463	92104	90701
103.54	104.00	99.11	103.89	104.87	104.87	105.29	103.39	101.81	101.87	101.48	99.93
93332*	93575*	86500*	87931	94857*	94510*	95149*	94635*	93406*	92561*	92530*	92108*
102.83	103.10	95.30	96.88	104.51	104.13	104.83	104.27	102.91	101.98	101.95	101.48
± 0.79	± 1.14	± 3.69	± 4.48	± 0.19	± 0.38	± 0.16	± 0.31	± 0.74	± 0.46	± 0.34	± 0.60
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE											



Şekil 19: (48 saat + 15 dk) uygulaması

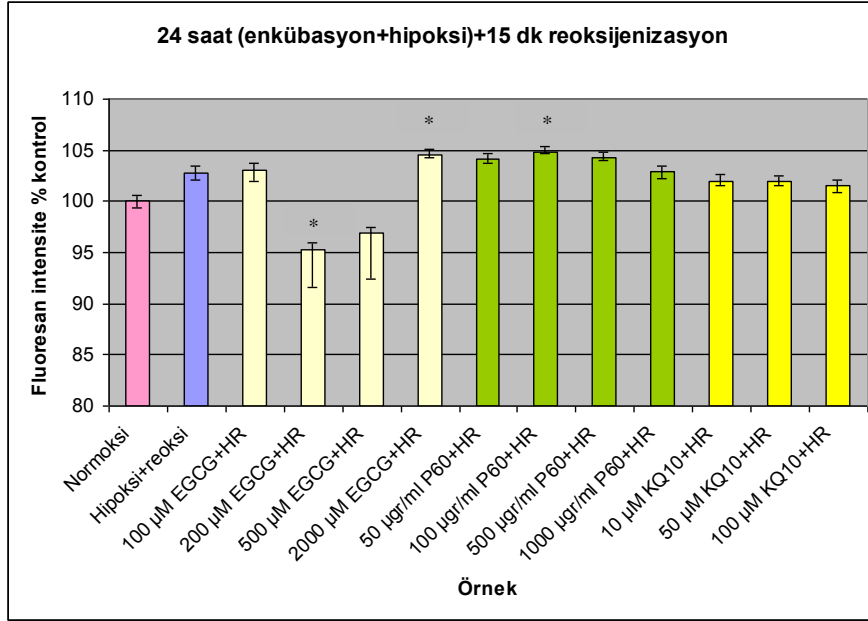
Tablo 15: 4. Deney seti grup numaralarının isimleri

1:	[24 saat adezyon+24 saat enkübasyon+hipoksi+15 dk reoksijenizasyon] süresi boyunca normoksi
2:	24 saat adezyon (EGM-2)+24 saat enkübasyon -madde (-) +hipoksi (PBS)+15 dk reoksijenizasyon
3:	24 saat adezyon (EGM-2)+24 saat enkübasyon (100µM EGCG) +hipoksi (PBS)+15 dk reoksijenizasyon
4:	24 saat adezyon (EGM-2)+24 saat enkübasyon (200µM EGCG) +hipoksi (PBS)+15 dk reoksijenizasyon
5:	24 saat adezyon (EGM-2)+24 saat enkübasyon (500µM EGCG) +hipoksi (PBS)+15 dk reoksijenizasyon
6:	24 saat adezyon (EGM-2)+24 saat enkübasyon (2000µM EGCG) +hipoksi (PBS)+15 dk reoksijenizasyon
7:	24 saat adezyon (EGM-2)+24 saat enkübasyon (50 µg/ml Polifenon 60) +hipoksi (PBS)+15 dk reoksijenizasyon
8:	24 saat adezyon (EGM-2)+24 saat enkübasyon (100 µg/ml Polifenon 60) +hipoksi (PBS)+15 dk reoksijenizasyon
9:	24 saat adezyon (EGM-2)+24 saat enkübasyon (500 µg/ml Polifenon 60) +hipoksi (PBS)+15 dk reoksijenizasyon
10:	24 saat adezyon (EGM-2)+24 saat enkübasyon (1000 µg/ml Polifenon 60) +hipoksi (PBS)+15 dk reoksijenizasyon
11:	24 saat adezyon (EGM-2)+24 saat enkübasyon (10µM Koenzim Q10) +hipoksi (PBS)+15 dk reoksijenizasyon
12:	24 saat adezyon (EGM-2)+24 saat enkübasyon (50µM Koenzim Q10) +hipoksi (PBS)+15 dk reoksijenizasyon
13:	24 saat adezyon (EGM-2)+24 saat enkübasyon (100µM Koenzim Q10) +hipoksi (PBS)+15 dk reoksijenizasyon

Tablo 16: 4. deney seti istatistik verilerinin karşılaştırılması (p değeri)

1-2=0.20 (p)
2-3=0.48
2-4=0.034
2-5=0.48
2-6=0.029
2-7=0.20
2-8=0.029

2-9=0.20
 2-10=0.88
 2-11=0.34
 2-12=0.34
 2-13=0.20



Şekil 20: ROS düzeyi

- 24 saat hipoksi+15 dk reoksijenizasyon normoksik gruba göre ROS düzeylerinde artışa neden oldu ama istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.20$).
- 200 µM EGCG ile 24 saat enkübasyon, hipoksi-reoksijenizasyon grubuna göre ROS düzeylerini anlamlı olarak düşürdü ($p=0.034$).
- 2000 µM EGCG ile 24 saat enkübasyon, hipoksi-reoksijenizasyon grubuna göre ROS düzeylerini anlamlı olarak yükseltti ($p=0.029$).
- 100 µg/ml Polifenon 60 ile 24 saat enkübasyon, hipoksi-reoksijenizasyon grubuna göre ROS düzeylerini anlamlı olarak yükseltti ($p=0.029$).
- EGCG' nin antioksidan etkisi 24 saat içinde ortaya çıkıyor. Polifenon 60' da ise 24. saatten sonra oksidan etki belirgin.

5.deney seti

Amaç (5. deney seti): Enkübasyon süresi 24 saat olduğunda ve hipoksi ile eş zamanlı uygulandığında EGCG’ da ROS’ u düşürücü etki ortaya çıktı. Acaba enkübasyon süresi 48 saate çıkarıldığında farklı bir etki gözlemleyebilecek miyiz amacıyla 5. deney setini planladık.

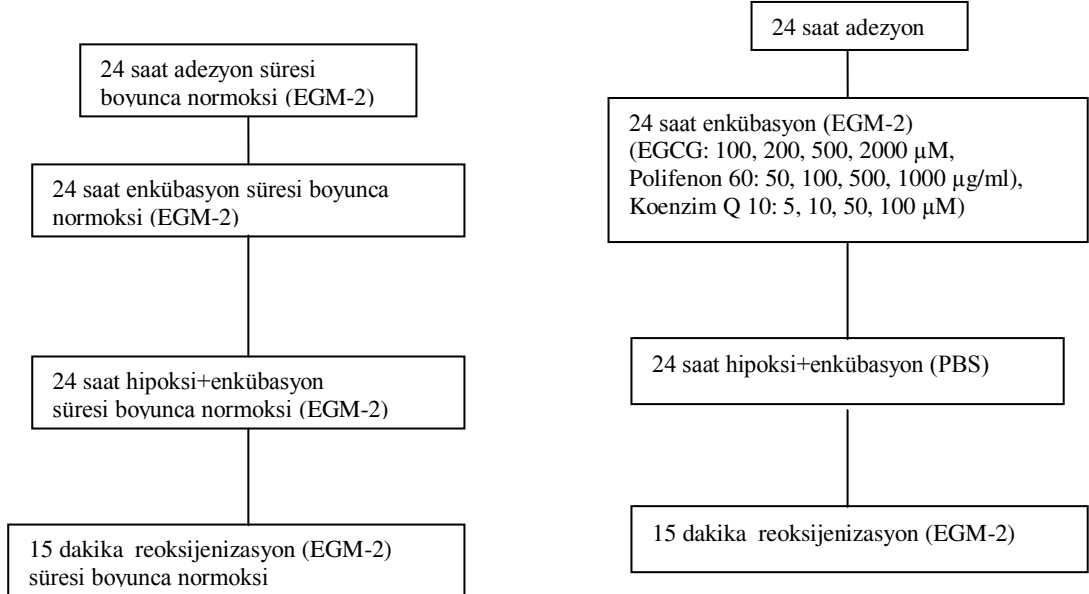
Tablo 17a: Normoksik plak (72 saat 15 dk)

24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+maddeler)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2) süresi boyunca normoksi	
Fluoresan intensite	43125
% Kontrol	96 1
	46523 103
	48501 108
	41253 91
	44850* 100* ± 3.75
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE	

Tablo 17b: (24 saat adezyon- 24 saat enkübasyon- 24 saat hipoksi+ enkübasyon- 15 dk reoksijenizasyon) uygulaması

24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+maddeler)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)													
	Maddeler	EGCG				Polifenon 60				Koenzim Q10			
	(-)	100 μM	200 μM	500 μM	2000 μM	50 μg/ml 7	100 μg/ml 8	500 μg/ml 9	1000 μg/ml 10	5 μM 11	10 μM 12	50 μM 13	100 μM 14
intensite	51748	58217	57342	64036	57999	59880	78776	71018	83281	45236	51322	52090	55892
%Kontrol	115	129	127	142	129	133	175	158	185	100	114	116	124
	54296	45736	53693	63502	60424	59429	60760	91221	81967	47862	52114	58718	68766
	121	101	119	141	134	132	135	203	182	106	116	130	153
	55130	52945	59151	86199	45262	49780	80662	64728	96767	46694	51718*	67692	58360
	122	118	131	192	100	110	179	144	215	104	115* ± 1.00	150	130
	78392	52299*	56728*	71245*	54561*	56363*	73399*	75655*	87338*	46597*		59500*	61006*
	174	116* ± 8.14	126* ± 3.52	158* ± 16.83	121* ± 10.59	125* ± 7.50	163* ± 14.04	168* ± 17.79	194* ± 10.53	103* ± 1.76		132* ± 9.86	136* ± 8.83
	59891*												
	133* ± 13.75												

* Mean olup 4/3 değerin ortalamasıdır ± SE



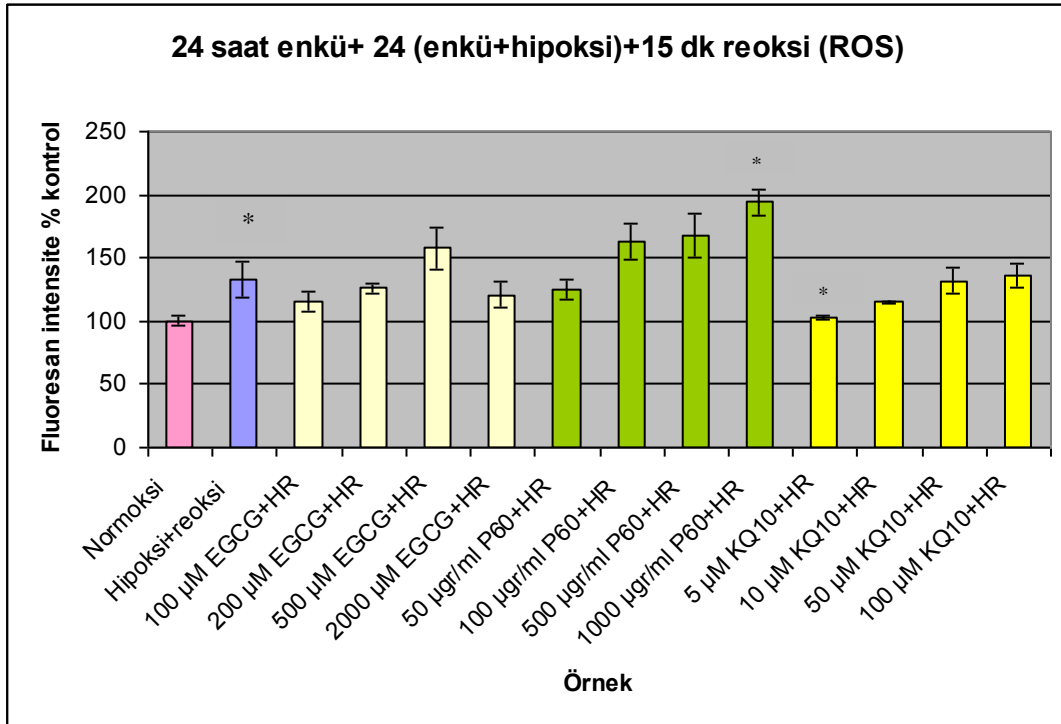
Şekil 21: (72 saat + 15 dk) uygulaması

Tablo 18: 5. Deney seti grup numaralarının isimleri

- 1: [24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)] süresi boyunca normoksi
- 2: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [(EGM-2+madde (-))-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 3: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+100 µM EGCG)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 4: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+200 µM EGCG)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 5: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+500 µM EGCG)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 6: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+2000 µM EGCG)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 7: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+50 µg/ml Polifenon 60)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 8: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+100 µg/ml Polifenon 60)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 9: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+500 µg/ml Polifenon 60)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 10: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+1000 µg/ml Polifenon 60)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 11: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+5 µM Koenzim Q10)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 12: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+10 µM Koenzim Q10)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 13: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+5 0µM Koenzim Q10)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 14: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+100µM Koenzim Q10)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)

Tablo 19: 5. deney setinin istatistik karşılaştırılması (p değeri)

1-2=0.029/0.021 (p)	3-4=0.40	11-12=0.200/0.083
2-3=0.629	3-5=0.100/0.05	11-13=0.100/0.05
2-4=0.857	3-6=0.70	11-14=0.100/0.05
2-5=0.229	4-5=0.100/0.05	12-13=0.200/0.139
2-6=1	4-6=1	12-14=0.200/0.083
2-7=1	5-6=0.100/0.05	13-14=0.700
2-8=0.114/0.077	7-8=0.100/0.05	
2-9=0.229	7-9=0.100/0.05	
2-10=0.057/0.034	7-10=0.100/0.05	
2-11=0.057/0.034	8-9=1	
2-12=0.267	8-10=0.100/0.05	
2-13=0.857	9-10=0.400	
2-14=0.400		



Şekil 22: ROS düzeyi

- 24 saat hipoksi+15 dakika reoksijenizasyon; kontrol grubuna göre ROS düzeyini artırdı (p= 0.029).
- 1000 µg/ml Polifenon 60; 24 saat hipoksi+15 dakika reoksijenizasyon ile indüklenen ROS düzeylerini daha da artırdı (p=0.034).
- 5 µM Koenzim Q10; 24 saat hipoksi+15 dakika reoksijenizasyon ile indüklenen ROS düzeylerini düşürdü (p=0.034).
- 500 µM EGCG, 100 µM EGCG' ye göre daha yüksek ROS düzeylerine neden oldu (p=0.05). 500 µM EGCG, 200 µM EGCG' ye göre daha yüksek ROS düzeylerine neden oldu (p=0.05). 2000 µM EGCG, 500 µM EGCG' ye göre daha yüksek ROS düzeylerine neden oldu (p=0.05).
- 100 µg/ml Polifenon 60, 50 µg/ml Polifenon 60' a göre daha yüksek ROS düzeylerine neden oldu (p=0.05). 500 µg/ml Polifenon 60, 50 µg/ml Polifenon 60' a göre daha yüksek ROS düzeylerine neden oldu (p=0.05). 1000 µg/ml Polifenon 60, 50 µg/ml Polifenon 60' a göre daha yüksek ROS düzeylerine neden oldu (p=0.05). 1000 µg/ml Polifenon 60, 100 µg/ml Polifenon 60' a göre daha yüksek ROS düzeylerine neden oldu (p=0.05).
- 50 µM Koenzim Q10, 5 µM Koenzim Q10'a göre daha yüksek ROS düzeylerine neden oldu (p=0.05). 100 µM Koenzim Q10, 5 µM Koenzim Q10'a göre daha yüksek ROS düzeylerine neden oldu (p=0.05).
- Sonuç olarak; EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un dozu artırıldıkça oksidan etkilerinde artış gözlemlendi. Düşük dozlarının antioksidan özelliğinin daha belirgin olduğu sonucuna varıldı. Doz artışı her 3 madde için oksidan etkiyi artırıyordu. EGCG' de oksidan etki 8-24 saatleri arasında belirginken, Polifenon 60'da 12-36 saatleri arası belirgin olarak artıyordu. Koenzim Q10'da da 24. saatlerde oksidan etkide sivri bir artış yaşıyordu (22-26 saatleri arası). Oksidan etki bakımından en güçlü olan Polifenon 60 > EGCG > Koenzim Q10 . Sırasıyla daha yüksek tepe değerleri elde edildi. Ayrıca enkübasyon süresi 48 saate uzatıldığında Koenzim Q10' un anti-oksidan etkisi daha belirgin olarak ortaya çıktı.

6. deney seti

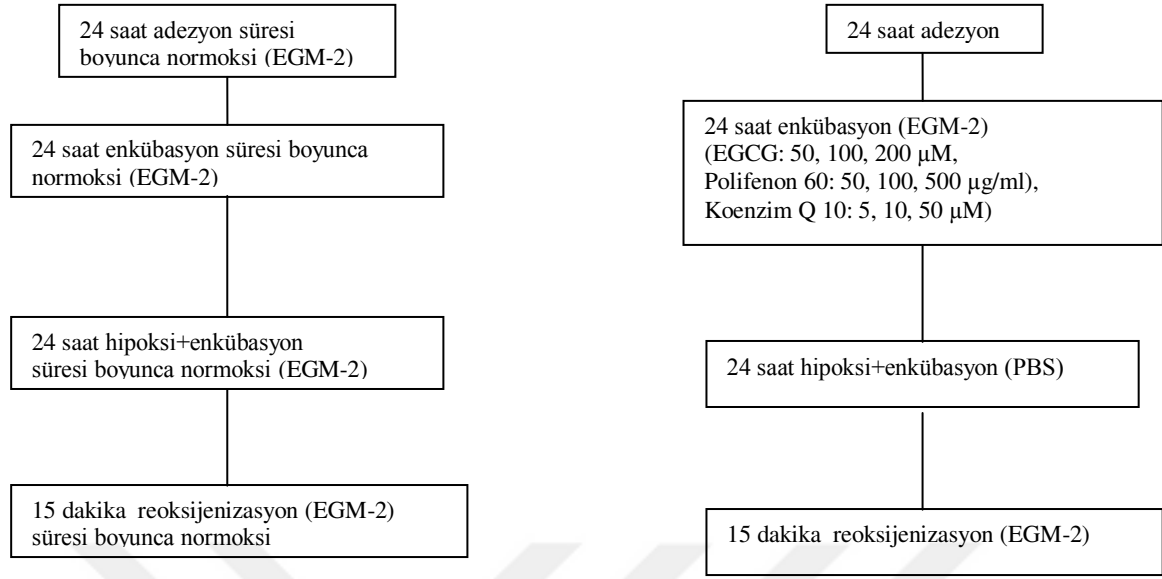
Amaç (6. deney seti): 5. deney setinde 48 saat Koenzim Q10 enkübasyonu ile (24 saati preenkübasyon, 24 saati eş zamanlı enkübasyon) ROS' u düşürücü etki bulduk. Acaba aynı etkiyi bulabiliyor muyuz diye 6. deney setini 5. deney setinin bir tekrarı olarak hazırladık.

Tablo 20a: Normoksik plak (72 saat 15 dk)

24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+maddeler)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2) süresi boyunca normoksi	
Fluoresan intensite	56456
% Kontrol	102 1
	54324
	98
	52345
	95
	56789
	103
	54978*
	100* ± 1.84
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE	

Tablo 20b: (24 saat adezyon- 24 saat enkübasyon- 24 saat hipoksi + enkübasyon- 15 dk reoksijenizasyon) uygulaması

24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+maddeler)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)										
		EGCG			Polifenon 60			Koenzim Q10		
	Madde (-)	50 µM	100 µM	200 µM	50 µg/ml	100 µg/ml	500 µg/ml	5 µM	10 µM	50 µM
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
intensite	61707	58754	59879	66855	60980	70043	75958	57435	58070	58048
%Kontrol	112	106	108	121	110	127	138	104	105	105
	59516	65425	65276	59786	65150	64769	66387	56345	58128	56430
	108	119	118	108	118	117	120	102	105	102
	57755	65555	69037	62096	70476	61095	64116	53547	56687	54871
	105	119	125	112	128	111	116	97	103	99
	57888	62418	66290	69142	63500	60223	60813	55669	55549	52751
	105	113	120	125	115	109	110	101	101	95
	59216*	63038*	65120*	64469*	65026*	64032*	66618*	55749*	57108*	55525*
	107*	114*	118*	117*	118	116	121	101*	103*	100*
	± 1.65	± 3.09	± 3.56	± 3.92	± 3.79	± 4.04	± 6.02	± 1.47	± 0.95	± 2.13
* Mean olup 4 değerin ortalamasıdır ± SE										



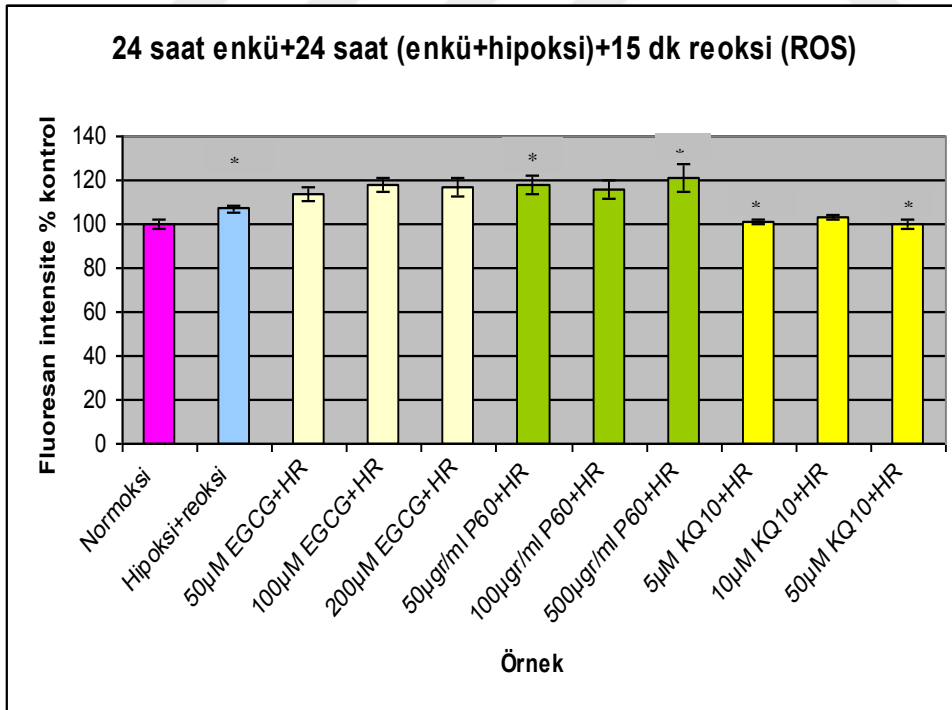
Şekil 23: (72 saat + 15 dk) uygulaması

Tablo 21: 6. Deney seti grup numaralarının isimleri

- 1: [24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+maddeler)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)] süresi boyunca normoksi
- 2: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon [(EGM-2+madde(-))-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)]
- 3: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+50 µM EGCG)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 4: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+100 µM EGCG)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 5: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+200 µM EGCG)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 6: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+50 µg/ml Polifenon 60)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 7: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+100 µg/ml Polifenon 60)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 8: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+500 µg/ml Polifenon 60)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 9: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+5 µM Koenzim Q10)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 10: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+10 µM Koenzim Q10)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)
- 11: 24 saat adezyon (EGM-2)-24 saat enkübasyon (EGM-2+50 µM Koenzim Q10)-24 saat hipoksi (PBS)+enkübasyon-15 dakika reoksijenizasyon (EGM-2)

Tablo 22: 6. deney seti verilerinin istatistiksel karşılaştırılması (p değeri)

1-2=0.029/0.020	3-4=0.486
2-3=0.114/0.080	4-5=1
2-4=0.057/0.058	3-5=0.686
2-5=0.114/0.078	6-7=0.686
2-6=0.057/0.042	7-8=0.686
2-7=0.114/0.081	6-8=0.686
2-8=0.057/0.042	9-10=0.200
2-9=0.029/0.020	10-11=0.343
2-10=0.114/0.065	9-11=0.886
2-11=0.057/0.038	



Şekil 24: ROS düzeyi

- 24 saat hipoksi+15 dakika reoksijenizasyon; kontrol grubuna göre ROS düzeyini artırdı (p= 0.029).
- 50 µg/ml Polifenon 60; 24 saat hipoksi+15 dakika reoksijenizasyon ile indüklenen ROS düzeylerini daha da artırdı (p=0.042).
- 500 µg/ml Polifenon 60; 24 saat hipoksi+15 dakika reoksijenizasyon ile indüklenen ROS düzeylerini daha da artırdı (p=0.042).
- 5 µM Koenzim Q10; 24 saat hipoksi+15 dakika reoksijenizasyon ile indüklenen ROS düzeylerini düşürdü (p=0.050).
- 50 µM Koenzim Q10; 24 saat hipoksi+15 dakika reoksijenizasyon ile indüklenen ROS düzeylerini düşürdü (p=0.047).
- Sonuç olarak; EGCG' dozu artırıldıkça ROS düzeylerinde ılımlı bir artış yaşandı, istatistiksel olarak anlamlı değildi, Polifenon 60'da da doz arttıkça ROS arttı. Polifenon 60 'ın yüksek dozları ise ROS' u istatistiksel anlamlı olarak artırdı. 48 saat yeşil çay inkübasyonu beklenenin aksine doz ve süre arttıkça oksidan etki göstererek ROS'u artırdı. Diğer bir sonuç; Koenzim Q10'un 5 ve 50 µM dozları ROS'u anlamlı olarak düşürdü. 10 µM Koenzim Q10 inkübasyonu ile düşme vardı ama istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.065).

Bulgular: LDH

Hipoksi ve normoksi koşulları için ortam seçimi

1. deney seti

Amaç (1a. deney seti): LDH deneylerinin 1. deney setinde amacımız hücre ortamlarının birbirinden farklarını belirlemek, hangi ortamın hangi deney için uygun olduğuna karar vermek, serum içerikleri farklı olan ortamların LDH düzeyine etkisini araştırmaktır.

Tablo 23: PBS, optimem ve EGM-2 ortamlarının normoksik ve farklı süre hipoksik koşullarda LDH düzeyi

normoksi				hipoksi		
PBS	Optimem	EGM-2	EGM-2	PBS	Optimem	EGM-2
(4h)	(4h)	(4h)	(28h)	(4h)	(4h)	(4h)
?	7,31	9,13	63,96	14,43	5,7	?
	9,11	12,58	88,10	28,91	5,57	
	8,93	13,25	92,80	47,56	6,20	
		16,68	116,77	18,33		

Tablo 23’de görüldüğü üzere EGM-2 ‘de ekzojen serum katıldığından dolayı (ortamın içinde %5 oranında serum var) hipoksi uygulanmayan koşullarda bile LDH değeri yüksek çıkmıştır. Bu nedenle EGM-2 nin uygun bir çalışma koşulu oluşturmadığı serumdaki LDH’ dan ötürü yanlış pozitif sonuçlara neden olduğu görülmüştür. Optimemde de hipoksi koşulunda normoksiye göre artış yaşanmamıştır, hatta biraz daha düşüktür. Optimemin içinde glikoz vardır, hipoksiye maruz bırakıldığında unaerob solunum yapmaları hücrelerin ölmeme nedeni olabilir. Bu nedense hipoksi oluşturulurken PBS kullanılmıştır.

Optimum absorbans değeri ortalama alınarak 118 kabul edilmiştir. Optimumdan kaynaklanan hata payı (fazla absorbans) örnek ve maksimum kuyudan çıkarılmıştır. Maksimum kuyuya son konsantrasyonu %1 olacak şekilde triton x 100 katılarak 2 saat bekletilmiştir. Hücre çeperi parçalanarak ortama salınabilecek maksimum LDH değeri bulunmuştur. Örnek maksimuma % sitotoksisite değeri olarak oranlanmıştır. Yani bu kuyudaki hücrelerden toplam şu kadar LDH salınabilecekken bu kadar salınmıştır= % sitotoksisite

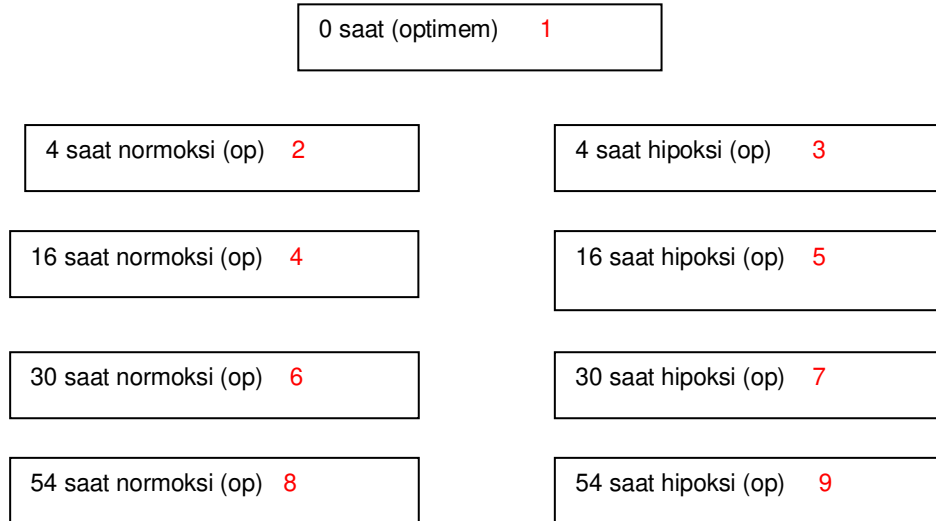
ROS için 10000 hücre/ kuyu kullanılmıştır. LDH için 8000 hücre/ kuyu kullanılmıştır. ROS hücreleri ile deneme yapılarak, 5000 hücre ile de sonuç bulunduğu gözlemlenmiş, hatta gayet olumlu veriler elde edilmiştir (Tablo 24). Fazla hücre israf olmasın diye, kit prospektüsünde 10000 hücre deniyor. Biz 8000 hücre ile çalıştık.

Tablo 24: Hücre sayısı denemesi (ROS) (1b deney seti)

[HPF]	5 μ M	10 μ M	5 μ M	10 μ M	5 μ M	1 μ M	Boş plak
Hücre sayısı	10.000	5.000	5.000	1.000	1.000	1.000	0
	46685	72076	44402	49425	37475	17365	5101
	45366	83239	40621	60034	35890	16060	5156
	47476	62286	39384	51120	35455	15696	5272

2. deney seti

Amaç (2. deney seti): EGM-2' nin yüksek serum içeriği, ve serumdaki LDH miktarı, LDH ölçümünde dışarıdan eksojen LDH katar gibi etli gösterdiğinden EGM-2 ortamı LDH ölçümü için uygun bulunmamıştır. Bu nedenle düşük serum içerikli optimem kullanılarak hipoksik koşul oluşturulup daha doğrusu artan hipoksi sürelerinde aynı süredeki normoksiye göre ilave hücre ölümünü yani LDH artışını indükleyip indüklemediğinin test edilmesi 2. deney setinde amaçlanmıştır.



Şekil 25: 2. deney seti akış şeması

Tablo 25: 0-4-16-30-54 saat normoksi ve hipoksi koşulları için maksimum hücre nekrozu koşuluna oranla hesaplanan % sitotoksosite değerleri

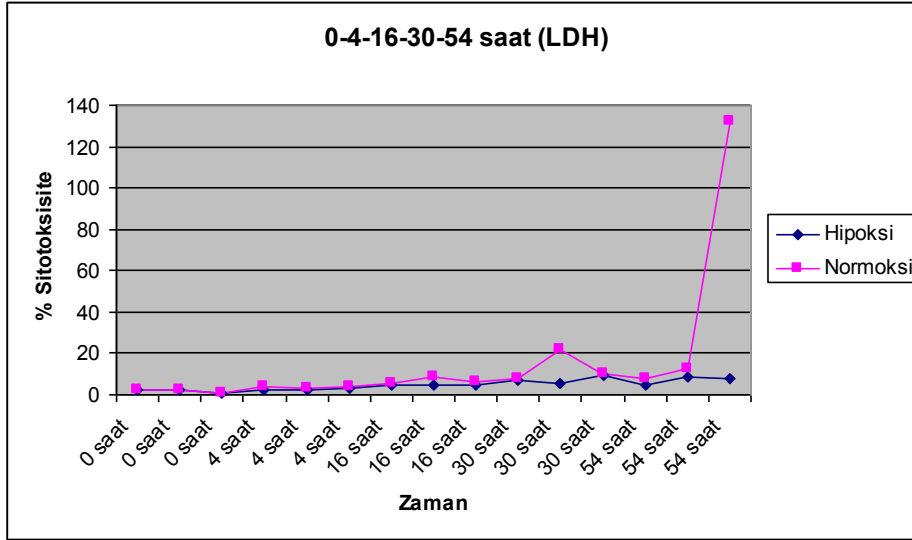
0.saat optimem							
Maksimum	Örnek	optimem	% Sitotoksosite				
1.336	0.145	0.112	2.21				
1.359	0.151	0.145	2.65				
1.360	0.131	0.115	1.04				
4.saat normoksi (optimem)				4 saat hipoksi (optimem)			
Maksimum	Örnek	Boş kuyu	% Sitotoksosite	Maksimum	Örnek	Boş kuyu	% Sitotoksosite
1.338	0.170	0.048	4.26	1.372	0.150	0.048	2.55
1.317	0.153	0.047	2.91	1.282	0.147	0.049	2.49
1.318	0.168	0.049	4.16	1.342	0.152	0.050	2.77
16 .saat normoksi (optimem)				16 saat hipoksi (optimem)			
Maksimum	Örnek	optimem	% Sitotoksosite	Maksimum	Örnek	Boş kuyu	% Sitotoksosite
1.549	0.197	0.121	5.52	1.831	1.110		5.02
1.825	0.265	0.118	8.61	1.826	0.202		4.91
1.698	0.219	0.515 (-)	6.39	2.145	0.221		5.08
30 .saat normoksi (optimem)				30 saat hipoksi (optimem)			
Maksimum	Örnek	optimem	% Sitotoksosite	Maksimum	Örnek	Boş kuyu	% Sitotoksosite
1.276	0.213	0.110	8.20	1.962	0.255		7.42
1.182	0.347	0.102	21.52	2.183	0.239		5.85
1.083	0.219	0.102	10.46	2.389	0.340		9.77
54 .saat normoksi (optimem)				54 saat hipoksi (optimem)			
Maksimum	Örnek	optimem	% Sitotoksosite	Maksimum	Örnek	Boş kuyu	% Sitotoksosite
1.368	0.214	0.141	7.68	2.758	0.241		4.65
0.877	0.215	0.123	12.77	1.306	0.224		8.92
0.549	0.687		132	2.050	0.274		8.07

Tablo 26: LDH ölçümü yapılan 2. deney setindeki verilerin grup numaralarının isimleri

- | |
|--------------------------|
| 1: 0 saat (optimem) |
| 2: 4 saat normoksi (op) |
| 3: 16 saat normoksi (op) |
| 4: 30 saat normoksi (op) |
| 5: 54 saat normoksi (op) |
| 6: 4 saat hipoksi (op) |
| 7: 16 saat hipoksi (op) |
| 8: 30 saat hipoksi (op) |
| 9: 54 saat hipoksi (op) |

Tablo 27: LDH ölçümü yapılan 2. deney setindeki verilerin istatistiksel olarak karşılaştırılması (p değeri)

1-2=0.100/0.050	1-3=0.400
1-4=0.100/0.050	1-5=0.100/0.050
1-6=0.100/0.050	1-7=0.100/0.050
2-4=0.100/0.050	3-5=0.100/0.050
2-6=0.100/0.050	3-7=0.100/0.050
4-6=0.200/0.127	5-7=0.100/0.050
2-3=0.100/0.050	
4-5=0.100/0.050	
6-7=0.200/0.127	



Şekil 26: LDH ölçümü

- Sırasıyla 0-4-16-30-54 saat hipoksi süresi artırıldıkça LDH artmaktadır ($p=0.05$), hipoksi süresi ile LDH arasında korelasyon vardır ($p=0.00$), hipoksi süresi ile LDH için lineer regresyon incelenmesinde $p=0.00$ 'dır.
- 4-16-30 ve 54 saat normoksi ile hipoksi karşılaştırıldığında gruplar arası fark $p=0.05$, 0.05 , 0.12 , 0.40 . Her 4 süre için normoksik durumda LDH ortalamaları hipoksik durumdan daha yüksektir.
- Sonuç olarak hem normoksida hem hipoksida LDH zamana bağımlı olarak artmaktadır. Hipoksida normoksiye göre LDH artışı yaşanmamıştır. Bu nedenle hipoksik koşul için PBS, normoksik koşul için optimum kullanıma karar verilmiştir. Yukarıdaki grafikte ise her 2 koşul için optimum kullanılmıştır.

3. deney seti

Amaç (3. deney seti): ROS ölçümünde ROS artışını indüklemek için hipoksik koşulda EGM-2 ortamı yerine PBS kullanmayı tercih etmiştik. Böylece hücreyi hasardan daha fazla etkilenecek duruma getirmiştik. Ancak ROS hücre içi ölçülürken LDH süpernatanta salınmaktadır. ROS ölçümünde normoksiden hipoksiye geçerken ortamı PBS ile değiştirebiliyoruz. Ancak aynı işlem LDH da mümkün değil. Çünkü ortama salınan LDH da süpernatantla birlikte ortamdan alınmış oluyor. Oysa ROS için plağa yapışan adheran hücrelerin içinde ölçüm yapılıyor. Dolayısıyla LDH ölçümlerinde hipoksi + reoksijenizasyon değil yalnızca hipoksi kullanılmıştır. Gene de merakımızı köreltmek için 3. deney setinde reoksijenizasyon uygulaması ortam değişimi yapılmadan sadece havalanma ortamı ile

reoksijene edilmiştir. Amaç ortam değişimi olmadan sadece reoksijenizasyonun ilave LDH' 1 indükleyip indüklemeyeceğinin saptanmasıdır.

Tablo 28: Hipoksi ve farklı sürelerdeki reoksijenizasyonun LDH düzeyine etkisi

5 saat hipoksi (optimum)(optimum körü 121)			
Maksimum	Örnek		% Sitotoksosite
0.935	0.122	1/814=100?	0.12
1.191	0.128		0.65
1.223	0.131		0.90
5 saat hipoksi-2 saat reoksijenizasyon			
1.606	0.152		2.08
1.575	0.171		3.43
1.044	0.169		5.20
5 saat hipoksi-3 saat reoksijenizasyon			
1.074	0.160		4.09
1.986	0.634		27.50
1.101	0.176		5.61
5 saat hipoksi-4 saat reoksijenizasyon			
0.945	0.163		5.09
1.055	0.180		6.31
1.077	0.179		6.06



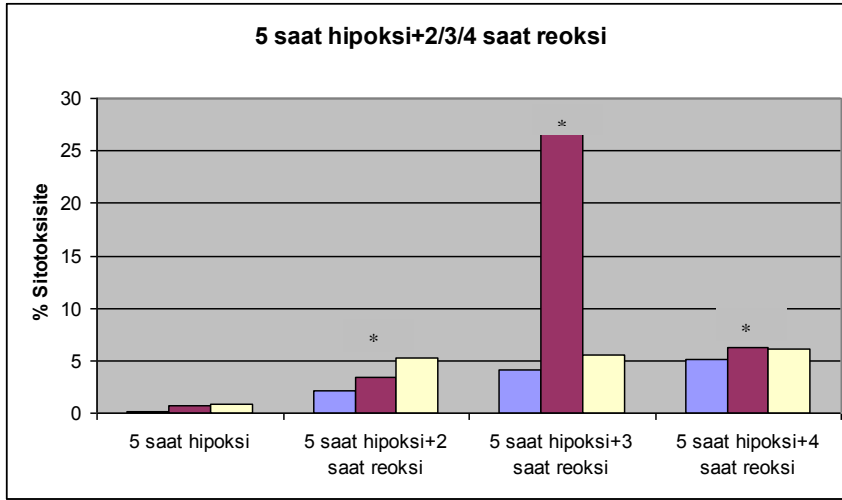
Şekil 27: 3. deney seti akış şeması

Tablo 29: LDH deneyi 3. deney seti verilerinin grup numaralarının isimleri

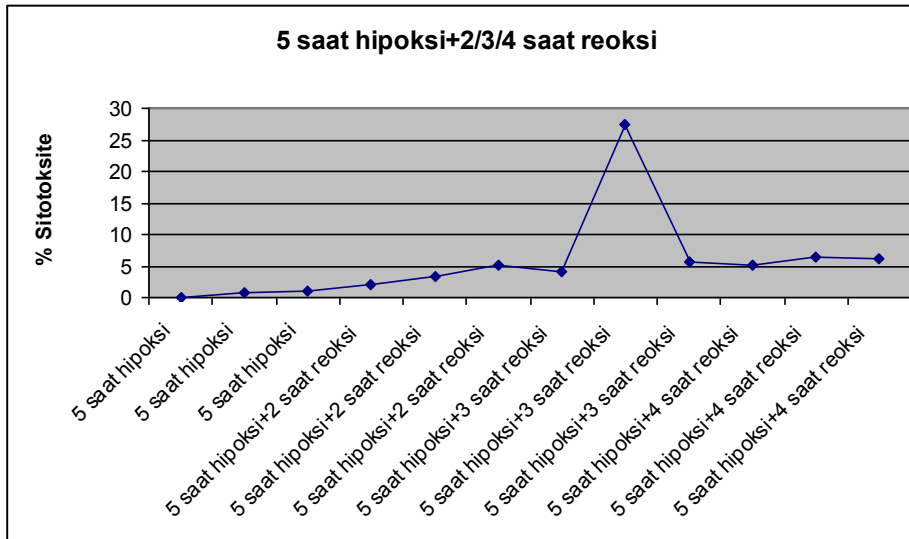
1: 5 saat hipoksi (op)
2: 5 saat hipoksi+2 saat reoksi. (op)
3: 5 saat hipoksi+3 saat reoksi. (op)
4: 5 saat hipoksi+4 saat reoksi. (op)

Tablo 30: LDH deneyi 3. deney seti verilerinin istatistiksel karşılaştırılması (p değeri)

1-2=0.05
1-3=0.05
1-4=0.05
2-3=0.20
2-4=0.20
3-4=1



Şekil 28: 3. deney seti sütun grafiği LDH % sitotoksitesi



Şekil 29: LDH % sitotoksitesi

- 5 saat hipoksi grubu ile 5 saat hipoksi+2/3/4 saat reoksijenizasyon grupları arasında anlamlı fark vardır (p=0.05, 0.05, 0.05).

- Reoksijenizasyonun 3. saatinde ROS pik yapmaktadır.
- Sonuç olarak diğer verilerde de 15. dk ve 3. saatte pik yapıyordu. Demek ki 15. dk, 3 saatte 2 pik yapıyor. 1, 2 ve 4. saatte ise bazal düzeye yakın takip ediyor.

4. deney seti

Amaç (4. deney seti): 4. Deney setinde amaç optimum yerine PBS kullanılarak kontrol grubuna göre LDH artışını indüklemektir. LDH 'ın 2. deney setinde hipoksi ile birlikte LDH'ın zamana bağlı olarak arttığı görülmektedir. Zamana bağlı benzer artış hipoksi uygulanmayan hücrelerde oluşmaktadır. Yani hiç hipoksi uygulanmasa da zamanla hücre nekrozu ile beraber LDH artışı görülmektedir. Bu ölüm % sitotoksiste olarak 54 saatte % 20' lere yaklaşmaktadır. Bu nedenle hücre ortamının 2 günde bir değiştirilmesi tavsiye edilmektedir. Muhtemelen serumdaki besin maddeleri tükenmekte ve hücre ölümü olmaktadır. Biz deneyimizde kafa karışıklığı yaratmaması açısından ortamı deney başlangıcından sonuna kadar değiştirmedik. Dolayısıyla kontrol grubunda da zamanla artan hücre ölümü oldu. Hem kontrol hem deney grubu için optimum kullanıldığında kontrol grubuna göre hipoksi grubu anlamlı fark oluşturmayınca 4. deney setinde kontrol grubunda optimum, deney grubunda PBS kullandı.

Tablo 31: Kontrol grubunda optimum, deney grubunda PBS kullanılan LDH % sitotoksiste ölçüm sonuçları

2.saat normoksi (optimum)				2 saat hipoksi (PBS)			
Maksimum	Örnek	Boş kuyu	% Sitotoksiste	Maksimum	Örnek	PBS	% Sitotoksiste
1.468	0.140	0.050	2.20	1.625	0.209	0.082	8.29
1.490	0.125	0.049	1.08	1.461	0.184	0.080	7.46
1.523	0.126	0.051	1.13	1.473	0.146		4.66
5 .saat normoksi (optimum)				5 saat hipoksi (PBS)			
Maksimum	Örnek	PBS	% Sitotoksiste	Maksimum	Örnek	Boş kuyu	% Sitotoksiste
1.548	0.153	0.112	2.99	1.285	0.256	0.048	14.53
1.608	0.166	0.108	3.73	1.423	0.209	0.048	9.53
1.452	0.159	0.110	3.65	1.389	0.164	0.050	6.34
8 .saat normoksi (optimum)				8 saat hipoksi (PBS)			
Maksimum	Örnek	Boş kuyu	% Sitotoksiste	Maksimum	Örnek	Boş kuyu	% Sitotoksiste
1.516	0.162	0.050	3.69	1.399	0.195	0.046	8.64
1.604	0.174	0.051	4.28	1.564	0.187	0.051	7.14
1.692	0.161		3.22	1.436	0.188		7.89

2 saat normoksi (op) 1	2 saat hipoksi (pbs) 2
5 saat normoksi (op) 3	5 saat hipoksi (pbs) 4
8 saat normoksi (op) 5	8 saat hipoksi (pbs) 6

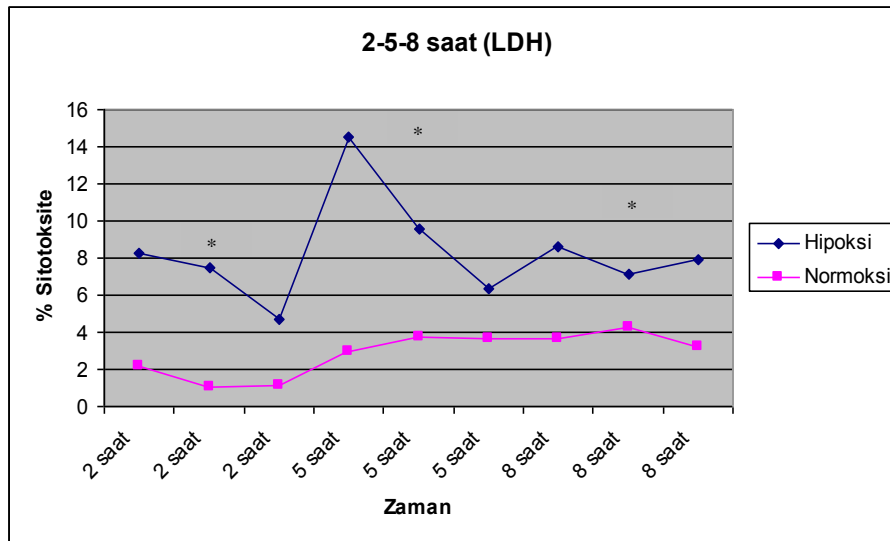
Şekil 30: 4. deney seti akış şeması

Tablo 32: LDH deneyi 4. deney seti verilerinin grup numaralarının isimleri

1: 2 saat normoksi (op)
2: 2 saat hipoksi (pbs)
3: 5 saat normoksi (op)
4: 5 saat hipoksi (pbs)
5: 8 saat normoksi (op)
6: 8 saat hipoksi (pbs)

Tablo 33: LDH deneyi 4. deney seti verilerinin istatistiksel karşılaştırılması (p değeri)

1-2=0.100/0.05	1-3=0.100/0.05	2-4=0.400
3-4=0.100/0.05	1-5=0.100/0.05	2-6=0.700
5-6=0.100/0.05	3-5=0.700	4-6=0.700



Şekil 31: LDH % sitotoksite

2-5-8 saat hipoksi aynı süre normoksiye göre daha yüksek LDH düzeylerine neden olmuştur (p= 0.05, 0.05, 0.05).

Normoksi süresi arttıkça LDH düzeyi yükselmektedir (p= 0.05,.0.05, 0.70)

Hipoksi süresi arttıkça LDH düzeyi yükselmektedir (p=0.42, 0.70, 0.70)

Normoksi süresi ile LDH düzeyi arasındaki korelasyon (p=0.60)

Normoksi süresi ile LDH arasında lineer regresyon arandığında (p=0.49)

Hipoksi süresi ile LDH düzeyi arasındaki korelasyon katsayısı <0.5.

Görüldüğü üzere hipoksik koşul için optimum yerine PBS kullanıldığı zaman LDH artışı olmuştur. Optimum içindeki glikoz hücrenin ölmesini önlemiş, anaerob solunuma belki de imkan tanımıştır. Optimum uzaklaştırılıp PBS kullanılınca ölüm artmış, LDH yükselmiştir.

5. deney seti

Amaç (5. deney seti): 4. deney setinde 5. saatte LDH' ın pik yaptığı görülmüştür. 2,5 ve 8. saatlerdeki LDH düzeyleri kontrol gruplarından daha yüksektir. Biz bunların içinden en yüksek LDH düzeyinin görüldüğü 5. saati alarak EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un bu artmış LDH düzeyini düşürüp düşürmeyeceğini 5. deney setinde test etmeye çalıştık.

Tablo 34: 5. deney seti uygulama plağı dizilimi

EGCG 50 µM Mak.	EGCG 50 µM Örnek	EGCG 100 µM Mak.	EGCG 100 µM Örnek	EGCG 200 µM Mak.	EGCG 200 µM Örnek	EGCG 500 µM Mak.	EGCG 500 µM Örnek	KoQ10 10 µM Mak.	KoQ10 10 µM Örnek	KoQ10 50 µM Mak.	KoQ10 50 µM Örnek
P60 10 ug/ml Mak	P60 10 ug/ml Örnek	P60 50 ug/ml Mak	P60 50 ug/ml Örnek	P60 100 ug/ml Mak	P60 100 ug/ml Örnek	P60 500 ug/ml Mak	P60 500 ug/ml Örnek	KoQ10 100 µM Mak	KoQ10 100 µM Örnek	PBS (madde -) Mak	PBS (madde -) Örnek
EGCG 50 µM Kör		EGCG 100 µM Kör		EGCG 200 µM Kör		EGCG 500 µM Kör					
P60 10 ug/ml Kör		P60 50 ug/ml Kör		P60 100 ug/ml Kör		P60 500 ug/ml Kör			KoQ10 10 µM Kör	KoQ10 50 µM Kör	KoQ10 100 µM Kör

Tablo 35: EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10 ile yapılan 5 saat inkübasyon sonucu LDH % sitotoksosite değerleri

5 saat normoksi (optimum) (optimum körü ortalaması=151) 1			
Maksimum	Örnek	Optimum Körü	% Sitotoksosite
1.266	0.206	0.132	4.93
1.331	0.183	0.171	2.71
1.377	0.186		2.85
1.771	0.182		1.91
5 saat hipoksi (PBS) (PBS körü ortalaması=87) 2			
Maksimum	Örnek	PBS körü	% Sitotoksosite
1.342	0.192	0.087	8.3
1.336	0.988		72
1.185	0.254		15.20
1.114	0.234		14.31
5 saat hipoksi + EGCG (50 µM) 3			
Maksimum	Örnek	50 µM EGCG körü	% Sitotoksosite
2.237	0.510	0.400	5.98
2.308	0.512		5.87
2.477	0.512		5.39
5 saat hipoksi + EGCG (100 µM) 4			
Maksimum	Örnek	100 µM EGCG körü	% Sitotoksosite
2.698	0.727	0.658	3.38
2.611	0.736		3.99
2.542	0.759		5.36
5 saat hipoksi + EGCG (200 µM) 5			
Maksimum	Örnek	200 µM EGCG körü	% Sitotoksosite
3.496	1.282	1.391	-5.17
3.314	1.263		-6.65
3.200	1.296		-5.25
5 saat hipoksi + EGCG (500 µM) 6			
Maksimum	Örnek	500 µM EGCG körü	% Sitotoksosite
6350	3.080	2.245	20.34
7518	2.580		6.35
5540	2.492		7.49
5 saat hipoksi + Polifenon 60 (10 µg/ml) 7			
Maksimum	Örnek	10 µg/ml P 60 körü	% Sitotoksosite
2.049	0.371	1.104	-77
1.831	0.353		-103
1.756	0.485		-94
5 saat hipoksi + Polifenon 60 (50 µg/ml) 8			
Maksimum	Örnek	50 µg/ml P 60 körü	% Sitotoksosite
2.389	0.802	0.848	-2.98
2.123	0.780		-5.3

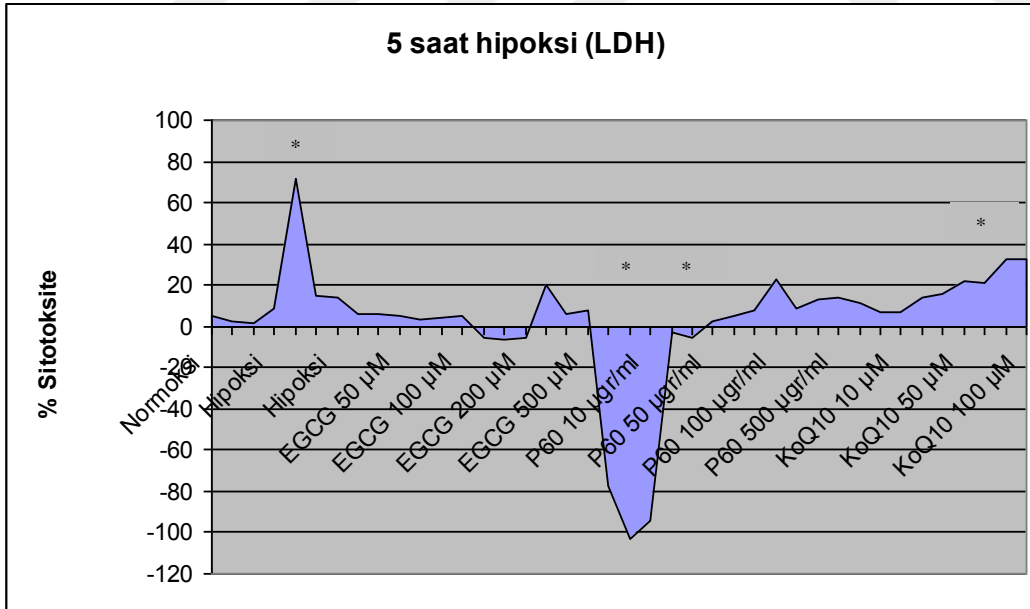
2.308	0.883		2.39
5 saat hipoksi + Polifenon 60 (100 µg/ml) 9			
Maksimum	Örnek	100 µg/ml P 60 körü	% Sitotoksosite
2.362	1.297	1.234	5.13
2.590	1.340		7.81
2.303	1.482		23.19
5 saat hipoksi + Polifenon 60 (500 µg/ml) 10			
Maksimum	Örnek	500 µg/ml P 60 körü	% Sitotoksosite
6.412	3.534	3.254	8.86
7.084	3.948		12.89
6.280	3.670		13.74
5 saat hipoksi + Koenzim Q10 (10 µM) 11			
Maksimum	Örnek	10 µM KoQ10 körü	% Sitotoksosite
1.252	0.199	0.061	11.58
1.388	0.148		6.55
1.448	0.162		7.28
5 saat hipoksi + Koenzim Q10 (50 µM) 12			
Maksimum	Örnek	50 µM KoQ10 körü	% Sitotoksosite
1.211	0.219	0.063	13.58
1.244	0.252		16.00
1.190	0.313		22.18
5 saat hipoksi + Koenzim Q10 (100 µM) 13			
Maksimum	Örnek	100 µM KoQ10 körü	% Sitotoksosite
1.186	0.300	0.067	20.82
1.239	0.445		32.25
1.088	0.399		32.51

Tablo 36: LDH deneyi 5. deney seti verilerinin grup numaralarının isimleri

- 1: 5 saat normoksi (optimem) (optimem körü ortalaması=151)
2: 5 saat hipoksi (PBS) (PBS körü ortalaması=87)
3: 5 saat hipoksi + EGCG (50 µM)
4: 5 saat hipoksi + EGCG (100 µM)
5: 5 saat hipoksi + EGCG (200 µM)
6: 5 saat hipoksi + EGCG (500 µM)
7: 5 saat hipoksi + Polifenon 60 (10 µg/ml)
9: 5 saat hipoksi + Polifenon 60 (50 µg/ml)
10: 5 saat hipoksi + Polifenon 60 (100 µg/ml)
11: 5 saat hipoksi + Polifenon 60 (500 µg/ml)
12: 5 saat hipoksi + Koenzim Q10 (50 µM)
13: 5 saat hipoksi + Koenzim Q10 (100 µM)

Tablo 37: LDH deneyi 5. deney seti verilerinin istatistiksel karşılaştırılması (p değeri)

1-2=0.100/0.05
2-3=0.300
2-4=0.400
2-5=0.400
2-6=0.700
2-7=0.100/0.05
2-8=0.100/0.05
2-9=0.700
2-10=0.700
2-11=0.200
2-12=0.400
2-13=0.100/0.05



Şekil 32: LDH % sitotoksité

- 5 saat hipoksi, 5 saat normoksiye göre LDH düzeyini artırmıştır (p=0.034).

- 50-100-200 μM EGCG, 5 saat hipoksi sonrası artan LDH düzeyini düşürmüştür. ($p=0.05$, $p=0.05$, $p=0.05$).
- 10 ve 50 $\mu\text{g/ml}$ Polifenon 60, 5 saat hipoksi sonrası artan LDH düzeyini anlamlı olarak düşürmüştür ($p=0.031$, 0.05).
- Koenzim Q10 ise düşük dozda (10 μM), istatistiksel anlamlı olmayacak şekilde LDH'ı düşürmüş, yüksek dozda (100 μM) istatistiksel anlamlı olacak şekilde, 5 saat hipoksi sonrası artan LDH düzeyini daha da artırmıştır ($p=0.05$).
- Sonuç olarak, hipoksi anında EGCG ve Polifenon 60 belirli dozlarda LDH'ı düşürerek kalbi korumaktadır. Koenzim Q10' un 100 μM dozu ise LDH'ı artırarak zararlı etki göstermekte, kalp doku nekrozuna neden olmaktadır.



5 Tartışma

Bu teze başlarken amacımız İnsan Koroner Arter Endotel Hücrelerinde (HCAEC) bir hasar modeli oluşturmak ve bu hasardan EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10' un koruyucu etkisi var mı bunu test etmektir. Hasar modeli olarak ROS ölçümünde hipoksi+reoksijenizasyon hasar modeli kullanılmıştır. Çünkü bilindiği üzere tekrar oksijenlenme sırasında O₂' den oluşan serbest radikaller oksidatif stresi artırarak doku hasarı oluşturmaktadır (30). LDH ölçümünde ise hipoksi kullanılmıştır. Çünkü reoksijenizasyon aşamasında ortam değişimine deney izin vermemektedir. LDH süpernatanta salınıyor, ortam değişimi ile birlikte şayet PBS 'i optimum ile değiştirecek olursak o zamana kadar salınmış olan LDH' ı ortamdaki uzaklaştırmış oluyorduk. Ancak aynı ortam idame ettirilerek bu seferde PBS değil kontrol grubunda ve örnek grubunda optimum kullanılarak O₂' den yoksun bırakma ve tekrar oksijenlenme periyotlarını uygulamak mümkün olmuştur. Bu koşulda da yapılan bir deney mevcuttur. Hatta öyle ki; hipoksi modeli tek başına yeterli olmaz düşüncesiyle, bu düşüncemiz de LDH için doğru çıktı. Ayrıca normal %5 serum içeren EGM-2 ortamını da PBS ile değiştirerek aynı zamanda iskemi benzeri model oluşturarak hasarı gözlemleyebilmek dolayısıyla ROS artışını görmek istedik. EGM-2; PBS ile değişince aynı zamanda dokunun beslenmesi bozulacaktı. Çünkü EGM-2' nin içindeki serum doğal olarak PBS' in içinde yoktu. ROS ölçümünde ölçümümüzü direkt hipoksi+iskemi modelinde yaptık ve nihayetinde farklı koşullar denedikten sonra hücrelerde ROS artışı yapan modele ulaştık. LDH deneylerini ise önce yalnızca hipoksi modeli olarak başladık. Ancak kontrol hücrelerinden farklı bir hücre ölümü gözlemlenmedi. Modelimize hipoksiye ek olarak iskemi de eklediğimizde kontrol hücrelerine kıyasla hücre ölümünü görmek mümkün oldu. Dolayısıyla her 2 modelimizle, hasar modeli olarak hem ROS artışını hem hücre nekrozu yapmayı denemelerimiz sonucunda azimle başardık. Geriye kalmıştı, maddelerin koruyuculukları, başka bir deyişle bu maddeler (EGCG, Polifenon 60, Koenzim Q10) artmış ROS' u düşürüp, artmış LDH' ı normale çevirebiliyor muydu? Bu soruya yanıt arandı.

Bu sorumuzda da cevabımız olumlu oldu. EGCG ve Koenzim Q10' un antioksidan etki gösterip ROS 'u düşürdüğünü bulduk. Ayrıca fizyolojik dozda EGCG ve Polifenon 60' da LDH'ı düşürücü etki bulunmuştur.

Teze başlama amacımızı düşünürsek yerinde sorular seçip alt yapımızı kurduktan sonra çeşitli koşulları deneyerek hem hasar modelini oluşturmada başarılı olduk, hem de maddelerde

hasardan koruyuculuk çıktı. Maddelerimizi seçerken anti-oksidan özellikte maddeler olmasına dikkat etmiştik. Kalanı bir bilinmeyene ışık tutmaktı bizim için.

Peki neden koroner arter endotel hücrelerini seçtik de başka bir hücre tipini seçmedik? Çünkü insan vücudunda en fazla hipoksiye maruz kalan kalp dokusudur. Bu da koroner arterleri trombosit kümelerinin, veya aterom plakların, tam veya kısmi olarak tıkanmasına bağlı olarak, koroner arterden kan akımının kesilmesine bağlı olarak oluşur. Bildiğimiz adıyla kalp krizi. Bizim yapmaya çalıştığımız; in vitro olarak kalp krizini dışarıdan ticari olarak alınan, kültür kaplarında büyütülen İnsan Koroner Arter Endotel Hücrelerinde (HCAEC) taklit etmektir. Aldığımız olumlu sonuçlara bakılırsa deney planının alt yapısı iyi kurulmuştu.

Çalışma sırasında ne gibi zorluklarla karşılaştık? Karşımıza çıkan en büyük sorun hücrelerin enfeksiyon kapmasıydı. Her ne kadar hijyen koşullarına dikkat ederek steril ortamlarda çalışılsa da enfeksiyondan kaçınmak mümkün olmadı. Belki çok çok deneyler daha planlayacaktık ama proje bütçesi bu kadarını imkanı kıldı. Tezimiz de kendi içinde bir bütün oluşturarak kafa karıştırıcı etmenlerden uzaktır. Diğer bir sorun hasar modelinin oturtulmasında yaşandı. Biz de farklı süreler ve farklı ortamlar deneyerek bu sorunları aştık. Biz buna her ne kadar bizi zorlasa da deneyin optimizasyonu diyoruz ve sorun olarak görmüyoruz. Bahsi geçenler dışında önemli bir sorun yaşanmadı.

Kendi bulgularımız birbirini destekliyor mu? Deneyimizin mantık örüntüsü içinde beklenmeyen bir durum biz bu maddeleri anti-oksidan olarak seçmiştik. Oysa EGCG' nin yüksek dozlarında ve Polifenon 60' da özellikle bekleme ile artan oksidan etki görüldü. Koenzim Q10' da böyle bir durum oluşmadı. Yani EGCG hem anti-oksidan hem yüksek dozda istatistiksel önemde olmayan oksidan, Polifenon 60 oksidan, Koenzim Q10 ise yalnızca anti-oksidan özellik gösteriyordu. Daha sonra geniş kapsamlı literatür taraması yapıldığında yeniden oksijenlenme sırasında pH'ın alkaliye kaymasıyla yeşil çayın oto-okside olduğu ve oksidan özelliğinin ortaya çıktığını belirten makalelere rastlandı (31,32). EGCG ve Polifenon 60 hücre nekrozunu önliyordu. KoenzimQ10' da böyle bir etkiye raslanmadı. Aksine yüksek dozları (100 µM) hücre nekrozu yapıyordu. Bulgular birbiri ile uyumluydu. Hasar oluşturunca ROS arttı ve hücre nekrozu oldu. Maddelerin hasar üzerine etkileri de bilinmeyeni arama yolunda ayrı ayrı değerlendirildi.

Başkaları ne buldu biz ne bulduk? Bir çok makale yeşil çay (33,34) ve Koenzim Q10'un anti-oksidan özelliği (35) üzerinde durmaktaydı. Raza ve John' un çalışmasında, EGCG'ye 16 saat

maruz bırakılarak, ROS düzeyleri ölçülüyor (total ekstrakt-postmitokondriyal fraksiyon-mitokondriyal fraksiyon). Sonuç olarak ROS düzeylerinin total ekstrakta değil mitokondriyal fraksiyonda EGCG' ye bağlı olarak azaldığını buluyorlar (36). Biz deneylerimiz sonucunda özellikle Polifenon 60' da ön plana çıkan pro-oksidan özelliği gözlemledik. Sonra çok daha detaylı tarama yaptığımızda çok daha az sayıda da olsa yeşil çayın prooksidan özelliğinden bahsediliyordu (37). Koenzim Q 10 eksikliğinde ise 10-15% ve >60% olan Koenzim Q10 eksikliği ROS değişimine neden olmazken; 30-50% Koenzim Q 10 eksikliği ROS artışı ile paralel bulunmuş (38). Yani koenzim Q10 antioksidan etkisiyle ön plana çıkmaktadır.

Her ne kadar yeşil çay antikanserojen olarak bilinse de, yani kanser hücrelerinde hücre canlılığını azaltıyor. Yeşil çay normal hücrelerde hücre canlılığını artırırken, kanser hücrelerinde hücre canlılığını azaltmaktadır. Polifenon 60 hücre nekrozunu azaltıyorsa peki kansere yol açar mı? Bu da normal hücre sayısına kadar artırıp düşüğü normale getiriyor ancak kansere yol açmıyormuş. Biz deneylerimizde mikroskop altında böyle malign değişimler görmedik. Singh ve arkadaşları; EGCG' nin B-katenin yolunu kullanarak hücre canlılığı proteinlerini inhibe ettiğinden bahsedilmektedir. B-katenin siRNA ile knockout edildiğinde hücre canlılığı artmaktaymış (39). Hipoksik hasar ile artan LDH düzeyleri yeşil çay ile azalmaktadır. LDH da bildiğimiz gibi hücre nekroza uğrayınca artıyor. Bir çalışmada da sıçan kardiyomyosit kültüründe hipoksi-reoksijenizasyon uygulanıyor. Yeşil çay 24 saat preenkübasyon+ 2-8 saat hipoksi süresince enkübasyon olarak uygulanıyor. LDH salınımı yeşil çayın dozuna bağımlı olarak azalıyor. 5, 10, 25, 50 µg/ml değerlerinde yeşil çay kullanılmış. Onlarda serumlu ortamda hücre nekrozu oluşturamamışlar. Serumdan yoksun bıraktıklarında nekroz oluşmuş. LDH artışı hipoksi süresiyle lineer ilişki gösteriyormuş. Reoksijenizasyon ilave LDH artışına neden olmuyormuş. Sadece önlem olarak değil iskemi anında da hipoksik hasarı önlemek için kullanılabilir olduğundan bahsedilmektedir. Bizim tezimizle en fazla örtüşen çalışma olarak Bordoni ve arkadaşlarının çalışmasını gösterebiliriz (40). Bizimkinde hipoksi-iskemi modeli uygulanmıştı. Hipoksi ile birlikte LDH' da lineer artış yaşandı. Biz de özellikle 10 µg/ml yeşil çay inkübasyonunda daha az olarak da 50 µg/ml yeşil çay da LDH da azalma bulduk. Yeşil çayın inkübasyon süresi 5 saat, eş zamanlı inkübasyon olarak uygulandı. Hipoksi-reoksijenizasyon ile sınırlı sayıda örnekte LDH artışı oldu ve en önemlisi hasar anında etkiliydi. Hasar modelinde hasar tipi ile yeşil çay eş zamanlı uygulandı. Bir başka renal epitel hücre kültüründe yapılan çalışmada da hipoksiye maruz kalan hücrelerden LDH salınımı artıyor. Yeşil çay bu salınımı inhibe ediyor (41). Koenzim

Q10' da (hipoksi+iskemi) hasarında hücre nekrozunda azalma bulamadık. Bilakis yüksek dozu (100 µM) hücre nekrozunu artırıyordu.

Yesil çay kardiyoprotektif bir çok özelliğe sahiptir: Anti-oksidan özelliğinin yanı sıra, metal iyon selatlayıcısı, PAF (platelet aktive edici faktör) ve ADP inhibisyonu, PDGF beta reseptör inhibisyonu, damar gevsetici, tromboksan inhibisyonu, SOD (süperoksit dismutaz) artırılması, eNOs indüklenmesi, LDL ve VLDL oksidasyonunun azaltılması gibi baska olumlu etkileri de mevcuttur (42). Biz de yeşil çayın hem anti-oksidan özelliğini, hem (hipoksi+iskemi) hasarı sonrası hücre canlılığını artırması yönüyle kardiyoprotektif özellikte olduğunu kanıtladık.

Koenzim Q10' un ise kalp yetmezliği, kardiyomyopati, anjiopektorisde kullanımından bahsediyor. ATP üretimi, antioksidan ve membran stabilize edici etkisi (+).LDL yapısında bulunarak oksidasyonunu azaltıyor. Hafif GİS yan etkisi var ve SGOT ve LDH' ı artırıyor (42). Biz de koenzim Q10'un antioksidan etkisini ve (hipoksi+iskemi) hasarına ek olarak LDH'ı artırdığını bulduk. Yeşil çay ve koenzim Q10 için bulduğumuz uygunsuzluk polifenon 60' da daha çok olmak üzere uzun süre inkübasyonda yüksek dozda artan oksidan etki, ve koenzim Q10'da yüksek dozda oluşan hücre nekrozuydu. Bu özellikler de gerek kardiyomyopatide gerekse miyokard enfaktüsü sonrası doku alanında oluşan debrisin makrofajlar tarafından ortadan kaldırılmasında olumlu etki gösterebilir.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

In vitro hipoksi+ iskemi modelinde; fizyolojik dozda EGCG (200 µM) ve Koenzim Q10'un (10 µM) hücreleri oksidan hasardan koruduğu, gene fizyolojik dozda EGCG (200 µM) ve Polifenon 60'ın (10-50 µg/ml) hücre nekrozunu önlediği bulunmuştur.

- EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10; insan koroner arter endotel hücrelerini; in vitro ortamda hipoksi-reoksijenizasyon ile oluşturulan, ROS hasarından korumaktadır.
- EGCG, Polifenon 60 ve Koenzim Q10; insan koroner arter endotel hücrelerini; in vitro ortamda hipoksi-reoksijenizasyon ve hipoksi ile oluşturulan hücre nekrozundan korumaktadır.

Konuya başlarken belirlediğimiz 2 hipotezimiz doğrulanmıştır.

Myocard infarktüsünün deneysel bir modeli olan çalışmamızda EGCG ve Polifenon 60 ve Koenzim Q10 tedavide kullanılabilir. EGCG; 300 µL, Polifenon 60; 200 µL, Koenzim Q10; 100 µL... içinde olacak durumda ilaç dozu belirlenebilir. EGCG 8 saattebir, Polifenon 60 12 saattebir, Koenzim Q10 24 saattebir alınabilir. EGCG 1.5 gün, Polifenon 60 3.5 gün alınıp bir doz atlanıp 2 doz daha alınacak, Koenzim Q 10, 7 gün alınıp 1 gün arayla tek doz alınıp, tek dozla bitirilecek. Bu kalp krizinin tedavisidir. Sıkışma sonrası kalbe kan gittikten sonra uygulanır.

Emeği geçenlere saygılarımla

7 KAYNAKLAR

1. Kuriyama S. Green Tea Consumption and Prevention of Coronary Artery Disease. *Circulation Journal* 2010;74(2):248-9.
2. Tinahones FJ, Rubio MA, Garrido-Sanchez L, Ruiz C, Gordillo E, Cabrerizo L, Cardona F. Green Tea Reduces LDL Oxidability and Improves Vascular Function. *Journal of the American College of Nutrition* 2008;27(2):209-13.
3. Panagiotakos DB, Lionis C, Zeimbekis A, Gelastopoulou K, Papairakleous N, Das UN, Polychronopoulos E. Long-Term Tea Intake is Associated with Reduced Prevalence of (Type 2) Diabetes Mellitus among Elderly People from Mediterranean Islands: MEDIS Epidemiological Study. *Yonsei Med J* 2009;50(1):31-8.
4. Boschmann M, Thielecke F. The Effects of Epigallocatechin-3-Gallate on Thermogenesis and Fat Oxidation in Obese Men: A Pilot Study. *Journal of the American College of Nutrition*. 2007;26(4):389-95.
5. Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. The Major Green Tea Polyphenol, (-)-Epigallocatechin-3-Gallate, Inhibits Obesity, Metabolic Syndrome, and Fatty Liver Disease in High-Fat-Fed Mice. *J Nutr* 2008;138(9):1677-83.
6. Tiano L, Belardinelli R, Carnevali P, Principi F, Seddaiu G, Littarru GP. Effect of coenzyme Q10 administration on endothelial function and extracellular superoxide dismutase in patients with ischaemic heart disease: a double-blind, randomized controlled study. *European Heart Journal* 2007;28:2249-55.
7. Chacko SM, Thambi PT, Kuttan R, Nishigaki I. Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chinese Medicine* 2010;5:13-22.
8. Henning SM, Aronson W, Niu Y, Conde F, Lee NH, Seram NP, Lee RP, Lu J, Haris DM, Moro A, Hong J, Pak-Shan L, Barnard RJ, Ziaee HG, Csathy G, Go VLW, Wang H, Heber D. Tea Polyphenols and Theaflavins Are Present in Prostate Tissue of Humans and Mice after Green and Black Tea Consumption. *The Journal of nutrition* 2006;136:1839-43.
9. Augustin K, Frank J, Augustin S, Langguth P, Ohrvik V, Witthoft CM, Rimbach G, Wolfram S. Green Tea Extracts Lower Serum Folates In Rats At Very High Dietary Concentrations Only And Do Not Affect Plasma Folates In A Human Pilot Study. *Journal of Physiology And Pharmacology* 2009;60(3):103-8.
10. Quinzii CM, DiMauro S, Hirano M. Human Coenzyme Q₁₀ Deficiency. *Neurochem Res.* 2007;32(4-5):723-7.

11. Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS. Pharmacokinetics of Tea Catechins after Ingestion of Green Tea and (-)-Epigallocatechin-3-gallate by Humans: Formation of Different Metabolites and Individual Variability. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2002;1025-32.
12. Yang CS, Chen L, Lee MJ, Balentine D, Kuo MC, Schantz SP. Blood and Urine Levels of Tea Catechins after Ingestion of Different Amounts of Green Tea by Human Volunteers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1998;7:351-4.
13. Tomono Y, Hasegawa J, Seki T, Motegi K, Morishita N. Pharmacokinetic study of deuterium-labelled coenzyme Q10 in man. *Int. J. Clin. Pharmacol. Toxicol. Ther.* 1986;24(10):536-41.
14. Onakpoya I, Spencer E, Heneghan C, Thompson M. The effect of green tea on blood pressure and lipid profile: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. Accepted 22.Ocak.2014.xx
15. Song DK, Jang Y, Kim JH, Chun KJ, Lee D, Xu Z. Polyphenol (-)-Epigallocatechin Gallate during Ischemia Limits Infarct Size Via Mitochondrial KATP Channel Activation in Isolated Rat Hearts. *J Korean Med Sci* 2010;25:380-6.
16. Brown AL, Lane J, Coverly J, Stocks J, Jackson S, Stephen A, Bluck L, Coward A, Hendrickx H. Effects of dietary supplementation with the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on insulin resistance and associated metabolic risk factors: randomized controlled trial. *Br J Nutr*. 2009;101(6):886-94.
17. Batista GAP, Pereira da Cunha PCL, Scartezini M, Heyde R, Bitencourt MG, Melo SF. Prospective Double-Blind Crossover Study of *Camellia Sinensis* (Green Tea) in Dyslipidemias. *Arq Bras Cardiol* 2009;93(2):121-7.
18. Boschmann M, Thielecke F. The Effects of Epigallocatechin-3-Gallate on Thermogenesis and Fat Oxidation in Obese Men: A Pilot Study. *Journal of the American College of Nutrition* 2007;26(4):389-95.
19. Kumamoto M, Sonda T. Evaluation of the Antioxidative Activity of Tea by an Oxygen Electrode Method. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 1998;62(1):175-7.
20. Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. *PloS One* 2010;5(4):10202.

21. Sagara Y, Miyata Y, Nomata, Hayashi T, Kanetake H. Green tea polyphenol suppresses tumor invasion and angiogenesis in N-butyl-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced bladder cancer. *Cancer Epidemiology* 2010;34(3):350-4.
22. Kushima Y, Iida K, Nagaoka Y, Kawaratani Y, Shirahama T, Sakaguchi M, Baba K, Hara Y, Uesato S. Inhibitory Effect of (–)-Epigallocatechin and (–)-Epigallocatechin Gallate against Heregulin b 1-Induced Migration/Invasion of the MCF-7 Breast Carcinoma Cell Line. *Biol. Pharm. Bull.* 2009;32(5) 899-904.
23. Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Yasuda Y, Kubota M, Adachi S, Tsurumi H, Hara Y, Moriwaki H. (–)-Epigallocatechin gallate inhibits growth and activation of the VEGF/VEGFR axis in human colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2010;185(3):247-52.
24. Shimizu K, Shimizu NK, Hakamata W, Unno K, Asai T, Oku N. Preventive Effect of Green Tea Catechins on Experimental Tumor Metastasis in Senescence-Accelerated Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2010;33(1):117-21.
25. Young AJ, Johnson S, Steffens DC, Doraiswamy PM. Coenzyme Q10: A Review of Its Promise as a Neuroprotectant. *CNS Spectr.* 2007;12(1):62-8.
26. Dimauro S, Hirano M. Mitochondrial DNA Deletion Syndromes. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.2011.
27. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2002;34:1508-12.
28. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp36103.pdf>
29. http://www.roche-applied-science.com/proddata/gpip/3_5_3_21_2_3.html
30. Chappey O, Wautier MP, Wautier J-L. Endothelial cells in culture: a model to study in vitro vascular toxicity. *Toxicology in Vitro* 1995;9(4):411-9.
31. Galati G, Lin A, Sultan AM, O'Brien PJ. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic Biol Med.* 2006;40:570-80.
32. Severino JF, Goodman BA, Kay CWM, Stolze K, Tunega D, Reichenauer TG, Pirker KF. Free radicals generated during oxidation of green tea polyphenols: electron paramagnetic resonance spectroscopy combined with density functional theory calculations. *Free Radical Biology and Medicine.* 2009;46(8):1076-88.
33. Coyle CH, Philips BJ, Morrisroe SN, Chancellor MB, Yoshimura N. Antioxidant Effects of Green Tea and Its Polyphenols on Bladder Cells. *Life Sci.* 2008;83(1-2):12-8.

34. Pagnotta E, Calonghi N, Hrelia S, Masotti L, Biagi P, Angeloni C. Green tea protects cytoskeleton from oxidative injury in cardiomyocytes. *J Agric Food Chem.* 27;54(26):10159-63.
35. Littarru GP, Tiano L. Clinical aspects of coenzyme Q10: an update. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005; 8(6): 641-6.
36. Raza H, John A. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallat differentially modulates oxidative stress in PC12 cell compartments. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;207:212-20.
37. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicology in Vitro* 2004;18(5): 555-61.
38. Quinzii CM, López LC, Gilkerson RW, Dorado B, Coku J, Naini AB, Lagier-Tourenne C, Schuelke M, Salviati L, Carrozzo R, Santorelli F, Rahman S, Tazir M, Koenig M, Dimauro S, Hirano M. Reactive oxygen species, oxidative stress, and cell death correlate with level of CoQ10 deficiency. *FASEB J.* 2010;24(10):3733-43.
39. Singh T, Katiyar SK. Green tea polyphenol, (–)-epigallocatechin-3-gallate, induces toxicity in human skin cancer cells by targeting β -catenin signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2013;273(2):418-24.
40. Bordoni A, Hrelia S, Angeloni C, Giordano E, Guarnieri C, Caldarera CM, Biagi PL. Green tea protection of hypoxia/reoxygenation injury in cultured cardiac cells. *J Nutr Biochem.* 2002;13(2):103-11.
41. Yokozawa T, Dong E, Chung HY, Oura H, Nakagawa H. Inhibitory effect of green tea on injury to a cultured renal epithelial cell line, LLC-PK1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997;61(1):204-6.
42. Sumpio BE, Cordova AC, MD, DavidW, Qin F, Chen QH. Green Tea, the Asian Paradox,, and Cardiovascular Disease. 2006; 202(5): 813-25.
43. Singh RB, Niaz MA, Rastogi V, Rastogi SS. Coenzyme Q in cardiovascular disease. *J Assoc Physicians India.* 1998;46(3):299-306.

8 ETİK KURUL BELGESİ

		
T.C. DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI		
Tel : 0 232 - 259 87 73 - 259 87 74	Fax : 0 232 - 259 05 41	İnciraltı 35340-İzmir
Sayı : B.30.2,DEÜ.0.01.00.00 / 9858		
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE		
Fakültemiz Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Başkanlığının 27 Temmuz 2006 tarih 190 sayılı yazısıyla Dekanlığımıza iletilen 177 Protokol numaralı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Gül GÜNER'in sorumlu olduğu "in vitro hipoksi-reperfüzyon ile indüklenen insan koroner arter endotel hücre hasarına yeşil çay bileşenlerinden (epigallocateşin-3-galat ve polifenon 60)'ın ve koenzim Q10'un olası koruyucu etkisinin incelenmesi" isimli proje ile ilgili Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Kararı ve sonuç ek'te sunulmuştur.		
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.		
Ek: 1 adet kurul kararı		
Prof. Dr. Gül GÜNER Dekan Vekili		



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
Tarih ve Sayı: 28.07.2006/190

Etik Kurul Üyeleri

İf. Dr. Taner ÇAMSARI
İf. Dr. Cem Şeref BEDİZ
İf. Dr. Uğur MÜNGAN
İf. Dr. Hüseyin İŞLEKELİ
İf. Dr. Arzu SAYINER
İf. Dr. Özgül SAGOL
İf. Dr. Göksel YENER
İf. Dr. Mustafa SEÇİL
İf. Doç. Dr. Deniz ERDAL
İf. Dr. KARSU

Etik Kurul Başkanı

İf. Dr. Taner ÇAMSARI

Etik Kurul Sekreteri
Hatice İGCI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 27 Temmuz 2006 tarih ve 11/16/2006 no.lu toplantısında, 177 Protokol numaralı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Gül GÜNER'in sorumlu olduğu "in vitro hipoksi-reperfüzyon ile indüklenen insan koroner arter endotel hücre hasarına yeşil çay bileşenlerinden (epigallocateşin-3-galat ve polifenon 60)'ın ve koenzim Q10'un olası koruyucu etkisinin incelenmesi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Taner Çamsarı
Prof. Dr.Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

11 TEZDEN TÜREYEN YAYINLAR

- Sözlü bildiri (9th Young Scientist Forum and 34th FEBS Congress: Life's Molecular Interactions, 4-9.July.2009 Czech Republic, Prague). Yazici P, Sayin O, Guner-Akdogan G. Antioxidant effects of green tea and coenzyme Q10 in coronary artery endothelial cells. FEBS Journal 395:276(1);2009 (özet)
- Bildiri (XXI. Ulusal Biyokimya Kongresi; 28-31.Ekim.2009; Askeri Müze ve Kültür Sitesi, İstanbul). Yazici P, Guner G. Yeşil Çay ve Koenzim Q'un İnsan Koroner Arter Endotel Hücresi Hasarına Koruyucu Etkisi. Türk Biyokimya Dergisi 74-5:34(özel sayı);2009 (özet)
- Bildiri (XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi; 27-30. Ekim.2011; Anemon Otel, Eskişehir) Yazici P, Guner-Akdogan G. Epigallocateşin Galatın Antioksidan ve Prooksidan, Polifenon 60'ın Prooksidan, Koenzim Q10'un Antioksidan Etkisi. Türk Biyokimya Dergisi 35(özel sayı);2010. P-088 (özet)
- Bildiri (XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi; 27-30. Ekim.2011; Anemon Otel, Eskişehir) Yazici P. Reoksijenizasyon süresinin uzatılması reaktif oksijen radikali düzeyi artışı ile paraleldir. Türk Biyokimya Dergisi 35(özel sayı);2010. P-086 (özet)



Young Scientist Forum

Labyrinth of Cells and Molecules

Prague – July 2 – 4, 2008

34th FEBS Congress

Life's Molecular Interactions
July 4 - 9, 2009, Prague, Czech Republic

energy-dissipating system. The activity of this system, thereby the efficiency of oxidative phosphorylation, is regulated by guanosine and adenosine 5-phosphates in a different way.

Methods: Oxygen consumption and membrane potential of isolated *A. castellani* mitochondria were measured simultaneously using electrodes sensitive to oxygen and TPP⁺ ions.

Results: We found that guanosine nucleotides activate AcAOX to a greater degree than adenosine nucleotides do, and that nucleotides monophosphates were the most efficient. The extent of the nucleotides influence on AcAOX depend on the assay pH being more pronounced at pH 6.8, which is optimal for the enzyme activity. We demonstrate, for the first time, that ATP has an opposite, inhibitory effect on AcAOX activity. Since the inhibition by ATP was also observed in other protozoan, *Dictyostelium discoideum* and yeast, *Candida maltosa* mitochondria, it could be a common regulatory feature of all non-plant AOXs that use purine nucleotide-modulated. Kinetic data show that the binding of GMP (a positive allosteric effector) and ATP (a negative allosteric effector) to AcAOX is mutually exclusive.

Conclusions: Our findings suggest that AcAOX activity in *A. castellani* mitochondria might be controlled by the relative intracellular concentrations of purine nucleotides, in particular by the concentration of ATP relative to that of guanosine nucleotides.

YSF-112

Ecm1 is a new pre-60S ribosomal subunit export factor

Y. Yao¹, E. Demeinier¹, C. Savasani¹, P. Lemerand², G. Lachlès² and A. Jacquier¹

¹Genome et Génétique, Institut Pasteur, Paris, FRANCE

²Plasme-forme Protéomique, Institut Pasteur, Paris, FRANCE

³Département Antibiotiques et Antimicrobiens, Université Montpellier II, Montpellier, FRANCE

In eukaryotes, ribosomal biogenesis is a highly conserved process that takes place in the nucleus and the cytoplasm. In actively growing cells, like yeast, it was estimated that each NPC (Nuclear Pore Complex) contributes to the export of around 25 pre-ribosomal particles per min. Such an extremely active process depends on several redundant export receptors for the pre-60S particles (Crm1/Nop53, Mtr2/Mtr57, Axl1). We identified a novel pre-60S factor, Ecm1 partially redundant with Axl1 and which becomes essential when the NPC is compromised. Ecm1 depletion, combined with the deletion of any of a number of NPC components leads to pre-60S retention in the nucleus. The functional links between Ecm1, 60S biogenesis, pre-60S export and the NPC were correlated with physical interactions of Ecm1 with pre-60S particles and nucleoporins (Nop100 and Nop192). Our results point Ecm1 as an additional pre-60S nuclear export receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. Multiple pre-ribosomal nuclear export receptors including Axl1 and Ecm1 are thus responsible for efficient pre-60S nucleocytoplasmic transport.

YSF-113

Antioxidant effect of green tea and coenzyme Q10 in human coronary artery endothelial cells

P. Vural¹, O. Sayin¹ and G. Gunes-Akdogan²

¹School of Medicine Research Laboratory, Dokuz Eylul University Biochemistry, Izmir, TURKEY, ²School of Medicine Biochemistry Department, Dokuz Eylul University Biochemistry, Izmir, TURKEY

Background: Hypoxia-reoxygenation of the human coronary artery endothelial cells is the most frequently encountered injury in many pathologies of the heart, including myocardial infarct.

Reoxygenation of the tissue causes the formation of reactive oxygen species (ROS), a source of injury. Epigallocatechin gallate (EGCG) is the most abundant (80%) component of the green tea, showing antioxidant effect through its galloyl group. Polyphenon 60 is the combination of green tea polyphenolic compounds which is minimum 80% of total catechins. Green tea (EGCG) and polyphenon 60 and coenzyme Q10 are known by their antioxidant properties.

Objectives: We investigated if these compounds can prevent the damage of human endothelial coronary artery cells (HCAEC) by decreasing ROS in an *in vitro* hypoxia-reoxygenation model.

Methods: HCAEC (Cambrex) were cultured in a seeding density of 10,000 cells/well and four samples were used for each condition tested. Experiments were performed in duplicate. HCAEC were preincubated with EGCG (50, 100, 200 µM), polyphenon 60 (50, 100, 500 µg/ml) or coenzyme Q10 (5,10, 50 µM) for 24 hours and then exposed to 24 hours (hypoxia + glucose deprivation + incubation) followed by 15 minutes-reoxygenation. After preincubation, we used a hypoxic chamber for forming the hypoxic conditions and used PBS with EGCG, polyphenon 60 or coenzyme Q10 (hypoxia + glucose deprivation + incubation) and then let the cells reoxygenate with Endothelial Growth Media (EGM-2) in a CO₂ incubator. We then measured the reactive oxygen species (ROS) fluorescently: a non-fluorescent hydroxyphenyl fluorescein (HPPF) probe become fluorescent in the presence of ROS. Fluorescence excitation and emission maxima are 490 and 515 nm, respectively.

Results: When optimizing the time that caused ROS to increase, we showed that whenever reoxygenation period was extended from 1 to 4 hours, ROS increased ($P = 0.029$) and from 4 to 18 hours, again, ROS increased ($P = 0.029$). 24 hours hypoxia-15 minutes reoxygenation and 24 hours hypoxia-3 hours reoxygenation caused ROS to increase compared with the control groups ($P = 0.029$, $P = 0.029$) but 24 hours hypoxia-1 hour reoxygenation didn't change the ROS levels ($P > 0.05$). The concentrations of EGCG and polyphenon 60 tested didn't cause ROS to decrease ($P > 0.05$). On the other hand, coenzyme Q10, at dose of 5 µM, decreased the ROS according to the 24 hour hypoxia-15 minutes reoxygenation condition ($P = 0.029$).

Conclusions: 5 µM coenzyme Q10 is effective in decreasing the ROS production of HCAEC in the *in vitro* hypoxia-reoxygenation model used.

YSF-114

Comprehensive conformational analysis of canonical and modified nucleosides as a key to mechanisms of their biological influence: ab initio study

Y. Yarnik¹, R. Znamensky¹, S. Samojlik¹, M. Glensk² and D. Horvath²

¹Molecular and Quantum Biophysics, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kiev, UKRAINE

²BioMedCell UMR CNRS 5035, Université Pierre et Marie Curie at Université Paris Nord, Paris, FRANCE

The aim of this work was to present a comprehensive investigation of structural and vibrational properties of some nucleosides (canonical, minor and modified) by ab initio calculations. The obtained results demonstrate a wide scope of conformational flexibility of nucleosides corresponding to a narrow range of energy (7–10 kcal/mol). Slightly less than one hundred conformers of deoxyribonucleosides are stabilized by some hundred intramolecular H-bonds of various types, i.e. from the strongest (OH...O), to the weakest ones (involving CH groups). It was shown that at 298.15 K, all of the studied nucleosides are characterized by quasi-degenerate global minima on the Gibbs energy



TÜRK BİYOKİMYA DERGİSİ

Turkish Journal of Biochemistry

Turk J Bioch

CİLT
[VOLUME]
34

SAYI
[NUMBER]
ÖZEL SAYI 1
SPECIAL ISSUE 1

YIL
[YEAR]
2009

e-ISSN 1303-829X p-ISSN 0250-4685
http://www.turkjbiochem.com

Üç ayda bir yayınlanır. Hakemli, Açık Erişim (Open Access) bir dergidir.
Özel sayılar dışındaki tüm sayılar sadece elektronik olarak yayınlanır

[Peer reviewed open access journal, published quarterly.
This Journal is published only on-line with the exception of the special issues.]

Yayın tarihleri: Mart-Haziran-Eylül-Aralık

[Publication dates: March, June, September, December]

SAHİBİ ve YAZI İŞLERİ MÜDÜRÜ
[OWNED and PUBLISHED BY]

Nazmi Özer
naozer@hacettepe.edu.tr

BAŞ EDITÖR
[EDITOR-in-CHIEF]

Yahya Laleli
editor@turkjbiochem.com

YARDIMCI EDITÖRLER
[ASSOCIATE EDITORS]

N. Leyla Açan
nla@hacettepe.edu.tr
A. Kevser Pişkin Özden
kpiskin@hacettepe.edu.tr
Ergun Karaağaoğlu
ekaraaga@hacettepe.edu.tr

TEKNİK EDITÖRLER
[TECHNICAL EDITORS]

Ebru Bodur
bodurebru@yahoo.com
Özlem Dalmızrak
ozlemdalmizrak@gmail.com
Elvan Laleli-Şahin
elvan@duzen.com.tr
Samiye Yabancıoğlu
samiye@hacettepe.edu.tr
Selçuk Tunalı
tunalı@hacettepe.edu.tr
Aylin Sepici Dinçel
asepici@gazi.edu.tr

İDARİ SEKRETER
[MANAGING SECRETARY]

Nermin Şahan
submission@turkjbiochem.com

YER ALDIĞI İNDEKSLER
[INDEXED BY]

SCI Expanded, Journal Citation Reports/Science Edition,
Chemical Abstracts, Directory of Open Access Journals,
Index Copernicus, Embase, Scopus, Ulakbim Türk Tıp Dizini

BİLİMSEL DANIŞMA KURULU
[SCIENTIFIC ADVISORY BOARD]

Nilgün Altan (TR)
Pika Mesko Brguljan (SI)
Anyła Buló-Kasneći (AL)
Manole Cojocarú (RO)
Orhan Deęer (TR)
Guy Dirheimer (FR)
Miral Dizdaroglu (US)
Mustafa B.A. Djamgoz (UK)
Georgy D. Efremov (MK)
Michael Eichelbaum (DE)
M. Kemal Erbil (TR)
Joan Guinovart (ES)
Gökhan Hotamışgil (US)
Ivan G. Ivanov (BG)
A. Ergun Karaağaoğlu (TR)
Michael Karin (US)
Levent Kayrı (TR)
Nada Majkic-Singh (RS)
I. Hamdi Ögüş (TR)
İnci Özer (TR)
Israel Pecht (IL)
Danica Popovic-Pribilovic (ME)
Mihail Radu (RO)
George Russev (BG)
Fahri Saatçioğlu (NO)
Aziz Sancar (US)
Konstantin Seferiadis (GR)
Engin H. Serpersu (US)
Arzu Seven (TR)
Emin Sofie (BA)
Ana Stavljenic-Rukavina (HR)
Claudiu Supuran (IT)
Adam Szweczyk (PL)
Bolkan Şimşek (TR)
Azmi Telefoncu (TR)
Orestes Tsolas (GR)
Kamen Tzatchev (BG)
Frank Vella (CA)
Donald Wiebe (US)
Doğan Yücel (TR)

YAZIŞMA ADRESİ
[CORRESPONDENCE]

Türk Biyokimya Dergisi, Hırfanlı Sokak 9/3
Gaziosmanpaşa 06700 Ankara
Tel: +90-312-447 09 97 - 437 98 19

Değişik Dozlarda Etanol ve Aspirinin Birlikte Kullanımının Rat Beyin Sinaptozomları Üzerine Olan İn Vitro Etkisi ve Betainin Olası Koruyucu Rolünün Araştırılması

İbrahim SÖĞÜT*, Güngör KANBAK

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı

**email: İbrahim.sogut@gmail.com*

Bu çalışmada, değişik dozlarda etanol ve aspirinin birlikte kullanımının rat beyin sinaptozomları üzerine olan in vitro etkisi ve betainin olası koruyucu yolu araştırıldı. Bu amaçla yirmi bir adet Sprague Dawley cinsi erkek albino rat dekapite edilerek öldürüldü. Frontal korteksleri (ön beyin) alındıktan sonra her ön beyin dört parçaya bölündü. Bu doku örneklerinden dört grup oluşturuldu ve her bir grup altı adet ön beyin parçası içeriyordu (n=6). Sinaptozomal fraksiyonlar ön beyin parçalarının homojenizasyon ve santrifüj aşamaları sonrasında elde edildi. Etanol (50, 100, 200mM), aspirin (100µg/ml) ve betainin (0,5, 1mM) varlığında inkübe edilen sinaptozomal fraksiyonlarda siyalik asit (SA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri ile adenosin deaminaz (ADA) aktiviteleri ölçüldü.

Farklı akut dozlarda in vitro olarak uygulanan etanol doza bağlı olarak rat beyin sinaptozomları üzerinde nörotoksik etki göstermektedir. 100mM ve 200mM dozlarında uygulanan etanol, SA parametresinde gösterildiği gibi sinaptozomal zarlarda hasar yaratabilmektedir. 200mM dozda uygulanan etanol, NO ve ADA parametrelerinin gösterdiği gibi fonksiyonel metabolik yollarda değişimlere sebep olmaktadır. Buna bağlı olarak zarla protein yapıdaki reseptör ve enzimlerin fonksiyonları bozulabilmektedir. 100µg/ml dozda aspirin, SA ve NO düzeylerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Etanol ile aspirin (100µg/ml) beraber uygulandığı zaman oluşan hasar etanol dozuna bağlı olarak SA ve NO düzeylerinde toksik etkiyi artırabilmektedir. Betainin ise doza bağlı olarak aspirin ile etanolün birlikte kullanımıyla artan sitotoksiteyi azaltabileceğini düşünüyoruz.

The Effects Of Using Different Doses Of Ethanol And Aspirin Together On Rat Brain Synaptosomes And The Probable Protective Role Of Betaine

İbrahim SÖĞÜT*, Gungör KANBAK

Eskişehir Osmangazi University, Medicine Faculty, Biochemistry Department

**email: İbrahim.sogut@gmail.com*

This study deals with the in vitro effects of different doses of ethanol when it is used with aspirin on rat brain synaptosomes as well as the possible protective pathway of betaine. With this aim, twenty one male albino rats of Sprague Dawley type are killed by decapitation. After the frontal cortexes of the rats are taken out, each of them is divided into four pieces. Fourteen groups of which including 6 frontal cortex pieces each are generated from these tissue samples (n=6). The synaptosomal fractions are prepared by the homogenization of the frontal cortex pieces and centrifugation. Sialic acid (SA), nitric oxide (NO) levels and adenosine deaminase

(ADA) activities of synaptosomal fractions incubated with ethanol (50, 100, 200mM), aspirin (100µg/ml) and betaine (0.5, 1mM) are recorded.

In vitro administration of different doses of ethanol have neurotoxic effect on rat brain synaptosomes. 100mM and 200mM ethanol, as it is shown in the SA parameter, might cause damage at synaptosomal membrane and also administration of 200mM ethanol may result in functional changes at metabolic pathways, which is shown by the NO and ADA parameters. Due to these changes, the structure and as a result of this, the function of the receptors and enzymes may be disrupted. The administration of 100µg/ml aspirin does not cause any change at SA and NO levels. When ethanol and aspirin (100µg/ml) are applied together, the toxicity at SA and NO levels might increase according to the doses of ethanol. On the other hand we think that betaine may decrease the cytotoxicity that is caused by the usage of ethanol and aspirin, together.

Yeşil Çay ve Koenzim Q10'un İnsan Koroner Arter Endotel Hücreleri Üzerine Hipoksik Hasarına Koruyucu Etkisi

Püreda YAZICI^{1,2}, Gül GÜNER^{1,2,3}

1 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB), İzmir

2 Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir

3 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya

Anabilim Dalı, İzmir

pureda.yazici@deu.edu.tr

İnsan koroner arter endotel hücrelerinin (HCAEC) hipoksik hasarı kalp enfarktüsünde olduğu gibi kalbin en sık görülen patolojisidir. Epigallocatekin-3-gallat (EGCG) yeşil çayın en fazla bulunan (%60) bileşenidir. Polifenol 60 (P60); ise yeşil çayın kateşinlerinin kombinasyonunu içermektedir. Biz bu maddelerin (EGCG, P60, CoQ10); HCAEC' ni hipoksik hasardan koruyup korumadığını araştırdık.

HCAEC Cambrex ve Promocell'den tedarik edildi. Hipoksi odacığı, %1 oksijen saturasyonu elde etmek için %95 N₂-%5 CO₂ ile havalandırıldı. Birinci protokolde 0-4-16-30 saat normoksi ve hipoksi uygulandı. Her iki durumda optimum (düşük serum içerikli ortam) kullanıldı. İkinci protokolde 2-5-8 saat normoksi ve hipoksi uygulandı. Normoksik süreçte optimum fakat hipoksik süreçte glukoz yoksunluğu da oluşturmak için fosfat tamponlu tuz (PBS) kullanıldı. Üçüncü protokolde 5 saat normoksi ve hipoksi uygulandı ve hipoksi boyunca hücreler EGCG (50-100-200-500 µM), P60 (10-50-100-500 µg/ml) ve CoQ10 (10-50-100 µM) ile inkübe edildi.

Optimum kullanıldığı zaman 0,4-16-30 saat normoksi (ortalama sitotoksite 1.96, 3.77-6.84-13.39) ve hipoksi (ortalama sitotoksite 1.96, 2.60, 5.00, 7.68) laktat dehidrojenaz (LDH) % sitotoksitesinde artışa neden oldu. Normoksi ve hipoksi süresinin artırılması sadece hipoksik grupta değil normoksik durumda da yüksek LDH' a neden oldu. Normoksik grupta optimum hipoksik grupta PBS kullanıldığı zaman, 2-5-8 saat hipoksi (%6.80-10.13-7.89) aynı süredeki normoksiye (%1.47-3.45-3.73) göre yüksek LDH' a neden oldu. EGCG (50-100-200µM) ve P60 (50 µg/ml) ile 5 saat inkübasyon LDH' ı düşürdü. CoQ10 LDH' a etki etmedi.

EGCG ve P60 HCAEC* nin hipoksik hasarından koruyucu etkiye sahiptir.

Protective Effect of Green Tea and Coenzyme Q10 to the Hypoxic Injury of the Human Coronary Artery Endothelial Cell

Pureda YAZICI^{1,2}, Gul GUNER^{1,2,3}

1 Dokuz Eylul University School of Medicine- Research Laboratory (ARLAB), İzmir

2 Dokuz Eylul University Health Sciences Institute, İzmir

3 Dokuz Eylul University School of Medicine Biochemistry Department, İzmir
pureda.yazici@deu.edu.tr

Hypoxia of the human coronary artery endothelial cell (HCAEC) is the most seen pathology in the heart mimicking myocardial infarcts. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is the most abundant component (%60) of green tea. Polyphenon 60 (P60); involves the combination of green tea catechins. We investigated if this components (EGCG, P60, CoQ10) can improve the HCAEC from hypoxic injury.

HCAEC is supplied from Cambrex and Promocell. Hypoxic chamber is aerated with %95 N₂- %5 CO₂ for forming %1 saturation of oxygen. In first protokol 0-4-16-30h normoxia and hypoxia is applied. In both cases optimum (low serum content media) is used. In second protokol 2-5-8h normoxia and hypoxia is applied. In normoxic period optimum but in hypoxic period for forming also glucose deprivation phosphate buffered saline (PBS) are used. In third protokol 5h normoxia and hypoxia is applied and during the hypoxia cells are incubated with EGCG (50-100-200-500 µM), P60 (10-50-100-500 µg/ml) and CoQ10 (10-50-100 µM).

When optimum is used 0,4-16-30h normoxia (mean%cyto toxicity 1.96, 3.77-6.84-13.39) and hypoxia (mean%cyto toxicity 1.96, 2.60, 5.00, 7.68) caused to increase in LDH % cytotoxicity. Enhancing the normoxic and hypoxic period caused to high LDH but not only in hypoxic group but also in normoxic condition. When optimum is used in normoxic group and PBS is used in hypoxic group 2-5-8h hypoxia (%6.80-10.13-7.89) caused to high LDH according to the same time normoxia (%1.47-3.45-3.73). 5h incubation with EGCG (50-100-200µM) and P60 (50 µg/ml) reduced LDH. CoQ10 at any dose has no effect on LDH.

EGCG and P60 have got protective effect from hypoxic injury of the HCAEC.

Travmatik Beyin Hasarında, İlimli Akut Alkol Tüketiminin Sistein Proteaz Aracılı Apoptoz ve Nitrik Oksit Üzerinde Nöroprotektif Etkisi

Güngör KANBAK¹, Kazım KARTKAYA¹,
Eda ÖZÇELİK¹, Ahmet Burak GÜVENAL²,
Sibel Canbaz KABAY³, Gül ARSLAN⁴,
Ramazan DURMAZ²

1 Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

2 Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı

3 Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı

4 Osmangazi Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu

Travmatik ölümlerin yarısı direkt olarak beyin hasarı ile ilişkilidir. Travmatik beyin hasarı sonrası hücre ölümünün basit mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Biz bu çalışmada travmatik beyin hasarında, sistein proteaz aracılı nöronal apoptozis ve nitrik oksit(NO) üretimini üzerinde akut ilimli alkol tüketiminin(2.5 g/kg) etkisini araştırmayı amaçladık.

Bu çalışmada Sprague-Dawley cinsi 200-250g ağırlığında 29 rat kullandık ve 4 grup oluşturduk; kontrol, alkol, travma ve travma+alkol grubu. Tüm ratların beyin dokularında kaspaz 3 enzim aktivitesi, katepsin L ve NO düzeylerini ölçtük. Travma grubunun kaspaz 3 enzim aktivitesi(10.24± 4.54) kontrol grubu(2.53± 0.71) ile karşılaştırıldığında önemli miktarda arttı(p<0,001). Travma grubunun kaspaz 3 enzim aktivitesi, alkol grubu(2.31± 0.44) ile karşılaştırıldığında önemli bir artış gösterdi(p<0,001). Alkol+travma grubundaki kaspaz 3 enzim aktivitesi düzeyi(5.19± 2.88), travma grubuna göre azaldı(p<0,05). Travma grubundaki katepsin L aktivitesi(4.15± 3.13), kontrol grubundan(1.13± 0.47) daha yüksek bulundu(p<0,05). Alkol+travma grubundaki katepsin L aktivitesi düzeyi(2.80± 1.50), travma grubuna göre azaldı fakat alkol+travma grubu ile travma grubu arasında önemli bir farklılık gözlenmedi(p>0,05). Kontrol grubu(0.35± 0.07) ile karşılaştırıldığında, alkol +travma grubunun NO düzeyi(0.18± 0.08) azaldı(p<0,001). Travma grubu(0.27± 0.028) ile karşılaştırıldığında, travma+alkol grubunun NO düzeyi azaldı(p<0,05). Alkol grubuyla(0.29± 0.08) karşılaştırıldığında, alkol+travma grubu NO düzeyi azaldı(p< 0,05).

Çalışmamızda sunduğumuz biyokimyasal bulgular ilimli alkol tüketiminin travmatik beyin hasarı sonrasında hücre ölümü üzerindeki faydalı etkilerini göstermektedir.



www.TurkJBiochem.com

TÜRK BİYOKİMYA DERGİSİ

Turkish Journal of Biochemistry

22. ULUSAL 22th NATIONAL
BİYOKİMYA KONGRESİ BIOCHEMISTRY CONGRESS
27 - 30 Ekim 2010, Eskişehir 27 - 30 October 2010, Eskişehir

Türk Biyokimya Derneği'nin yayın organıdır.
[Published by the Turkish Biochemical Society]

2010

Cilt [Volume] 35

Özel Sayı [Special Issue] 1

YER ALDIĞI
İNDEKSLER
[INDEXED BY]

SCI Expanded,
Journal Citation
Reports/Science
Edition,
Chemical
Abstracts,
Directory of Open
Access Journals,
Index Copernicus,
Embase, Scopus,
Ulakbim Türk Tıp
Dizini, Ulrichs
Periodical
Directory,
EBSCO

**Epigallocateşin Galatın Antioksidan Ve Prooksidan, Polifenon 60'ın Prooksidan, Koenzim Q'nun Antioksidan Etkisi**

Püreda YAZICI, Gül GÜNER-AKDOĞAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB), İzmir
pureda.yazici@deu.edu.tr

Bu araştırmada İnsan Koroner Arter Endotel Hücre Kültürü'nde (HCAEC) hipoksi-reoksijenizasyon hasarı oluşturularak farklı dozlardaki epigallocateşin galat (EGCG), Polifenon 60 ve Koenzim Q10'un etkisi ölçüldü. Hipoksi-reoksijenizasyon öncesi maddelerle 2 saat preenkübyasyon olarak uygulandığında etki oluşmadı ($p<0.05$). 24 saat preenkübyasyon olarak uygulandığında 62.5 µg/ml Polifenon 60'ın prooksidan etkisi ortaya çıktı ($p=0.029$). 24 saat enkübyasyon hipoksi heraberinde uygulandığında EGCG'nin düşük dozlarında 200-500 µM antioksidan etki ($p=0.021$), Polifenon 60'ın yüksek dozunda 1000 µg/ml prooksidan etki ($p=0.034$), Koenzim Q 10' da ise düşük dozda 10 µM antioksidan etki ortaya çıktı ($p=0.034$). İnkübyasyonun 24 saati preenkübyasyon, 24 saati hipoksi ile eş zamanlı enkübyasyon olarak toplam 48 saat uygulandığında EGCG'de etki ortaya çıkmazken, 500- 1000 µg/ml Polifenon 60 prooksidan etki gösterirken ($p=0.042$, 0.034), 5 µM Koenzim Q 10 antioksidan etki gösterdi. Sonuç olarak EGCG 24 saatte fizyolojik dozda antioksidan etki gösterdi ve daha kısa süreli enkübyasyonda etki oluşmadı. Daha uzun süreli enkübyasyon ise reoksijenizasyon sırasında ortamına verilen oksijenin oluşturduğu alkali ortam nedeniyle EGCG' nin otooksidasyonuna neden olarak, oksidan etkisi artırarak antioksidan etkiyi blokladı. EGCG'deki galloil grupları antioksidan etkiden sorumlu tutuluyor. Polifenon 60'da daha düşük düzeyde galloil grubu olduğundan hiçbir koşulda antioksidan etki oluşmazken enkübyasyon süresi uzadıkça prooksidan etki belirginleşti. Koenzim Q 10 ise diğer ikisi suda çözünürken, bu kloroformda çözündüğünden etki daha geç oluşarak ancak 24-48 saat enkübyasyonda antioksidan etki olarak kendini gösterdi.

The Effect Of Antioxidant And Prooxidant Epigallocatechin-Gallat, Prooxidant Of Polyphenon 60 And Antioxidant Of Coenzyme Q 10

Püreda YAZICI, Gül GÜNER-AKDOĞAN

Dokuz Eylül University Medical School Research Laboratory (ARLAB), Dokuz Eylül University Medical School

In this research in Human Coronary Artery Endothelial Cell (HCAEC), hypoxia-reoxygenation injury formed and in different doses the effect of epigallocatechin-gallat (EGCG), polyphenon 60 and coenzyme Q 10 is measured. Before hypoxia-reoxygenation 2 hours as preincubation applied the effect didn't formed with the components ($p<0.05$). When 24 hours as preincubation applied the prooxidant effect of 62.5 µg/ml polyphenon 60 has been seen ($p=0.029$). When 24 hours incubation is applied together with the hypoxia in low doses of EGCG (200-500 µM) antioxidant effect ($p=0.021$), in high dose of polyphenon 60 (1000 µg/ml) prooxidant effect ($p=0.034$), as also in coenzyme Q 10 in low dose (10 µM) antioxidant effect is appeared ($p=0.034$). Incubation which 24 hours as preincubation and 24 hours simultane with hypoxia together with 48 hours is applied when no effect has been seen in EGCG, 500- 1000 µg/ml polyphenon 60 shows prooxidant effect ($p=0.042$, 0.034) and 5 µM coenzyme Q 10 shows antioxidant effect. As a result; when EGCG in 24 hours in physiologic doses shows antioxidant effect and any effect didn't formed in shorter incubation. Longer time incubation because of alkalic condition formed in realised oxygen in reoxygenation period caused to otooxidation of EGCG; induced oxidant effect and blocked antioxidant effect. Galloil groups in EGCG is responsible for the antioxidant effect. And because low content of galloil groups in polyphenon 60 in neither condition antioxidant effect formed and also prooxidant effect is clarified after time passes in incubation. . And also in coenzyme Q 10, the two other components dissolved in water but coenzyme Q 10 is dissolved in cloroform the effect is later formed in 24-48 hours incubation and the antioxidant effect showed itself.



P-086

Reoksijenizasyon Süresinin Uzatılması Reaktif Oksijen Radikali Düzeyi Artışı ile ParaleldirPüreda YAZICI*Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB), İzmir
pureda.yazici@deu.edu.tr*

Bu çalışmada İnsan Koroner Arter Endotel Hücre Kültüründe (HCAEC) uygulanan hipoksi-reoksijenizasyonun reaktif oksijen radikali (ROS) düzeyini değiştirip değiştirmediğini görmek amaçlanmıştır. HCAEC'de; epigallocatechin-galat (EGCG), Polifenon 60 ve Koenzim Q 10 ile 2 saat süreyle inkübasyon uygulanmış ardından 6 saat hipoksi ve sırasıyla 1-4-18 saat reoksijenizasyona maruz bırakılmıştır. EGCG; yeşil çayın içerisinde %60 olarak en fazla bulunan bileşendir. Polifenon 60 ise tüm yeşil çay bileşenlerinin bir karışımıdır. Hipoksi için hipoksik kabin (%95 N₂, %5 CO₂), reoksijenizasyon için (%95 hava, %5 CO₂) CO₂ inkübatörü kullanılmıştır. Bu maddelerin farklı dozlarıyla (EGCG:50, 100, 200 µM; Polifenon 60:31.25, 62.5, 125 µg/ml, Koenzim Q10:10, 50 µM) yapılan 2 saat inkübasyon sonrasında aynı doz grubunda reoksijenizasyon süresinin artırılması ROS düzeyi artışı ile paralel bulunmuştur. 31.25 µg/ml Polifenon 60 grubunda 18 saat reoksijenizasyon, 1 saat reoksijenizasyondan daha yüksek ROS düzeylerine neden olmuştur (p=0.029). 62.5 µg/ml Polifenon 60 grubunda 4 saat ve 18 saat reoksijenizasyon, 1 saat reoksijenizasyondan daha yüksek ROS düzeylerine neden olmuştur (p=0.029, p=0.029). 125 µg/ml Polifenon 60 grubunda 4 saat ve 18 saat reoksijenizasyon, 1 saat reoksijenizasyondan daha yüksek ROS düzeylerine neden olmuştur (p=0.029, p=0.05). 10 µM Koenzim Q10 grubunda 18 saat reoksijenizasyon, 1 saat reoksijenizasyondan daha yüksek ROS düzeylerine neden olmuştur (p=0.029). Sonuç olarak şöyle söylenebilir, hipoksi süresinden bağımsız olarak, HCAEC' de reoksijenizasyon süresi uzadıkça ROS düzeyi artmaktadır.

P-086

Enhancing The Reoxygenation Period is Parallel with The Reactive Oxygen Species InducePüreda YAZICI*Dokuz Eylül University Medical School Research Laboratory (ARLAB), İzmir
pureda.yazici@deu.edu.tr*

In this work; to see the changing at reactive oxygen radical (ROS) level in Human Coronary Artery Endothelial Cell (HCAEC) which is hypoxia-reoxygenation performed is aimed. HCAEC is incubated for 2 hours in Epigallocatechin-gallat (EGCG), Polyphenon 60 and Coenzyme Q 10 and later 6 hours hypoxia and by the way 1-4-18 hours reoxygenation. EGCG, is the most abundant component (% 60) of green tea. Polyphenon 60 is the mixed of all green tea components. Hypoxic chamber (%95 N₂, %5 CO₂) for hypoxia and for reoxygenation (%95 air, %5 CO₂) CO₂ incubator is used. After 2 hours incubation with different doses of components (EGCG:50, 100, 200 µM; Polyphenon 60:31.25, 62.5, 125 µg/ml, Coenzyme Q10:10, 50 µM), in same dose group enhancing the reoxygenation period is parallel with the ROS induce. In group of 31.25 µg/ml Polyphenon 60, 18 hours reoxygenation is more than 1 hour reoxygenation ROS induce (p=0.029). In group of 62.5 µg/ml Polyphenon 60, 4 and 18 hours reoxygenation is more than 1 hour reoxygenation ROS induce (p=0.029, p=0.029). In group of 125 µg/ml Polyphenon 60, 4 and 18 hours reoxygenation is more than 1 hour reoxygenation ROS induce (p=0.029, p=0.05). In group of 10 µM Coenzyme Q10; 18 hours reoxygenation is more than 1 hour reoxygenation ROS induce (p=0.029). As a result we can say that separated from hypoxic period; in HCAEC when reoxygenation period gets longer ROS level is induced.

12 ÖZGEÇMİŞ

DEÜ AKADEMİK PERSONEL AKADEMİK ÖZGEÇMİŞ FORMU

Uzm.Dr.P.Yazıcı: 1 / 4
21/05/2012 11:21

Adı Soyadı : Uzm.Dr. Püreda YAZICI
Doğum Yeri/Tarihi : Erzurum 22/08/1974
Kadro Ünvanı ve Aldığı Tarih : Uzman 20/09/2006
Kadrosunun Bulunduğu Birim : Rektörlük
Görev Yaptığı Birim : Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Bölüm,Anabilim/Anasanat Dalı :
Yabancı Dil : İngilizce (ODS : 82,5 / 2006 Yılı)
Lisans : Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp, Haziran 1999
Tıpta Uzmanlık : Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Mayıs 2005

Lisansüstü öğrenimlerdeki Tez Bilgileri

Doktora Tezi : In Vitro hipoksi-reperfüzyon ile indüklenen insan koroner arter endotel hücre hasarına yeşil çay bileşenlerinden (epigallocateşin- 3 galat ve polifenon 60' ın) ve koenzim Q10'un olası koruyucu etkisinin incelenmesi
Tezin Danışmanı, Başlama-Bitiş Tarihleri : Prof.Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN , Eylül 2006 -Devam ediyor
Tıpta Uzmanlık Tezi : Stresin Peroksizom Proliferasyonuna Etkisi
Tezin Danışmanı, Başlama-Bitiş Tarihleri : Prof. Dr. Fatma Kutay , Kasım 2001 - Mayıs 2005

Makale Yayınları

Tıpta Uzmanlık sonrası Makaleleri

1. Uzm. Dr. Püreda Yazıcı, Msc. Shohreh Alizadehshargh, Prof. Dr. Gül Güner-Akdoğan,"Apoptoz: Düzenleyici Moleküller, Hastalıklarda ilişkisi ve Apoptozu Saptama Yöntemleri", Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 2009;29(6):1677-86., 2009, Review Makale,SCI-Expanded, Tıpta Uzmanlık sonrası
2. shohreh shargh, pureda yazıcı,"Application of stem cells in cancer therapy", Medical magazine, 2008:23-26, 2008, Review Makale,Yurtdışı Hakemli, Tıpta Uzmanlık sonrası

Öğrenim Sırasında Makaleler

3. İpek Akil, Püreda Yazıcı, Özge Yılmaz, Muzaffer Polat, Cevval Ullman, Fatma Z. Kutay,"İdrar yolu enfeksiyonlu çocuklarda sefiksim tedavisinin idrar NAG atılımına etkisi", Ege Tıp Dergisi, 43/2/101-4/2004, 2004, Araştırma Makale,Ulusal Hakemli

Bilimsel Etkinliklerde Sunulmuş Bildirileri**Tıpta Uzmanlık sonrası Bildirileri**

1. **Pürüde Yazıcı**, "Reoksjenizasyon Süresinin Uzatılması Reaktif Oksijen Radikalı Düzeyi Artışı ile Paraleldir", *Türk Biyokimya Dergisi*, P-066, XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi, ESKİŞEHİR, Ekim 2010, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
2. **Pürüde YAZICI**, Gül Güner-Akdoğan, "Epigallocateşingalatın Antioksidan ve Prooksidan, Polifenon 60'ın Prooksidan, Koenzim Q10' un Antioksidan Etkisi", *Türk Biyokimya Dergisi*, P-066, XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi, ESKİŞEHİR, Ekim 2010, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
3. **Pürüde Yazıcı**, Gül Güner, "Yeşil Çay ve KoenzimQ10' un İnsan Koroner Arter Endotel Hücresi Hipoksik Hasarına Koruyucu Etkisi", *Turkish Journal of Biochemistry*, 2009;34(S):74-5., XXI. Ulusal Biyokimya Kongresi, İSTANBUL, Ekim 2009, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
4. **Pürüde Yazıcı**, Oya Sayın, Gül Güner, "Antioxidant Effect of Green Tea and Coenzyme Q10 in Human Coronary Artery Endothelial Cells", *The FEBS Journal*, 276(1):395 (2009), 9th FEBS Young Scientist Forum & 34th FEBS Congress Life's Molecular Interactions, ÇEK CUMHURİYETİ, Temmuz 2009, Uluslararası Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
5. **Sayın O, Yazıcı P, Arslan N, Güner G**, "Resveratrolün In vitro İnsan koroner arter endotel hücre hasarına koruyucu etkisi", *Türk Biyokimya Dergisi*, 33/251-52/2008, 20. Ulusal Biyokimya Kongresi, NEVŞEHİR, Ekim 2008, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
6. **Nakoman C, Yazıcı P, Resmi H, Ay O, Açikel U, Atabey N, Güner G**, "Effects of basic fibroblast factor (bFGF) on MMP-2, TIMP-2, and type-I collagen levels in human lung carcinoma fibroblasts", *FEBS Advanced Lecture Course, Matrix Pathobiology, Signaling and Molecular Targets*, YUNANİSTAN, Mayıs 2007, Uluslararası Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
7. **Pürüde Yazıcı**, Özlem Donat, Oğuz Gozen, Ali Saffet Gonul, Gunes Basol, Fatma Z. Kutay, "The Effects of Stress on Peroxisome Proliferation", XXIII. World Congress of Pathology and Laboratory Medicine, İSTANBUL, Mayıs 2005, Uluslararası Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası

Öğretim Sırasında Bildirileri

8. **Pürüde Yazıcı**, Özlem Donat, Oğuz Gozen, Ali Saffet Gönül, Güneş Başol, Fatma Z. Kutay, "Stresin Peroxisom Proliferasyonuna Etkisi", IV. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, MARMARİS, Eylül 2004, Hakemli organizasyon
9. **Yazıcı P, Akil I, Yılmaz Ö, Polat M, Ulman C, Kutay FZ**, "Sefksim ile Tedavi Edilen Çocuklarda Renal Tubuler Fonksiyonların Saptanması", *Türk Biyokimya Dergisi*, 2004; 29 (1): 101-2", 18. Ulusal Biyokimya Kongresi, TRABZON, Mayıs 2004, Hakemli organizasyon

Görev Aldığı Projeler

1. "In vitro hipoksi reperfüzyon ile indüklenen koroner arter hücre hasarına yeşil çay bileşenlerinden (epigallocateşin-3 galat ve polifenon 60)'ın ve koenzim Q 10' un olası koruyucu etkisinin incelenmesi", Araştırma Projesi Koordinatörü : Prof.Dr.Gül GÜNER, Doktora Tezi Projesi, , "DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı" destekli proje, Proje Çalışanı, Katılımcı görevinde, Eylül 2006 - Eylül 2009

Katıldığı / Görev aldığı Mesleki / Bilimsel / Sanatsal Etkinlikler

1. XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi 2010(Tebliğ / Bildiri Sunma (Poster, Sözlü v.b.))
2. XXI. Ulusal Biyokimya Kongresi 2009(Tebliğ / Bildiri Sunma (Poster, Sözlü v.b.))
3. FEBS YOUNG SCIENTIST FORUM / 34 th FEBS CONGRESS, Çek Cumhuriyeti, 2009(Tebliğ / Bildiri Sunma (Poster, Sözlü v.b.))
4. XX. ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ 2008(Tebliğ / Bildiri Sunma (Poster, Sözlü v.b.))
5. Tıbbi Laboratuvarlarda Analitik Kalite Yönetimi Kursu, İzmir, 2008(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
6. ORTAÖĞRETİM ÖĞRETMENLERİ ARASI BİLİM DANIŞMANLIĞI ÇALIŞTAYI, Kuşadası, 2007(Diğer)
7. BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİDE MODERN TEKNİKLER, Didim (Yenihisar), 2007(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
8. FEBS Extrasellüler Matris Kursu, Yunanistan, 2007(Tebliğ / Bildiri Sunma (Poster, Sözlü v.b.))
9. DNA hasarı, DNA onarımı ve Hastalıklarla ilişkisi, İzmir, 2007(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
10. Apoptozis, Hastalıklarla ilişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri Kursu (workshop), İzmir, 2006(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
11. Dijital Görüntüleme Kursu (31. FEBS Kongresi), İstanbul, 2006(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
12. 31. FEBS Congress, Bahçelievler, 2006(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
13. Türk Klinik Biyokimya Demeği II. Klinik Biyokimya ve Kansere Sempozyumu, Bursa, 2004(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
14. Türk Biyokimya Demeği Moleküler Kansere Sempozyumu, Konak, 2004(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
15. Türk Biyokimya Demeği Yaşlanma Sempozyumu, Konak, 2003(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
16. Ulusal Toksikoloji ve Klinik Toksikoloji Sempozyumu, İzmir, 2003(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
17. Türk Klinik Biyokimya Demeği III. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, İzmir, 2003(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
18. Türk Klinik Biyokimya Demeği Klinik Biyokimya ve Kansere Sempozyumu, Bursa, 2002(İzlenimci - Katılımcı Olarak)

Alınan Burs Bilgileri

1. Kurs katılım, yol, otel masrafı, FEBS (Federation of European Biochemical Societies) 7 Gün süreyle University of Patras, YUNANISTAN, 2006

Kazanılan Ödül Bilgileri

1. "Federation of European Biochemical Societies 9th Young Scientist Forum+ 34. FEBS Kongresi", 9th Young Scientist Forum, Bilim Ödülü, Kongreye Katılım Desteği, Üniversite Ödülü, Uluslararası Düzeyde Ödül, Bilim Alanında, Grup Ödülü, 2009

Üye olunan Mesleki Bilimsel Sanatsal Kuruluşlar

1. Türk Biyokimya Derneği, 2001
2. Türk Klinik Biyokimya Derneği, 2001

Görev Yerleri

1. Uzman : -DEÜ, Rektörlük Eylül 2006-Devam ediyor
2. Araştırma Görevlisi : Ege Üniversitesi Kasım 2001-Ekim 2005
3. Araştırma Görevlisi : -DEÜ, Ocak 2001-Nisan 2001

