

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FOLİKÜL UYARICI HORMON VE TESTOSTERONUN SIÇAN  
AORT DÜZ KAS HÜCRELERİ ÜZERİNE İN VİTRO ETKİLERİ  
VE EPIGENETİK ANALİZİ**

**Ayla BATU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ**

**MERSİN-2016**

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FOLİKÜL UYARICI HORMON VE TESTOSTERONUN SIÇAN  
AORT DÜZ KAS HÜCRELERİ ÜZERİNE İN VİTRO ETKİLERİ  
VE EPIGENETİK ANALİZİ**

Ayla BATU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ

Tez No:309.

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2016-1-TP2-1423 nolu proje olarak desteklenmiştir.

MERSİN-2016

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tez programı çerçevesinde yürütülmüş olan "Folikül Uyarıcı Hormon ve Testosteronun Sıçan Aort Düz Kas Hücreleri Üzerine İn Vitro Etkileri ve Epigenetik Analizi" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi

25/07/2016

  
Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ

Mersin Üniversitesi

Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Ebru BALLI

Mersin Üniversitesi

Jüri Üyesi

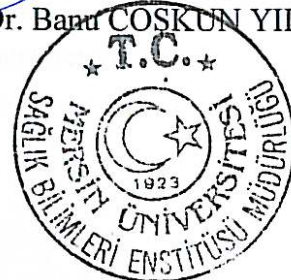
  
Prof. Dr. Özgür ÇINAR

Ankara Üniversitesi

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim kurulunun 08.08.2016.....tarih ve 2016/298.....sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ



## TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübesiyle çalışmalarımnda her zaman bana yol gösteren ve benden her konuda desteğini esirgemeyen, pratik çözümleriyle zor durumların üstesinden gelip çalışmalarımna devam etmemi sağlayan, sınırsız sabrına, anlayışına, çalışkanlığına ve zekasına her zaman hayran kaldığım değerli ve sevgili hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Ş. Necat Yılmaz'a,

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bana her konuda yardımcı olan, motivasyonumu ve çalışma disiplinimi korumam konusunda bana ilham veren değerli ve sevgili hocalarım Prof. Dr. Banu Coşkun Yılmaz'a, Prof. Dr. Ebru Ballı'ya ve Doç Dr. Savaş Aktaş'a,

Çalışmalarımın istatistiksel analizlerini gerçekleştiren Doç. Dr. Gülhan Orekiçi Temel'e, deneylerimde kullandığım sıçan aortik düz kas hücrelerini bize temin eden değerli hocam Prof. Dr. Ülkü Çömelekoğlu'na ve Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi'ndeki deney aşamalarında büyük yardımlarını gördüğüm ve tecrübelerinden yararlandığım sevgili arkadaşım Araştırma Görevlisi Derya Yetkin'e,

Hücre kültürü çalışmaları konusunda bilgi ve deneyimimi arttırmamı sağlayan, akademik duruşunu örnek aldığım sayın hocam Dr. Joanna Gdula-Argasinska'ya, (I express my gratitude to my precious lecturer Dr. Joanna Gdula-Argasinska for her developing my knowledge and experience in cell culture laboratory and her being a model for me with her analytical thinking),

Yüksek lisansımı keyifli bir şekilde geçirmemi sağlayan ve benden yardımlarımı esirgemeyen, sevgili arkadaşlarım Araştırma Görevlisi M. İlkey Karagül'e, yüksek lisans öğrencisi Kezban Kibar'a, ve Burcu Demirbağ'a, ve anabilim dalımızda görev yapan çalışma arkadaşlarım Araştırma Görevlisi Gülşen Bayrak'a, doktora öğrencisi Tuba Özcan Metin'e, Araştırma Görevlisi Hatice Oruç'a ve teknisyenimiz Betül Gündoğdu'ya,

Varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim, bana her konuda destek olan, layık olmaya çalıştığım Canım Ailem'e tüm kalbimle, en içten teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iv
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ÖZET</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Düz Kas Hücreleri .....	3
2.1.1. Vasküler Düz Kas Hücreleri .....	4
2.2. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) .....	6
2.3. Testosteron .....	8
2.4. Epigenetik .....	10
2.4.1. DNA Metilasyonu .....	12
2.5. Kaveolin .....	14
2.5.1. Kaveolin-1 .....	16
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	18
3.1. Kullanılan Hücreler .....	18
3.2. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü .....	18
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Hormon Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....	20
3.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analizinin Yapılması .....	20
3.5. İmmünofloresan İşaretleme ve Değerlendirme .....	22
3.6. İstatistiksel Analiz .....	26
<b>4. BULGULAR</b> .....	27
4.1. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Bulguları .....	27

4.2. İmmünofloresan İşaretleme Bulguları .....	36
4.2.1. Kaveolin-1 İşaretleme Bulguları .....	37
4.2.2. DNMT1 İşaretleme Bulguları .....	40
4.2.3. DNMT3a İşaretleme Bulguları .....	43
<b>5. TARIŞMA .....</b>	<b>46</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>51</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>53</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>62</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b>	FSH ve testosteronun hormonal düzenlenmesi .....	6
<b>Şekil 2.2.</b>	DNA'nın düzenlenmesi ve gen ifadesinin kontrolü .....	11
<b>Şekil 2.3.</b>	DNA'ya metil grubunun eklenmesi (DNA metilasyonu) ve histon modifikasyonu .....	11
<b>Şekil 2.4.</b>	Kaveola ve kaveolin yapısı .....	15
<b>Şekil 3.1.</b>	Konfluent olan sıçan aortik düz kas hücrelerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü (600X).....	19
<b>Şekil 3.2.</b>	Resimlerin ölçüm için gri skalaya çevrilmesi (200X) .....	24
<b>Şekil 3.3.</b>	Gri skalaya çevrilen resimler üzerinde hücrelerin işaretlenmesi (200X) 24	
<b>Şekil 4.1.</b>	Tüm grupların zamana bağlı hücre indeks eğrisi .....	28
<b>Şekil 4.2.</b>	Kontrol, 1 ng/ml FSH (F <sub>1</sub> ), 10 ng/ml FSH (F <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml FSH (F <sub>3</sub> ) uygulanan grupların zamana bağlı hücre indeks eğrisi .....	29
<b>Şekil 4.3.</b>	Kontrol, 1 ng/ml FSH (F <sub>1</sub> ), 10 ng/ml FSH (F <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml FSH (F <sub>3</sub> ) uygulanan grupların 44. saatte hücre indeks ortalamaları .....	29
<b>Şekil. 4.4.</b>	Kontrol, 1 ng/ml FSH (F <sub>1</sub> ), 10 ng/ml FSH (F <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml FSH (F <sub>3</sub> ) uygulanan grupların 57. saatte hücre indeks ortalamaları .....	30
<b>Şekil. 4.5.</b>	Kontrol, 1 ng/ml FSH (F <sub>1</sub> ), 10 ng/ml FSH (F <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml FSH (F <sub>3</sub> ) uygulanan grupların 70. saatte hücre indeks ortalamaları .....	30
<b>Şekil. 4.6.</b>	Kontrol, 1 ng/ml FSH (F <sub>1</sub> ), 10 ng/ml FSH (F <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml FSH (F <sub>3</sub> ) uygulanan grupların 84. saatte hücre indeks ortalamaları .....	31
<b>Şekil. 4.7.</b>	Kontrol, 1 ng/ml FSH (F <sub>1</sub> ), 10 ng/ml FSH (F <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml FSH (F <sub>3</sub> ) uygulanan grupların 98. saatte hücre indeks ortalamaları .....	31
<b>Şekil. 4.8.</b>	Kontrol, 1 ng/ml FSH (F <sub>1</sub> ), 10 ng/ml FSH (F <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml FSH (F <sub>3</sub> ) uygulanan grupların 111. saatte hücre indeks ortalamaları .....	32
<b>Şekil 4.9.</b>	Taşıyıcı, 1 ng/ml testosteron (T <sub>1</sub> ), 10 ng/ml testosteron (T <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml testosteron (T <sub>3</sub> ) uygulanan grupların zamana bağlı hücre indeks eğrisi .	33

<b>Şekil 4. 10.</b>	Taşıyıcı, 1 ng/ml testosteron (T <sub>1</sub> ), 10 ng/ml testosteron (T <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml testosteron (T <sub>3</sub> ) uygulanan grupların 44. saatte hücre indeks ortalamaları.....	33
<b>Şekil 4.11.</b>	Taşıyıcı, 1 ng/ml testosteron (T <sub>1</sub> ), 10 ng/ml testosteron (T <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml testosteron (T <sub>3</sub> ) uygulanan grupların 57. saatte hücre indeks ortalamaları.....	34
<b>Şekil 4.12.</b>	Taşıyıcı, 1 ng/ml testosteron (T <sub>1</sub> ), 10 ng/ml testosteron (T <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml testosteron (T <sub>3</sub> ) uygulanan grupların 70. saatte hücre indeks ortalamaları.....	34
<b>Şekil 4.13.</b>	Taşıyıcı, 1 ng/ml testosteron (T <sub>1</sub> ), 10 ng/ml testosteron (T <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml testosteron (T <sub>3</sub> ) uygulanan grupların 84. saatte hücre indeks ortalamaları.....	35
<b>Şekil 4. 14.</b>	Taşıyıcı, 1 ng/ml testosteron (T <sub>1</sub> ), 10 ng/ml testosteron (T <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml testosteron (T <sub>3</sub> ) uygulanan grupların 98. saatte hücre indeks ortalamaları.....	35
<b>Şekil 4. 15.</b>	Taşıyıcı, 1 ng/ml testosteron (T <sub>1</sub> ), 10 ng/ml testosteron (T <sub>2</sub> ) ve 100 ng/ml testosteron (T <sub>3</sub> ) uygulanan grupların 111. saatte hücre indeks ortalamaları.....	36
<b>Şekil 4.16.</b>	24 saat sonunda Cav-1 immünofloresan işaretlenmesi (20X) .....	38
<b>Şekil 4.17.</b>	72 saat sonunda Cav-1 immünofloresan işaretlenmesi (20X).....	39
<b>Şekil 4.18.</b>	24 saat sonunda DNMT1 immünofloresan işaretlenmesi (20X) .....	41
<b>Şekil 4.19.</b>	72 saat sonunda DNMT1 immünofloresan işaretlenmesi (20X) .....	42
<b>Şekil 4.20.</b>	24 saat sonunda DNMT3a immünofloresan işaretlenmesi (20X). .....	44
<b>Şekil 4.21.</b>	72 saat sonunda DNMT3a immünofloresan işaretlenmesi (20X) .....	45



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>5mC</b>	5-Metilsitozin
<b>ABP</b>	Androjen Bağlayan Protein
<b>BSA</b>	Sığır Serum Albümin
<b>Cav-1</b>	Kaveolin-1
<b>Cav-2</b>	Kaveolin-2
<b>Cav-3</b>	Kaveolin-3
<b>DHT</b>	Dehidrotestosteron
<b>DNMT</b>	DNA Metiltransferaz
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Östrojen Reseptör $\alpha$
<b>FGF</b>	Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>FSH</b>	Folikül Uyarıcı Hormon
<b>GnRH</b>	Gonadotropini Serbestleştirici Hormon
<b>GPCR</b>	G-Protein Eşlenik Reseptör
<b>HAT</b>	Histon Asetiltransferaz
<b>hCG</b>	İnsan Kronik Gonadotropin
<b>HDAC</b>	Histon Deasetilaz
<b>hFSHR</b>	İnsan Folikül Uyarıcı Hormon Reseptörü
<b>HMT</b>	Histon metiltransferaz
<b>IP<sub>3</sub></b>	İnozitol 1,4,5- trifosfat

<b>KAH</b>	Koroner Arter Hastalığı
<b>LH</b>	Luteinleştirici Hormon
<b>MECP2</b>	Metil Bağlayıcı Protein
<b>VDKH</b>	Vasküler Düz Kas Hücreleri
<b>SERCA</b>	Ca <sup>++</sup> ATPaz
<b>SHBG</b>	Seks Hormon Bağlayıcı Globulin
<b>SR</b>	Sarkoplazmik Retikulum
<b>PDGF</b>	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü

## ÖZET

### Folikül Uyarıcı Hormon ve Testosteronun Sıçan Aort Düz Kas Hücreleri Üzerine İn Vitro Etkileri ve Epigenetik Analizi

Kardiyovasküler hastalıklarda sıklıkla gözlenen ateroskleroz tüm toplumda görülebilir ve komplikasyonları nedeniyle yaşam kalitesini ve süresini etkiler. Bu hastalığın menopoz öncesi kadınlarda görülme sıklığının erkeklere göre daha az olduğu bilinmektedir. Ancak bu durumun nedenleri çok iyi anlaşılammıştır. Ateroskleroz sonucu endotel hücreleri ve damar duvarındaki düz kas kitlesinin proliferasyonu uyarılır. Prolifere olan hücrelerin hasar bölgesinde birikmesi sonucu damar lümeninde plak oluşumu gözlenir ve bu da damar lümeninin daralmasına neden olur.

Çalışmamızda, aortik düz kas hücre proliferasyonunun FSH ve testosteron hormonlarından nasıl etkilendiğini ve bu etkinin epigenetik sonuçlarını göstermeye çalıştık. Çalışmada kullanılan hücrelere üç farklı dozda testosteron (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) ve folikül uyarıcı hormon (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) uygulandı ve hücrelerin proliferasyon özellikleri, epigenetik değişimleri ve kaveolin-1 ekspresyonları zamana bağlı olarak incelendi. Sonuç olarak, 10 ng/ml FSH uygulanan grupta hormon uygulanmasına bağlı olarak erken saatlerde (44. saatte) proliferasyonda azalan bir etki olduğu ve ilerleyen saatlerde (98. ve 111. saatlerde) ise 100 ng/ml FSH uygulanan grupta proliferasyonda artan bir etki olduğu gözlenirken, testosteronun 100 ng/ml olan konsantrasyonları hücre indekslerinde anlamlı azalmaya yol açtı. Yine sunulan çalışmada immüno Floresan işaretleme yöntemi ile Cav-1, DNMT1 ve DNMT3a protein ekspresyonlarına bakıldı ve boyanma yoğunlukları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Bu veriler, düz kas hücre metabolizmasının birçok faktörden etkilenebileceğini ve bu durumun ateroskleroz gelişiminde katkı sağlayabileceğini düşündürmüştür. Çalışmanın fark çıkmayan parametreleri için de *in vivo*

**çalışmaların planlanması ve farklı faktörlerin de varlığında yeni deneylerin yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır.**

**Tüm bulgular bir arada değerlendirildiğinde FSH ve testosteronun ateroskleroz patogenezinde düz kaslar üzerinden etkili olabileceği sonucuna ulaşıldı.**

**Anahtar kelimeler: Aortik düz kas hücreleri, Ateroskleroz, Epigenetik, FSH, Testosteron.**



## ABSTRACT

### *In vitro* Effects of Follicle Stimulating Hormone and Testosterone on Rat Aortic Smooth Muscle Cells and its Epigenetic Analysis

Atherosclerosis that has a high prevalence among cardiovascular disease which can be observed by all societies. It affects length and duration of life due to the complications. It is known that the incidence of atherosclerosis in men is higher than in women before menopause. However, the reasons for this situation are not well understood. As a result of atherosclerosis, the proliferation of endothelial cells and smooth muscle mass in the vessel wall are stimulated. The accumulation of cells that proliferate at the injury site causes plaque formation in the vascular lumen which leads to stenosis of the vessels.

In our study, we aimed to show that aortic smooth muscle cell proliferation is affected from FSH or testosterone, and the epigenetic consequences of this effects. Cells were tested with three different doses of testosterone (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) and follicle stimulating hormone (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) to the cells and time dependent variations of cell proliferation, epigenetic changes and caveolin-1 expression were examined. Whereas depending on the applying hormone, the 10 ng / ml FSH hormone treated groups showed decreasing of proliferation, later (98 and 111 hours) the 100 ng / ml FSH hormone treated groups had increasing of proliferation. Moreover, we observed all 100 ng/ml testosterone hormone treated groups had increasing effects of cell index and these findings are significant for statistical analysis. 10 ng/ml FSH treatment group hormones in the early hours, depending on the applied (44 hours) a decreasing influence where and later (98 and 111 Hours) and 100 ng/ml FSH is a growing influence in the treated group testosterone was observed with 100 ng/ml concentration has led to a significant decrease in cell index. In this study, we examined Cav-1, DNMT1 and DNMT3a protein expressions by using immunofluorescence labeling method and none of the antibodies showed significant differences among staining intensities between the groups.

**Our results suggest that smooth muscle cell metabolism can be affected by many factors and this can contribute to the development of atherosclerosis. Our results suggest that, *in vivo* studies must be planned for the insignificant results of this study and these new experiments must perform in the presence of different factors.**

**When all results are evaluated together, we suggest that FSH and testosterone can be effective on the smooth muscle in the pathogenesis of atherosclerosis.**

**Key Words: Aortic smooth muscle cells, Atherosclerosis, Epigenetic, FSH, Testosterone.**



# 1. GİRİŞ

Dolaşım sisteminde kalbin damar sistemi içine gönderdiği kan, önce arterlere sonra kılcal damarlara ve daha sonra venlere geçerek kalbe tekrar geri döner. Bu sistem içinde oksijenlenmiş kan, vücudun tüm bölümlerine ulaştırılır. Kalbin pompa gücü ve damar lümeninin bütünlüğü sayesinde damar içindeki kanın sürekli ve devamlı olarak dokulara akışı gerçekleşir.

Kardiyovasküler sistemde kan akımının kontrolü bir çok faktörle sağlanır. Bu faktörler nöronal, hormonal veya lokal olabilmektedir. Bu faktörlerin etkisi ile kan akımı artıp azalabilmektedir. Kan akımının hormonal kontrolünün norepinefrin/epinefrin, anjiotensin, vazopressin, endotelin gibi vazokonstriktör ajanlarla ya da bradikinin, histamin, prostaglandinler, serotonin (5-hidroksitriptamin) gibi vazodilatatör ajanlar aracılığı ile gerçekleştiği bilinmektedir. Ayrıca östrojen, testosteron ve folikül uyarıcı hormon (FSH) gibi cinsiyet hormonlarının da kasılıp gevşeme ve damar duvarında bulunan düz kas hücreleri üzerinde etkisi bulunduğu pek çok klinik ve epidemiyolojik çalışma ile gösterilmiştir. Östrojen, vasküler düz kas hücrelerinin (VDKH) çoğalmasını inhibe ederek ve endotel hücrelerinin büyümesini hızlandırarak uzun vadeli vasküler korunmayı sağlarken (1) erkeklerde dolaşımdaki testosteron seviyesinin düşük olması ile koroner kalp hastalığı risk faktörleri arasında pozitif bir korelasyonun olduğu bildirmiştir (2). Yüksek tansiyon, diyabet, inflamasyon, bağ dokusu hastalıkları, kolesterol, sigara kullanımı, beslenme alışkanlığı ve genetik faktörler gibi nedenlerden kaynaklanabilen ateroskleroz gibi hastalık durumlarında, bu dokunun işlevini düzgün bir şekilde yapması engellenir. Bu durumun bir sonucu olarak damar lümeni içindeki kan akımı normal bir şekilde gerçekleşmemektedir.

Bu tez çalışması kapsamında sıçan aortik düz kas hücrelerinin *in vitro* ortamda, FSH ve testosterondan nasıl etkilendiğinin anlaşılması amaçlanmıştır. Belirtilen klinik durumlar ve günümüzde artan kardiyovasküler hastalıklar göz önüne alındığında, aort düz kas dokusunun genomuna ait özelliklerin veya proliferasyon gibi özelliklerinin daha iyi bilinmesinin temel ve klinik araştırmalar için yeni bir bakış açısı kazandıracığını düşünmekteyiz. Ayrıca bu çalışmada kullanılan hormonların aortik düz kas hücrelerini

epigenetik olarak nasıl etkilediği değerlendirilerek, kardiyovasküler sistem üzerine yapılmış yetersiz sayıdaki epigenetik çalışmalar konusunda literatüre yeni bilgiler kazandırılması amaçlanmıştır.





## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Düz Kas Hücreleri

Damarların, solunum sistemindeki hava yollarının, ürogenital sistemin, sindirim kanallarının önemli bileşeni olan düz kas hücreleri, bir organın boyutunu değiştirmek veya hareketlerini sağlamak için kasılıp gevşer. Lümeni olan yapıların etrafını saran düz kas hücrelerinin özellikleri organın fonksiyonuna ve taşıdığı mekanik yüke göre değişiklik gösterir. Küçük kan damarlarının duvarında 20 µm ve bağırsak duvarında 200 µm olabilirken gebelikte uterus 500 µm'ye kadar büyüyebilmekle beraber uzunlukları tipik olarak 40-60 µm ve çapı çekirdek bölgesinde 2-10 µm'dir. Kasılmamış halde olan düz kas hücreleri genellikle ince konik uçlu, uzun iğsi hücrelerdir ve nükleusları hücrenin merkezinde bulunur. Mitokondriya, granüllü endoplazmik retikulum sisternaları, serbest ribozomlar, glikojen granülleri ve Golgi aygıtı gibi organeller ve inklüzyonlar nükleusun iki ucunda yoğunlaşmış bir şekilde bulunur. Bu hücreler, aralarında iletişim ve mekanik bağlantıları sağlamak için oluklu bağlantılarla birbirine bağlıdır. Bu bağlantılardan küçük moleküller ve iyonlar geçerek düz kas demetinin tamamının kasılmasını sağlayan iletişimi oluşturur (3).

Düz kas hücreleri aktin ve tropomyozin gibi ince filamentlerden, miyozin II içeren kalın filamentlerden ve desmin ve vimentin ara filamentlerinden oluşan hücre iskeletine sahiptir. Hücrelerin sitoplazması aktin ve miyozin hücre iskeleti elemanlarından zengin olduğu için rutin Hematoksilen & Eosin boyasıyla eosinofilik olarak boyanır. Düz kas hücrelerinin çizgili kas hücrelerindeki gibi bir T sistemi yoktur. Bunun yerine kaveola denilen çok sayıda hücre zarı invajinasyonuna sahiptir. Kaveolaların Ca<sup>++</sup>'un hücelere girdiği bölgelerde olduğu ve altındaki granülsüz endoplazmik retikulum ile birlikte bulunan veziküllerin Ca<sup>++</sup>'u sitoplazmaya ilettiği düşünülmektedir. Aynı zamanda kaveolalar hücrenin yüzey/hacim oranını arttırmaktadır (3, 4).

Düz kasın kontraktil aktivitesi hormonlar, otonom sinirler ve çeşitli ilaçlar gibi faktörlerle kontrol edilebilir. Kalp kası ve iskelet kasında olduğu gibi düz kas kasılması

kalsiyum bağımlıdır ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artması düz kasın kasılmasına neden olmaktadır (3). Damar duvarındaki farklanmış düz kas hücreleri normalde sessiz halde düşük proliferasyon ve matriks sentez oranına sahiptir. Bu hücreler kendine özgü gen ifadesi sayesinde kasılı haldeki fenotipin vasküler tonusunu ve kasın genişliğini ayarlayabilir (4, 5). Düz kas plazma zarı (sarkolemma) voltaj kapılı  $Ca^{++}$  kanalları içerir. Ayrıca düz kasta  $Ca^{++}$  için depo görevi gören hücre içi endoplazmik retikulum (sarkoplazmik retikulum, SR) membran ağı bulunur ve uyarıcı hormonlar, nörotransmitter maddeler ya da ilaçlar plazmadaki reseptörüne bağlandıklarında sarkoplazmik retikulumdan miyoplazmaya kalsiyum salınabilir (3).

Düz kas hücreleri düzenli olarak çoğalan hücre popülasyonuna sahiptir ve hasar durumunda bu hasara mitozla çoğalarak cevap verir. Düz kas hücrelerinin damar hasarından sonraki onarım sürecinde endotel hücreleri ve perisitlerle birlikte bölünüp farklılaşarak yanıt verdiği gösterilmiştir (6).

### **2.1.1. Vasküler Düz Kas Hücreleri**

Histolojik olarak yapılan sınıflandırmaya göre damarlarda üç tabaka ayırt edilir. Bu tabakalar, dokunun en dışında bulunan tunika adventisya tabakası, orta kısımdaki tunika media ve lümeneye yakın kısımdaki tabaka olan tunika intima'dır.

Lümeni döşeyen en iç kısımdaki tek tabakalı yassı, uzun endotel hücreleri, hücrelerin uzun eksenleri kan akım yönüne paralel olarak lokalize olmuştur ve alt tabakada bulunan düz kasların kasılıp gevşemesini sağlayan vazoaaktif ajanlar salgılar.

Orta kısımda bulunan tunika media en kalın tabakayı oluşturur ve bu tabakada çok sayıda düz kas hücresi bulunmaktadır. Düz kas hücreleri elastik lamellerle birbirinden ayrılmış halde bulunur ve bu hücreler tabakalar halinde düzenlenmektedir. Hücreler iğ şeklindedir ve nükleusları uzundur. Birbirine oluklu bağlantılar ile bağlıdır ve bağlantılar dışında kalan alanlar bazal (eksternal) lamina ile çevrelenmiştir. Bu tabakada fibroblast bulunmamaktadır ve düz kas hücreleri kollajen ve elastin gibi ekstraselüler matriks ürünlerini sentezler.

Bu tabakada bulunan düz kas hücreleri, damarın en iç yüzeyini döşeyen entotel (tek tabakalı yassı epitel) hücreleri tarafından sentezlenen fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor, FGF) ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (platelet-derived growth factor, PDGF) gibi büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalabilir (proliferasyon) ve tunika intima tabakasına göç edebilir (migrasyon). Bu olay normal fizyolojik koşullarda duvarın onarımına katkıda bulunurken, patolojik durumlarda duvarın kalınlaşmasına neden olarak ateroskleroz gözlenir.

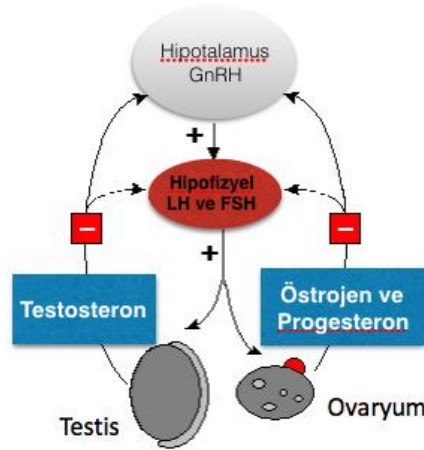
Ateroskleroz, lipidlerin, kanın diğer yapı taşlarının ve fibröz dokunun lokal birikimi sonucu arter duvarının tunika intima ve tunika mediya tabakasının yapısında gözlenen değişikliklerin bir kombinasyonu olarak tanımlanır (7). Arter duvarında meydana gelen bir hasar durumu burada bulunan endotelial hücrelerde fonksiyon bozukluğuna neden olur ve bu da düz kas hücrelerinin migrasyonunu ve proliferasyonu uyarır. Düz kas hücrelerinin en yüksek proliferasyon aktivitesi hasardan bir kaç gün sonra gerçekleşir. Bu durumu izleyen süreçte yaklaşık bir hafta sonra matriks formasyonları gözlenir ve hasarın uzun süre devam etmesiyle damar lümeni tıkanır ve lümen içindeki kan akımı normal olarak gerçekleştirilemez (8).

Aterosklerozun ilk aşamalarında endotelin altında, içi lipid ile dolu hücreler gözlenirken bu durum histolojik incelemelerde de tespit edilebilir. Daha sonraki aşamalarda arterin yapısı lökosit ve lipoprotein birikmesiyle değişime uğrar. Bu durum damarın tunika intima tabakasında yağ, kolesterol, fibrosellüler yapılar içeren aterosklerotik plak (aterom) oluşumuna ve dolayısıyla damar lümeninde daralmaya neden olur (9, 10). Aterosklerozda, düz kas hücre proliferasyonları uzun süreli sessizlik dönemleri arasında kısa süreli hızlı proliferasyon dönemleriyle karakterizedir (11).

Vasküler düz kas hücreleri, kolesterolün hücre içine alınmasıyla olduğu kadar migrasyon, proliferasyon, matriks sentezi, apoptoz ve inflamasyon ile aterosklerotik plak oluşumuna da neden olmaktadır (12). Ayrıca, diyabet, hipertansiyon ve dislipidemi gibi başlıca kardiyovasküler risk faktörlerinin, vasküler düz kas hücrelerinin fenotipini belirgin bir şekilde etkilediği ve dahası aterosklerozun başlaması ve ilerlemesi için vasküler düz kasların önemli olduğu bilinmektedir (12, 13).

## 2.2. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH)

FSH,  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirinden oluşan heterodimerik glikoprotein yapıda bir hormondur ve ön hipofizde (pitüiter bezin anterior lobu) sentezlenir (14). FSH'nin  $\alpha$  zinciri 89 aminoasitten oluşur ve aktif değildir.  $\beta$  zinciri ise 115 aminoasitten oluşmaktadır ve biyolojik özgülük bu zincire aittir. Ön hipofizin yaklaşık %10'unu oluşturan, eksantrik yerleşimli nükleusu olan, oval şekilli ve küçük parankimal hücrelerden üretilir ve bu hücreler pars distalisin her yerinde dağınık halde bulunur. Hipotalamustan salgılanan gonadotropini serbestleştirici hormon (gonadotropin releasing hormone, GnRH), ön hipofizden FSH, luteinleştirici hormon (luteinizing hormone, LH) ve prolaktin salınımını uyarır (Şekil.2.1). Bu hormonlar sistemik kan dolaşımına geçer ve hedef organdaki reseptörüne bağlanarak hücrel reaksiyonu başlatır. FSH, dişi üreme sisteminde, ovaryumlardaki foliküllerin gelişiminden ve ovulasyondan sorumlu olduğu gibi erkek üreme sisteminde, testislerdeki Sertoli hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak Sertoli hücrelerinin androjen bağlayan protein (androgen-binding protein, ABP) üretmesini sağlar ve bu sayede üreme süreçlerini düzenler (15).



Şekil.2.1. FSH ve testosteronun hormonal düzenlenmesi (16)

Erkek ve dişi üreme sisteminde etkili olduğu bilinen FSH'nın, kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisini gösteren ve/veya vasküler düz kas metabolizması ve proliferasyonu üzerindeki etkileri ile ilgili yeterli sayıda çalışmaya rastlanmadı.

Yetişkinlerde ovaryumdaki granuloza hücrelerinde ve testisteki Sertoli hücrelerinde eksprese edildiği bilinen FSH reseptörünün düşük düzeyde ovaryum ve testis endotelial hücreleri tarafından da eksprese edildiği bilinmektedir (17-20). Ayrıca *in vitro* koşullarda yapılan bir çalışmada insan miyometriyal düz kas hücrelerinin FSH reseptörü içerdiği ve insan koryonik gonadotropin (hCG, human chorionic gonadotropin) ve LH ile birlikte uygulanan FSH'nın bu hücrelerde mitojenik yanıt oluşturduğu bildirilmiştir (21). Prostat, meme, kolon, pankreas, mesane, akciğer, karaciğer, mide, testis ve ovaryum kanseri hasta dokularından alınmış örneklerle yapılmış bir çalışmada bu tümörleri besleyen damarlar incelenmiş ve tümörlerin periferinde yerleşim gösteren kan damarlarının endotel hücrelerinin FSH reseptörü eksprese ettiği gösterilmiştir (22).

### 2.3. Testosteron

Testosteron ( $C_{19}H_{28}O_2$ , 17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-one), kan dolaşımında hem erkekte hem de kadında bulunan önemli bir androjendir. Molekül ağırlığı 288.43 gr/mol ve yarılanma ömrü 1-12 gündür. Erkekte, testosteronun esas üretim yeri testisteki Leydig hücreleridir. Kalan kısmı az miktarda adrenal bezden ve diğer bazı lokal hücrelerden de üretilmektedir (23, 24). Normal erişkin bir erkekteki testosteron sekresyon hızı 4-9 mg/gün'dür (13.9-31.2 nmol/gün) ve vücutta salınımı sirkadyen ritme bağlı olarak değişiklik gösterir. Erişkin erkeklerde kandaki testosteron konsantrasyonu 10-35 nmol/L'dir. Dişilerde ise bu oran yaklaşık 1.0 nmol/L'dir (25, 26). Testosteron, FSH ile beraber gametogenez üzerinde etki göstermektedir (26). Kan dolaşımındaki testosteronun büyük bir kısmı serum proteinlerine bağlıdır ve bu proteinler esas olarak seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) ve albümindir. Testosteronun yalnız % 1-2'si kanda serbest olarak bulunur (25). Dolaşımdaki testosteronun çok az bir miktarı östrojene dönüştürülür, fakat çoğu 17-ketosteroidlere dönüştürülüp idrarla atılır (26). Testosteron dişilerde hem ovaryumdan hem de sürrenal bezden az miktarda (yetişkinde kan konsantrasyonu <3,5 nmol/L) salgılanan prekürsor moleküllerin periferik dokularda testosterona dönüşümü ile oluşmaktadır (24-26). Erkeklerde yaşla birlikte testosteron kan konsantrasyonu azalmaya başlar. Testosteron eksikliği (testosteron kan konsantrasyonu <7 nmol/L) kemik ve kas kitlesinde azalma, yağ kitlesinde artış ve libidoda azalma gibi birçok klinik semptomların görülmesine neden olabilir (27).

Seks hormonları hem dişilerde hem de erkek cinsinde de yaşla birlikte azalmaya başlamasına rağmen koroner arter hastalığı olan erkeklerde ortalama yaşam süresini, kadınlarınkine oranla 8 yıl azaltmaktadır ve koroner arter hastalıkları aynı yaşta menopoz öncesi kadınlardakine oranla erkeklerde daha sık görülmektedir. Bu durumun erkeklerde androjen varlığı ve östrojen eksikliği gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (2, 28, 29). Testosteronun dehidrottestosteron (DHT) ve/veya 17  $\beta$ -estradiol'e dönüşmesi bu konu hakkında daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Genel olarak, erkek cinsiyetinin koroner kalp hastalığı için pozitif bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (30).

Erkeklerde koroner arter hastalığı (KAH) görülme sıklığı daha yüksek oranda gözlemlendiği için ve anabolik steroidler, özellikle atletlerde gözlenen miyokardiyal iskemi

ve hipertansiyonla ilişkili bulunduğu için ekzojen ve endojen androjenlerin artan kardiyovasküler hastalık riskiyle ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (31, 32). Ancak yapılan son çalışmalar testosteronun kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir (31, 32).

Düşük testosteron düzeyi (hipotestosteronemiya) ile ilişkili koroner arter hastalıklarında ateroskleroz gibi birçok farklı risk faktörü bulunmaktadır (33-35). Testosteronun ateroskleroz gibi koroner arter hastalıkları üzerindeki etkisi çok fazla bilinmemekle birlikte bu konu ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. Yapılan çalışmalarla testosteronun ateroskleroza karşı koruyucu etkisinin olduğu (36, 37), düşük testosteron seviyesine sahip erkeklerde ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkma riskinin daha fazla olduğu (34, 35, 38) ve koroner arter hastalığı olan düşük testosteron oranına sahip erkeklerde ateroskleroz görülme sıklığının yüksek olduğu bildirilmiştir (38).

Bazı klinik çalışmalarda, koroner arter hastalığı olan erkeklere testosteron tedavisinin anjiyografi sonuçlarına bakılarak vazorelaksasyonda olumlu sonuçlar verdiği rapor edilmiştir (39). Klinik çalışmalar, akut testosteron tedavisinin koroner arter hastalığı olan erkeklerde 30 dakika içinde miyokard iskemisini azalttığını göstermiştir. Bulgular testosteronun bu etkisinin doğrudan vazodilatör aktivitesiyle ilişkili olduğunu göstermektedir (40-42). Ancak her ne kadar *in vitro* çalışmalar, testosteronun akut vazodilatör etkisini nanomolar konsantrasyonlarda gösterdiğini savunsa da hayvan çalışmalarında rapor edilen *in vivo* etkilerin çoğunluğu farmakolojik konsantrasyonları (örn. yüksek mikromolar) gerektirmektedir (43). Pek çok farklı tür üzerinde yapılmış organ banyosu deneylerinde testosteronun mikromolar konsantrasyonlarının prekontrakte pulmoner, aortik, mezenterik ve koroner damarlarda dakikalar içinde gevşemeye sebep olduğu gösterilmiştir (43-45). Aksine, kardiyovasküler hastalığı olan kişilerde testosteronun fizyolojik konsantrasyonlarda koroner vasküler akım ve damar çapını hızlı bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir (41). Testosteronun etkisinin araştırıldığı klinik çalışmalar, egzersiz yaptırılmış kardiyovasküler koroner hastalığı olan kişilerde testosteronun potansiyel tedavi edici etkisinin olduğunu belirtmektedir (31, 32, 40). Farmakolojik bulgular, testosteronun damar gevşemesini  $K^+$  kanallarını açarak (40, 45), yüksek  $Ca^{++}$  geçirgenliğinin aktive olmasıyla (46), voltaj hassasiyetiyle (47) ve ATP-duyarlı  $K^+$  kanalları ile sağladığını

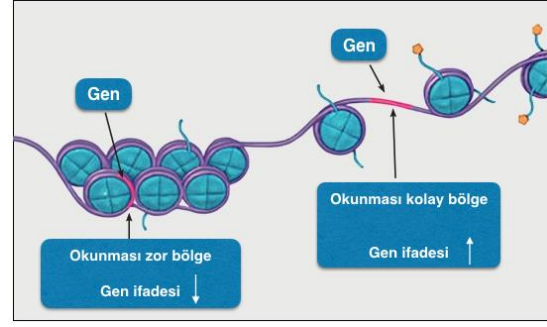
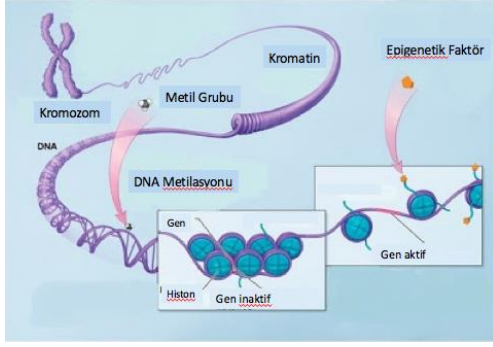
göstermektedir (48).  $Ca^{++}$  kanalı testosteronla antagonist çalışarak damar gevşemesinde etkilidir. Sıçan aortik düz kas hücreleri ile yapılan bir çalışmada, testosteron uygulamasının, L-tipi  $Ca^{++}$  kanal akım inhibitör (L-type  $Ca^{++}$  channel current inhibitors,  $I_{Ca-L}$ ) aktivitesini hızlı bir şekilde durdurduğu (49, 50), ancak inozitol 1,4,5- trifosfat ( $IP_3$ ) kaplı kalsiyum kanallarının aktivitesini durdurmadığı bildirilmiştir (49). Ayrıca düz kas hücreleri üzerine yapılan çalışmalarda testosteron konsantrasyonuna bağlı olarak testosteronun proliferasyonu durdurduğu bildirilmektedir (51-53).

## 2.4. Epigenetik

Epigenetik, DNA dizisindeki değişimlerle açıklanamayan, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile kalıtsal ve kazanılmış gen fonksiyonundaki değişiklikleri içerir. Epigenetik değişikliklerin en önemli özelliği, DNA dizisini (nükleotid sekansı) değiştirmemesidir. Epigenetik terimi ilk olarak, 1942'de Conrad Waddington tarafından "epigenetik genetiği" olarak kullanılmıştır (54). Son yıllarda yapılan çalışmalar, epigenetik olayların önemini ortaya koymuş ve özellikle embriyonik dönemde gözlenen hücre farklılaşması sırasında gen ifadesindeki değişikliklerde önemli etkileri olduğunu göstermiştir. Bu değişiklikler, DNA'nın seçici olarak, farklı epigenetik durumlarda bulunan farklı kromatin yapılarına paketlenmesiyle ortaya çıkmaktadır.

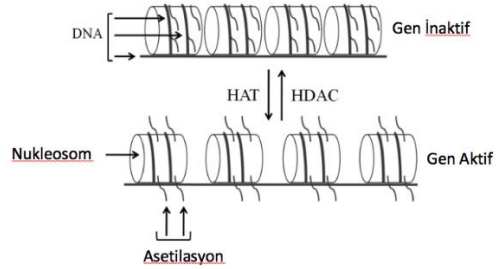
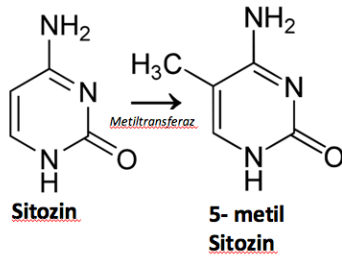
Belirli ve gerekli zamanlarda ifade edilen yaklaşık 23000 genin kontrolünü sağlayabilmek için DNA'nın histon protein oktomerleri etrafına sarılıp paketlenmesi gerekmektedir. Bu şekilde bir düzenlenme nükleozom yapılarını oluşturur ve bu nükleozomlar kromatin olarak organize edilir (Şekil 2.2). Gen ifadesinin kontrolü kromatin yapısındaki değişikliklerle sağlanır ve kromatin yoğunlaşıp genler inaktive olduğunda o genin ifadesi durdurulur yani gen sessizleşir ya da kromatin yapısı açıldığında genler aktifleşir. Bu durumun birbirine bağlı ve geri dönüşümlü olduğu düşünülmektedir ve DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonları gibi epigenetik olayların da etkili olduğu bir çok mekanizmayla düzenlendiği kabul edilmektedir (Şekil 2.2).





Şekil 2.2. DNA'nın düzenlenmesi ve gen ifadesinin kontrolü (55)

Epigenetik mekanizmalar DNA'yı doğrudan etkileyenler ve dolaylı yoldan etkileyenler (posttranskripsiyonel mekanizmalar) olmak üzere değerlendirilir ve üzerinde en çok çalışılmış mekanizmalar DNA metillenmesi ve histonun N terminal ucu post translasyonel modifikasyonlarıdır (56, 57). Bu olaylarda DNA metiltransferazlar (DNMT), histon deasetilaz (HDAC), histon asetiltransferazlar (HAT), histon metiltransferazlar (HMT) ve metil-bağlayıcı protein (methyl-binding protein, MECP2) gibi bir çok enzim görevlidir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. DNA'ya metil grubunun eklenmesi (DNA metilasyonu) ve histon modifikasyonu (58, 59)

DNA metilasyon ve histon modifikasyon mekanizmalarıyla birlikte nükleozom kaydırma (nucleosome sliding) ve nükleozoma histon varyantlarının eklenmesi gibi ATP-bağımlı kromatin remodellemeleri de epigenetik mekanizmalar arasındadır (60, 61)

Epigenetik modifikasyonlar, mitoz ve hatta mayoz bölünmelere rağmen varlığını koruyabilirken geri dönüşümlü olarak da gerçekleşebilir (62). Ayrıca çevreden gelen uyarılardan da yüksek derecede etkilenir. Hücrenin normal epigenetik olaylarında bir bozukluk olduğunda ortaya çıkan gen ifadesindeki değişiklikler çeşitli klinik sorunların oluşmasına yol açabilir. Epigenetik mekanizmaların anlaşılması, genetik ve çevresel kaynaklı risk faktörlerinin etkisiyle oluşan ateroskleroz gibi önemli hastalıkların daha iyi anlaşılmasına ve tedavisine yönelik yaklaşımların geliştirilmesinde önemlidir (63).

Epigenetik değişikliklerin hastalıklarla olan ilişkisi üzerine yapılan çalışmaların çoğu kanser üzerine odaklanmıştır ancak kardiyovasküler hastalıklarda epigenetik mekanizmaların rolü hakkında yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Yaşam koşulları, beslenme alışkanlığı ve genetik altyapı gibi risk faktörlerinin kardiyovasküler hastalıklarda etkili olduğu uzun yıllardır bilinmektedir ancak bu hastalığın bütün özellikleri henüz tam olarak anlaşılammıştır (64). Erken yaşlarda çevresel etki ile uyarılan epigenetik varyasyonun daha sonraki yıllarda kardiyovasküler sağlığı etkileyebileceği düşünülmektedir (65, 66).

#### **2.4.1. DNA Metilasyonu**

DNA metilasyonu, DNA'nın 5' ucundaki karbonuna DNA metiltransferazlar aracılığı ile bir metil grubu eklenmesi (5-metilsitozin, 5mC) sonucu oluşan kovalent bir modifikasyondur. DNA metillendiği zaman (5mC) o bölgedeki gen ekspresyonu baskılanırken demetile olduğunda (5hmC) genin ifadesi tekrardan gerçekleşmektedir. DNA üzerinde Sitozin ve Guanin baz çiftlerinin yoğunlaştığı CpG bölgeleri (CpG adaları) bulunmaktadır ve genellikle metillenmenin gerçekleştiği alanlar buralardır. Bu bölgeler çoğunlukla DNA'nın 5' ucunda (sitozinin C5 pozisyonu) bulunur ve kodlanmayan genomik bölgelerdir. Memelilerde DNA'nın promoter bölgelerinde

yaklaşık %60-70 oranında CpG adaları bulunmaktadır ve bu bölgeler çoğunlukla metilasyonun az olduğu hipometillenmiş alanlardır (67, 68). Ancak buna rağmen metillenmenin fazla olduğu (hipermetilasyon) promoter CpG adalarının da bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (67, 69). Kanser oluşumunun erken aşamalarında genomik hipometilasyon gözlemlendiği bilinmektedir ve bu durumun transformasyon, tümör gelişimi ve onkogen ekspresyonu gibi durumlarla bağlantılı olduğu bilinmektedir (70-73).

Memeli hücrelerinde DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b olmak üzere üç adet DNMT tanımlanmıştır. DNMT1, DNA'nın replikasyonu sırasında DNA'da bulunan mevcut metilasyonu korurken, DNMT3a ve DNMT3b *de novo* metilasyonu gerçekleştirir. DNMT3a ve DNMT3b ilk olarak embriyogenezde gösterilmiştir ancak hücrelerde embriyogenez dışında da önemli bir işlevi olduğu artan çalışmalarla bildirilmektedir (74). Ayrıca DNMT genleri silinmiş farelerle yapılan çalışmalarda DNA metilasyonunun embriyonik gelişimde ve kanser biyolojisinde önemli bir etkisi olduğu bildirilmiştir (75). Aortik düz kas hücreleriyle yapılan *in vitro* çalışmalarda bu hücrelerin ilk replikasyonlarında belirgin bir şekilde hipometilasyon gözlemlendiği bildirilmiştir (76, 77). Ayrıca en ileri aşamadaki aterosklerotik lezyonlara sahip hastaların genomlarında hipometilasyon görüldüğü yapılan son çalışmalarda gösterilmiştir (76). DNA hipometilasyonunun, aterosklerotik lezyon oluşum aşamalarındaki gen ekspresyon farklılıkları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar hipometilasyonun düz kas proliferasyonunun bir sonucu olarak mı gözlemlendiğinin yoksa bu hücrelerin proliferatif aktivitesi artıcı yönde bir etkisinin mi olduğunu açıklayabilmek üzerine yoğunlaşmıştır (78). Diğer bazı çalışmalarda ise araştırmacılar, DNA metilasyonunun düz kas hücre farklanmasıyla ilişkili olabileceğini belirtmektedir (76, 77). DNA metilasyonunun ateroskleroz ile ilişkisiyle ilgili yapılan çalışmalarda artan DNMT1 ekspresyonunun aterosklerotik lezyonlardaki hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (76).

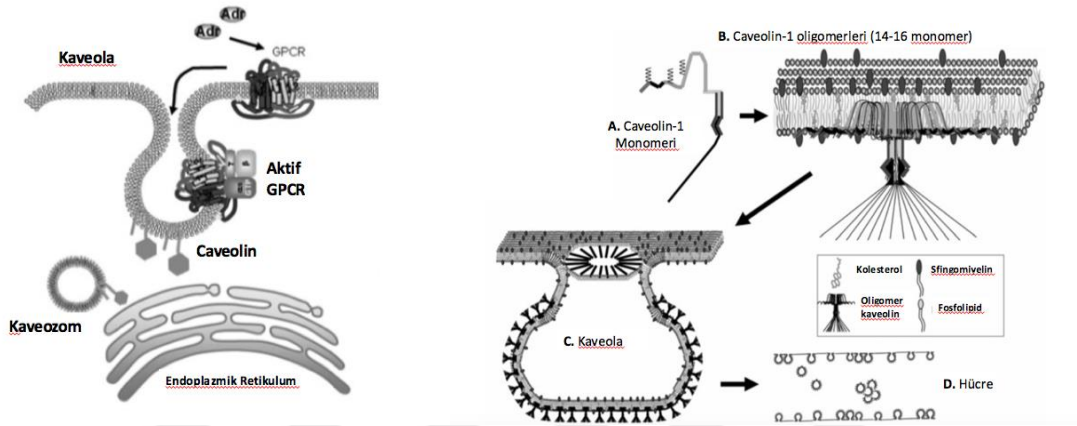
## 2.5. Kaveolin

Kaveola, temel olarak kolesterol ve sfingolipidlerden oluşan, plazma zarının hücre içine doğru yapmış olduğu 50-100 nm'lik invajinasyonlarıdır (Şekil 2.4) (79). Kaveolanın yapısında caveolin integral zar proteinleri bulunmaktadır. Modern elektron mikroskopik tekniklerin gelişmesiyle kaveolaların yapısı daha da iyi aydınlatılmaya başlamıştır. Kaveolalar, içerdikleri lipid yapıları ve boyutları yüzünden lipid rafların bir alt üyesidir ancak bütün lipid raflar kaveola yapısında değildir (80). Yapılarında protein kinaz C, tirozin kinaz, G-protein eşlenik reseptör (GPCR) ve endotelial nitrik oksit sentaz gibi çeşitli sinyal moleküllerini de içerirler. GPI-bağlanmış (GPI-linked) proteinler, GPCR gibi çeşitli transmembran protein reseptörleri, insülin reseptörleri ve  $\beta$  adrenerjik reseptörler, kaveolanın içe bakan taraflarında bulunurken (Şekil 2.4), dışa bakan kısımda G proteinler, kolesterol bağlı (cholesterol binding) proteinler, caveolinler ve tirozin kinazın Src ailesi üyeleri bulunmaktadır (81-83). Kaveolaların ve caveolinlerin görevleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır ancak caveolinlerin sinyal iletimi, endositoz ve transsitoz arasında değişen bir çok fonksiyonu olduğu bildirilmektedir (84-86). Ayrıca, hücrelerde caveolin eksikliği varsa aynı zamanda kaveolaların da az miktarda gözleendiği bilinmektedir. (80).

Kaveolalar ilk olarak 1953 yılında Yamada tarafından safrakesesi epitel hücrelerinin plazma zarında keşfedilmiştir ve 1961'de Palade tarafından da gösterilmiştir. Kaveolalar, daha sonraki yıllarda tüm hücre tiplerinde bulunmuş ve klatriin kaplı olmayan hücre zarı invajinasyonları olarak da tanımlanmıştır (87, 88).

Kaveolin gen ailesi CAV-1, CAV-2 ve CAV-3 olmak üzere üç farklı üyeden oluşur. Bu genler sırasıyla kaveolin-1 (Cav-1), kaveolin-2 (Cav-2) ve kaveolin-3 (Cav-3) (kaveolin protein ailesi) proteinlerini kodlar. Cav-1 ve Cav-2 proteinleri, genellikle birlikte eksprese olurlar ve epitelyal, endotelial ve düz kas hücrelerinde eksprese olduğu kadar özellikle adipositler ve fibroblastlarda bol miktarda bulunmaktadır. Diğer bir yandan Cav-3 proteini, kas dokuya spesifiktir ve bu yüzden sadece düz kas, kalp kası ve iskelet kasında eksprese olur (80). Kaveola ve Cav-1 arasında önemli bir ilişki bulunmaktadır. Kaveolalar Cav-1 proteininin varlığı ile karakterize olur. Kaveola yapısının oluşmasında Cav-1 proteininin gerekli olduğu gösterilmiştir ve Cav-1 protein eksikliği olan farelerde kaveola eksikliği de gözlenmiştir (89-91). Kaveolin proteinleri

yüksek molekül ağırlıklı homo-oligomerik ve/veya hetero-oligomerik yapıda ve hücre membranının sitoplazmaya bakan kısmında N- ve C-terminal yüzleri ile farklı topolojik yapıda moleküllerdir (Şekil 2.4) (80). Cav-1 ve Cav3 homo-oligomer yapıyı oluştururken, Cav-1 ve Cav-2 hetero-oligomer yapıyı oluşturmaktadır (92).



Şekil 2.4. Kaveola ve kaveolin yapısı (80)

Kaveolinlerin aterosklerozun gelişimi sırasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (93). Ateroskleroz, çevresel ve/veya genetik etmenlerden kaynaklanan, diyabet, kolesterol, yüksek tansiyon ve obezite gibi hastalıkların bir sonucu olarak gözlenebilen kompleks bir hastalıktır. Kaveolalar ve Cav-1 ekspresyonu, aterosklerozun gelişiminde rol alan endotel hücreleri, makrofajlar ve düz kas hücreleri gibi çoğu hücrede bulunmaktadır. Kaveolalar, hücrenin kolesterol dengesinin sağlanmasında ve bir çok sinyal yolağında görev yaptığı için bu yapıların aterosklerozda büyük bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, ateroskleroz oluşum basamaklarında rol alan hücrelerin tipine göre Cav-1'in ya pro-aterojenik ya da anti-aterojenik etkisinin bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca kaveolin protein eksikliği olan fareler üzerinde yapılan çalışmalarda bozulmuş anjiyojenik tepkiler ve uyarılara anormal vazokonstrüktif yanıtlar verdiğini göstermiştir (80). Kaveola genel olarak morfolojik yapısı nedeniyle

şişe şekilli (flask-shaped) yapılar olarak tanımlanır. Ancak bu şekilde görünmesi içeriğindeki kolesterol miktarına bağlıdır. Kaveolaların dış zarında bulunan kolesterolün azalması, kaveolaların endoplazmik retikuluma ve/veya Golgi'ye taşınmasına neden olur (94).

### 2.5.1. Kaveolin-1

Kaveolin protein ailesinin majör proteini olan Cav-1, farklı bir topolojik yapıya sahiptir ve bu görünüm saç tokasına benzer yapı (hairpin-like structure) olarak isimlendirilir (Şekil 2.4) (95). Bu yapısal özelliği sayesinde Cav-1, kaveolanın hücre içindeki bir çok görevinde rol alır (96, 97). Kaveola'nın major dış proteini olan Cav-1, CAV 1 geninden kodlanır. Molekül ağırlığı 22 kDa'dur ve Src kinazın substratı olan bir fosfoproteindir (96, 98). N- ve C-terminal alanları hücrenin sitoplazmik yüzüne bakan Cav-1 proteininin 178 aminoasitten oluşan Cav-1 $\alpha$  (24 kDa) ve 148 aminoasitten oluşan Cav-1 $\beta$  (21 kDa) olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır (99).

Cav-1'in, hücrelerde bir çok fonksiyonu bulunmaktadır. İntegrin sinyalinde görev aldığı gösterilmiştir. Cav-1'in tirozin aminoasitleri fosforillenmiş formu, fokal adezyonlarla kolokelize halde bulunmaktadır ve bu formdaki Cav-1, hücrenin migrasyonunda görev yapar. Ayrıca, *in vitro* koşullarda da Cav-1'in down-regülasyonu hücre migrasyonunda sorunlara yol açar (80). Kaveola ve Cav-1 insülin sekresyonu, insülin reseptörü aracılı sinyalde ve muhtemelen diyabette rol oynamaktadır (100). Kaveola ve diyabet ilişkisini anlamak için yapılan çalışmalarda, kaveola eksikliği ve/veya fonksiyon bozukluğu olan insan ve farelerde insülin direnci olduğu gösterilmiştir fakat insanlar üzerinde yapılan çoğu çalışmada kaveolaların obezite ve tip 2 diyabete bağlı insülin direncinin patofizyolojisindeki rolü ile ilgili kesin bir ilişki gösterilememiştir (80). Obeziteye bağlı insülin direncine sahip yaşlı erkek fareler üzerinde yapılan bir araştırmada, yağ ve kas dokularında Cav-1 ekspresyonunun fark edilir seviyede düşük olduğu gösterilmiştir (101). Kaveolalarda lokalize, bir transmembran protein reseptörü olan GPCR'lerin reseptör tiplerinden biri olan GPR40, insülin sekresyonunda görev alır. GPR40, uzun zincir yağ asitlerine (long chain fatty

acids) bağlanarak insülin sekresyonunu uyarır (100). Ayrıca insülin aracılı glikoz taşıyıcısı (transporter) olan GLUT4, hücrelerde insülinin uyardığı translokasyon 'dan sonra plazma membranındaki kaveolalarda lokalize olmaktadır (80). Cav-1, insülin sinyal yollarında rol oynadığı gibi kardiyak fonksiyonlarda da önemli bir görev alır (102-104). Cav-1 null fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, bu farelerde kardiyak hipertrofi gözlenmiş ve normal fenotipli farelere göre yaşam sürelerinin %50 daha az olduğu bildirilmiştir (102). Ancak Cav-1'in görevleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Yapılan çalışmalar düz kas hücre metabolizmasının çevresel ve/veya genetik gibi birçok faktörden etkilenebileceğini göstermiştir. Çalışmamızda sıçan aortik düz kas hücreleri kullanılarak damar duvarında bulunan düz kas hücrelerinin FSH ve testosteronun farklı konsantrasyonlarına nasıl cevap verdiği ve bu hücrelerin farklı mikroçevrelerdeki epigenetik yanıtları araştırılmıştır. Patolojik durumlarda vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunun uyarıldığı ve ateroskleroza neden olduğu bilinmektedir. Ancak bu durumun nedenleri çok iyi anlaşılamamıştır. Bu tez çalışması ile aortik düz kas dokusunun genomuna ait özelliklerin veya proliferasyon gibi özelliklerinin daha iyi bilinmesi ile az sayıda olan literatür bilgisine yeni bir kaynak oluşturulması amaçlanmıştır.

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Kullanılan Hücreler

Çalışmamızda kullanılan Sprague Dawley türü sıçan aortik düz kas hücreleri (Rat AoSMCs, Lonza, Cat No:R-ASM-580) ticari hücre hattı olarak satın alınmıştır ve düz kas aktin proteini için  $\geq 95$  pozitifdir. Bu hücreler, anjiyogenez, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık çalışmalarında kullanılmaktadır (105).

### 3.2. Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü

Sıvı azot içerisinde kriyo vialde donmuş halde bulunan hücreler

1. Hızlı bir şekilde 37 °C'lik su banyosuna alındı ve yaklaşık 1-1,5 dakika, hücreler çözülene kadar bekletildi.
2. Su banyosundan alınan kriyo vial %70'lik etanol ile silindikten sonra laminar kabine alındı.
3. Çözünen hücrelere yavaş bir şekilde birkaç kez pipetaj yapıldı ve kriyo vial içindeki hücreler daha büyük bir tüpe alındı.
4. Üzerine hücre içerikli süspansiyonun kendi hacmi kadar (1:1) 37 °C'deki katkılı medyum ilave edildi.
5. Hücre sayımı yapıldı.
6. 5000 hücre/cm<sup>2</sup> olacak şekilde ekim yapıldı.

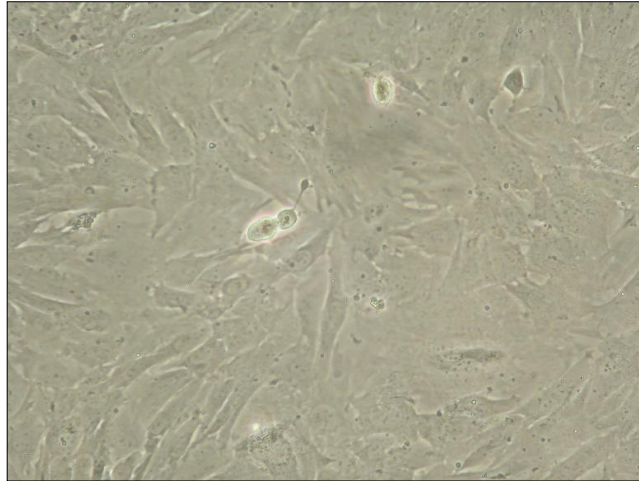
Hücreler %20 inaktive fetal sıçır serumu (FBS, Lonza, 100ml, 14-503E), %1 pensilin ve streptomisin, %1 amfoterisin-B içeren DMEM/F12 medyumunu (Lonza, 1L, BE04-687Q) ile 37 °C sıcaklıkta ve %5 karbondioksit (CO<sub>2</sub>) içeren inkübatörde kültüre edildiler. Hücrelerin medyumunu 3 günde bir değiştirildi. %80-90 konfluense ulaşan hücreler pasajlandı.



Pasajlama işlemi için;

1. Hücrelerin medyumları çekildikten sonra kalsiyum ve magnezyum içermeyen DPBS ile 3 kez yıkandı.
2. Bütün yüzeyi kaplayacak kadar %0,25 trypsin-EDTA solusyonu içinde 2-5 dakika 37°C'de inkübe edildi.
3. Tutunduğu yüzeyden ayrılan hücreler 15 ml'lik Falcon tüplere alındı ve tripsin aktivitesini durdurmak için üzerlerine eşit hacimde FBS'li medyum eklendi.
4. Tüplerin kapakları sıkıca kapatılarak 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Tüpteki süpernatant atıldı ve hücrelerin üzerine 1 ml medyum ilave edildi.
6. Hücrelerden 20 µl örnek alınarak aynı hacimde tripan mavisi ile boyandı ve CEDEX XS hücre sayım cihazı ile sayımları yapıldı.
7. Sayım işleminden sonra hücreler cm<sup>2</sup>'ye 3000 hücre olacak şekilde 25 cm<sup>2</sup>'lik yüzey alanına sahip (T25) flaslara ekildi.

İlk pasajdan sonra hücreler hızla çoğaldı ve yaklaşık 5. günde tüm flasklar konfluense ulaştı (Şekil 3.1). Deneyleerde 3-8 (P3-P8) arasındaki pasajlar kullanıldı.



**Şekil 3.1.** Konfluent olan sıçan aortik düz kas hücrelerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü (600X)

### **3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Hormon Konsantrasyonlarının Hazırlanması**

Çalışmamızdaki gruplar her grupta 4 denek olmak üzere şu şekilde oluşturulmuştur:

- 1- Kontrol grubu: Hormon içermeyen medyumla beslenen hücreler
- 2- Taşıyıcı grup: Testosteron hormonunun çözücüsü olan etanolün diğer gruplarda kullanıldığı en yüksek konsantrasyon olan %0,01 olarak eklendiği grup
- 3- 1 ng/ml testosteron grubu
- 4- 10 ng/ml testosteron grubu
- 5- 100 ng/ml testosteron grubu
- 6- 1 ng/ml FSH grubu
- 7- 10 ng/ml FSH grubu
- 8- 100 ng/ml FSH grubu
- 9- 10 ng/ml testosteron + 1 ng/ml FSH içeren kombine grup
- 10- 10 ng/ml testosteron + 10 ng/ml FSH içeren kombine grup
- 11- 1 ng/ml testosteron +10 ng/ml FSH içeren kombine grup
- 12- 1 ng/ml testosteron + 1 ng/ml FSH içeren kombine grup

### **3.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analizinin Yapılması**

Oluşturulan gruplarda sıçan aortik düz kas hücrelerinin proliferasyonuna testosteron ve FSH hormonlarının etkisini anlamak amacıyla Roche xHÜCREigence RTCA DP cihazı ile 137 saat boyunca hücre canlılık eğrileri değerlendirildi ve kantitatif sonuçlar elde edildi.

Bu amaçla:

1. Cihaza özel e-plate kuyularına medyum ilave edildi.
2. E-plateler cihaza yerleştirildi.
3. Kuyulara hücre içermeyen 50 µl medyum konarak cihazda okutuldu.

4. Laminar kabin içerisinde, hücreler cihazda okutulmadan önce yüzey alanı yaklaşık 1,04 cm<sup>2</sup> olan kuyulara, her birinde 3000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.
5. Hücrelerin tutunması için 24 saat 37<sup>0</sup>C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde bekletildi.
6. Hücreler tutunduktan sonra konsantrasyonları ayarlanmış olan testosteron ve FSH hormonları medyum içinde e-platelerdeki kuyulara ilave edildi.
7. E-plateler cihaza yerleştirildi ve 96 saat boyunca proliferasyon eğrileri takip edildi.
8. Hormon uygulamasından 96 saat sonra deney sonlandırıldı.
9. Sonuçlar istatistik verileriyle birlikte yorumlandı.

Hücrelerin, CEDEX XS hücre sayım cihazı ile sayımları ve Roche xCELLigence RTCA SP cihazı ile proliferasyon oranlarının ölçülmesi işlemi Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (MEİTAM)'da bulunan hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirildi.

Hücre canlılık eğrilerinin değerlendirilmesi aşağıda belirtilen gruplar karşılaştırılarak gerçekleştirildi:

- Kontrol grubu, 1 ng/ml FSH uygulanan grup, 10 ng/ml FSH uygulanan grup ve 100 ng/ml FSH uygulanan grup ile
- Taşıyıcı grubu, 1 ng/ml testosteron uygulanan grup, 10 ng/ml testosteron uygulanan grup ve 100 ng/ml testosteron uygulanan grup ile
- Hormon dozlarının kombine olarak verilmesi sonucu oluşturulan gruplar
  - Taşıyıcı grup, 1 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron ve 1 ng/ml FSH + 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup ile;
  - Taşıyıcı grup, 10 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron ve 10 ng/ml FSH + 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup ile;
  - Taşıyıcı grup, 10 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron ve 10 ng/ml FSH + 1 ng/ml testosteron içeren kombine grup ile;
  - Taşıyıcı grup, 1 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron ve 1 ng/ml FSH + 1 ng/ml testosteron içeren kombine grup ile

### 3.5. İmmünofloresan İşaretleme ve Değerlendirme

İmmünofloresan işaretleme için hücreler her grupta 4 denek olacak şekilde ve her kuyuya 3000 hücre olmak üzere 96 kuyulu petri kaplarına ekildi. Bu işlem her boyama için 24. ve 72. saatlerdeki işaretleme yoğunluğunu incelemek amacıyla iki kez tekrarlandı. Hücrelerin petriye tutunması için 24 saat beklendi. Bu sürenin sonunda deney gruplarına belirlenen konsantrasyonlarda hormonlar eklendi ve 24 saat bekletildi. Diğer grup için ise 72 saat sonunda hormonlar uygulandı. Cav-1 , DNMT1 ve DNMT3a antikorları ile çalışıldı. Bu sürenin sonunda aşağıda belirtildiği şekilde immün işaretleme yapıldı:

1. Hücre medyumları uzaklaştırıldı.
2. Hücreler tuzlu fosfat tamponu (PBS) ile yıkandıktan sonra %0,4 'lük paraformaldehit ile 10 dakika fikse edildi.
3. PBS ile 3'er kez 5 dakika yıkandı.
4. PBS içinde hazırlanmış %1'lik Triton X-100 karışımında 15 dakika permeabilizasyon yapıldı.
5. %1,5'lük sığır serum albümin (BSA) ve %0,1'lik Triton X-100 içeren PBS ile 30 dakika bloklandı.
6. %1,5'lük BSA ve %0,1'lik Triton X-100 içeren PBS içinde dilüe edilmiş primer antikor solüsyonları damlatıldı ve +4°C'de bir gece inkübe edildi. Cav-1 (N-20, Santa Cruz, sc 894) antikoruna 1:100, DNMT1 (K-18, Santa Cruz, sc10221) antikoruna 1:500, DNMT3a (H-295, Santa Cruz, sc20703) antikoruna ise 1:300 oranında dilüe edildi.
7. PBS ile 3'er kez 5 dakika yıkandı.
8. %1 BSA ve %0,1'lik Triton X-100 içeren PBS içinde sekonder (DNMT3a ve Cav-1 için donkey anti rabbit, Alexa Fluor, Life Technologies, A21206 ve DNMT1 için donkey anti goat, Alexa Fluor, Life Technologies, A11055) konsantrasyonları ayarlandı. Her primer için 1:750 oranında dilüe edilmiş florokrom konjuge sekonder antikor ilave edildi ve 90 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyon yapıldı.
9. Karanlık ortamda 3'er defa 5 dakika PBS ile yıkandı.

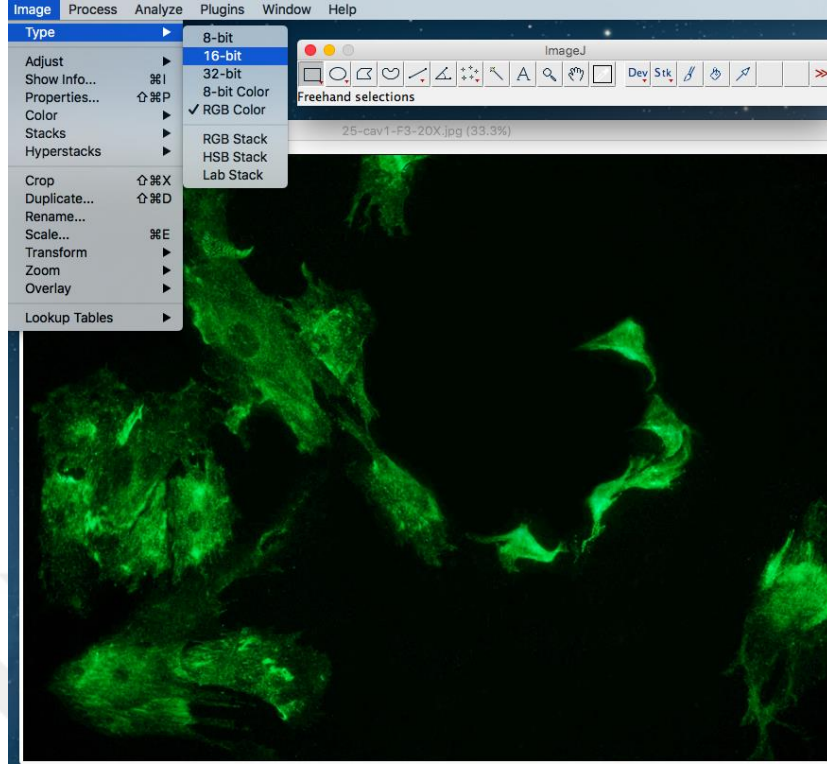
10. 0,1-1 $\mu$ g/ml Hoechst 33342 içeren PBS konularak hücrelerin çekirdekleri de boyandı.

11. Boyanan hücreler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Nikon Ti inverted floresan mikroskopta görüntülendi ve fotoğraflandı.

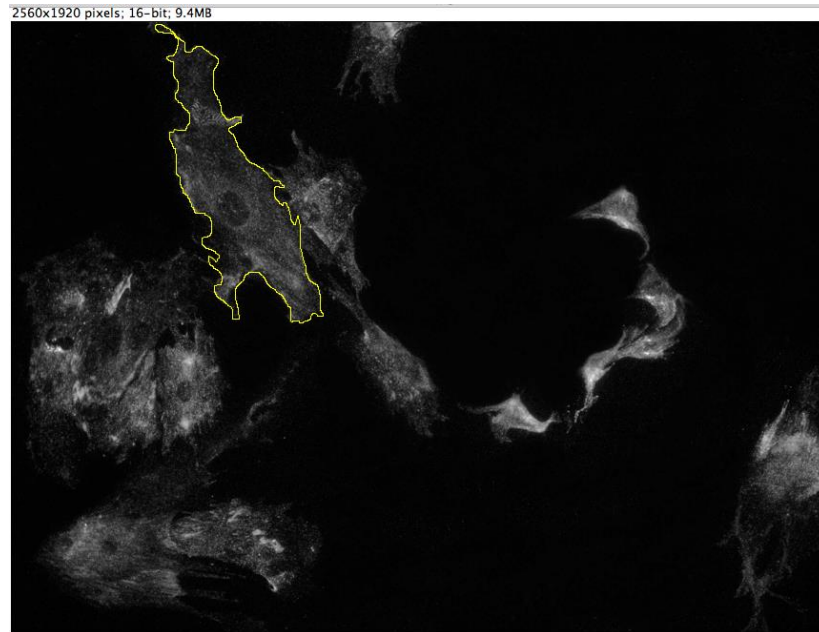
Hücrelere işaretlenme yoğunluğuna ImageJ (National Institutes of Health- NIH, ABD) programıyla skorlama yapıldı ve skorlama sonuçları aşağıdaki gibi değerlendirilerek semi-kantitatif olarak analiz edildi:

Çekilen resimler yukarıdaki yazılım kullanılarak önce 16 bit gri skalaya çevrildi. (Şekil 3.2). Yazılımın “freehand selection” özelliği kullanılarak her kuyudan 20 hücrenin dış sınırları dikkatlice çizildi ve hücreler seçildi (Şekil 3.3). Yazılımın “analyze” menüsündeki “measure” komutu kullanılarak seçilen hücrelerdeki işaretlenme derecesi “piksel yoğunluğu” olarak ölçüldü. Her bir kuyudaki ölçülen tüm hücrelerin minimum ve maksimum işaretlenme yoğunluk seviyeleri sıralandı ve en yüksek değerden en düşük değer çıkarılarak bir işaretlenme aralığı elde edildi. Bu aralık 4 eşit parçaya bölündü ve en düşükten en yükseğe doğru bu parçalara denk gelen hücreler şu şekilde skorlandı:

- 0: İşaretlenme yok
- 1: Hafif işaretlenme
- 2: Orta işaretlenme
- 3: Yoğun işaretlenme



Şekil 3.2. Resimlerin ölçüm için gri skalaya çevrilmesi (200X)



Şekil 3.3. Gri skalaya çevrilen resimler üzerinde hücrelerin işaretlenmesi (200X)

ImageJ programıyla işaretleme yoğunluğunun ortalama değerleri üzerinden H skoru aşağıdaki formüle göre hesaplandı (106).

$$H = (0 \times \%hücre_1) + (1 \times \%hücre_2) + (2 \times \%hücre_3) + (3 \times \%hücre_4)$$

Gruplar arası immüno Floresan boyanma yoğunluklarının karşılaştırılması 24 ve 72. saatlerde olmak üzere her bir antikor için aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Kontrol grubu, 1 ng/ml FSH uygulanan grup, 10 ng/ml FSH uygulanan grup ve 100 ng/ml FSH uygulanan grup ile
- Taşıyıcı grubu, 1 ng/ml testosteron uygulanan grup, 10 ng/ml testosteron uygulanan grup ve 100 ng/ml testosteron uygulanan grup ile
- Hormon dozlarının kombine olarak verilmesi sonucu oluşturulan gruplar
  - Taşıyıcı grup, 1 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron ve 1 ng/ml FSH + 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup ile;
  - Taşıyıcı grup, 10 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron ve 10 ng/ml FSH + 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup ile;
  - Taşıyıcı grup, 10 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron ve 10 ng/ml FSH + 1 ng/ml testosteron içeren kombine grup ile;
  - Taşıyıcı grup, 1 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron ve 1 ng/ml FSH + 1 ng/ml testosteron içeren kombine grup ile

Hormonların zamana bağlı etkilerini değerlendirmek için her bir hormonun aynı dozları 24. ve 72. saatlerde karşılaştırıldı.

### 3.6. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'na danışılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin her grupta normal dağılıma uygunluk kontrollerine Shapiro Wilk testi ile bakıldı. Dağılım normal dağılıma uygun bulundu. Çalışmadan elde edilen veriler için tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart değerleri verildi. Gruplar arasında anlamlı farklılık olup olmadığını belirlemek için ANOVA testi kullanıldı. Posthoc testi için kontrol grubuna ilişkin ikişerli karşılaştırmalarda Duncan testi tercih edildi. Verilerin analizi SPSS 11.5 paket programında yapıldı. İstatistik anlamlılığında  $p < 0,05$  alındı.

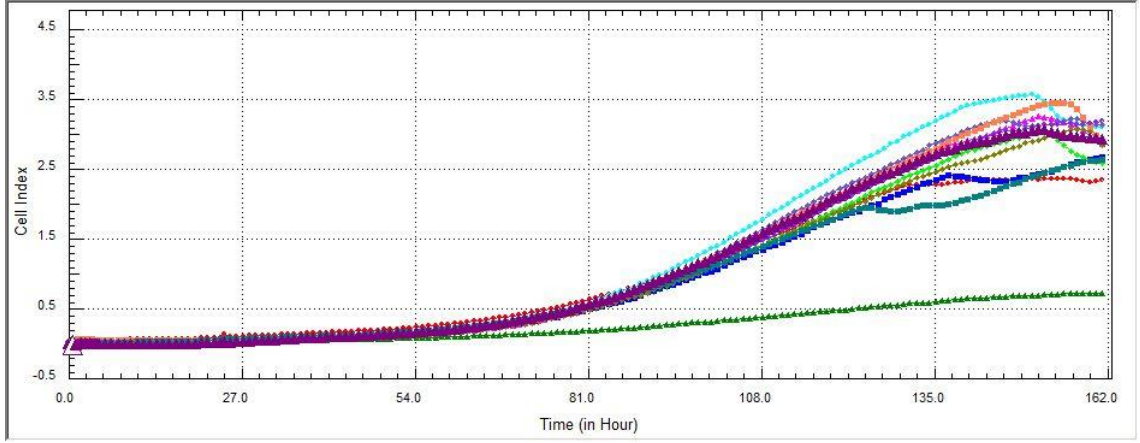




## 4. BULGULAR

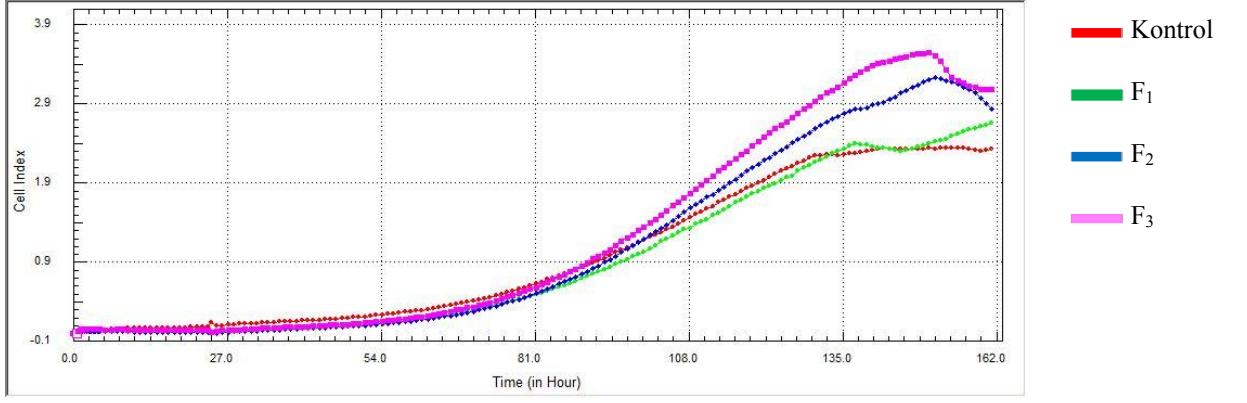
### 4.1. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Bulguları

Hücre kültürü ortamında e-platelere ekilen hücreler 24 saat sonra plate yüzeyine tutundu. Hücreler yüzeye tutunduktan sonra Kontrol grubuna hiçbir işlem uygulanmadı. Kuyulara değişen dozlarda FSH ve testosteron hormonları verildikten sonra çoğalma eğrileri sabitlendiğinde (hormon uygulanmasından 113. saat sonra) deney sonlandırıldı ve sonuçlar hücre indeks ortalamalarına bakılarak anlamlı bulunan altı farklı saat (hormon uygulanmasından 44, 57, 70, 84, 98, 111 saat sonra) seçilerek tüm gruplar için bu saatlerde karşılaştırmalar yapıldı (Şekil. 4.1). Platelere ilk olarak sadece medyum ilave edilip deney başlatıldı ve 24 saat sonra değişen dozlardaki hormon konsantrasyonları ilave edildi. Bu nedenle hücre indeks bulguları 24. saati 0. saat olarak değerlendirip yorumlandı. Gerçek zamanlı hücre analiz sonuçlarına göre hücre sayısının gruplar arasında zamana bağlı olarak değiştiği ve eklenen hormonların hücre sayısı artışında bazı gruplar arasında fark oluşturduğu görüldü (Şekil. 4.1).

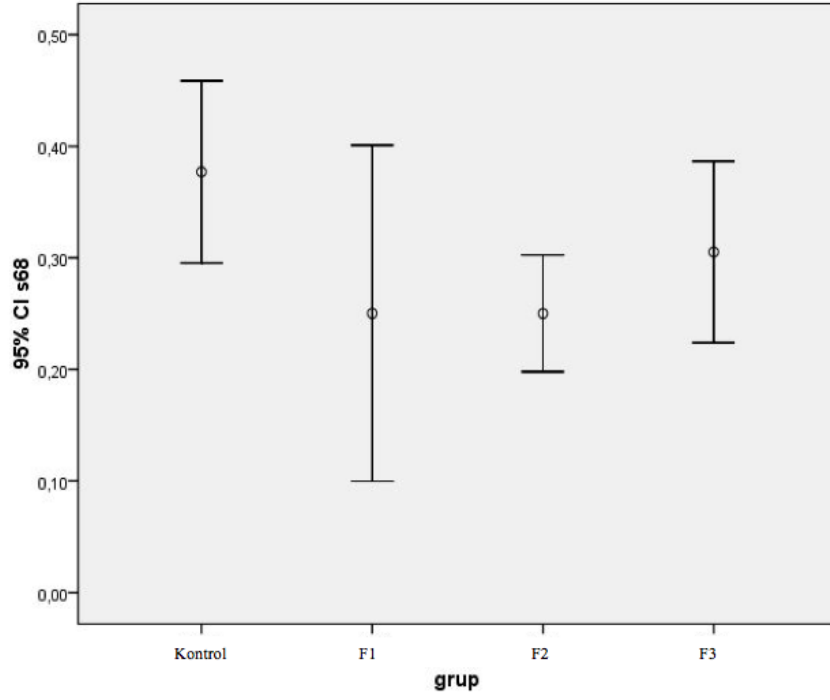


**Şekil 4.1.** Tüm grupların zamana bağlı hücre indeks eğrisi [1 ng/ml FSH (F<sub>1</sub>), 10 ng/ml FSH (F<sub>2</sub>), 100 ng/ml FSH (F<sub>3</sub>), 1 ng/ml testosteron (T<sub>1</sub>), 10 ng/ml testosteron (T<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml testosteron (T<sub>3</sub>), 1 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup (F<sub>1</sub>T<sub>2</sub>), 1 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron içeren kombine grup (F<sub>1</sub>T<sub>1</sub>), 10 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup (F<sub>2</sub>T<sub>2</sub>), 10 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron içeren kombine grup (F<sub>2</sub>T<sub>1</sub>)]

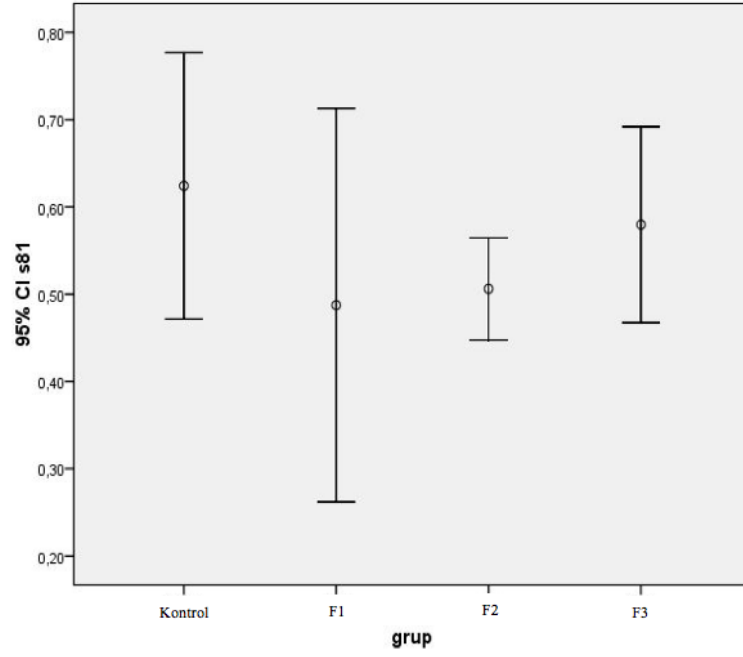
Hücreler, hücre indeks ortalama değerleri açısından kontrol grubuna göre 1 ng/ml FSH uygulanan grup, 10 ng/ml FSH uygulanan grup ve 100 ng/ml FSH uygulanan grup ile karşılaştırıldığında, 10 ng/ml FSH uygulanan grupta hormon uygulanmasına bağlı olarak 44. saatte azalan etkinin anlamlı olarak azaldığı görüldü ( $p < 0,05$ ). (Şekil. 4.3). 98. ve 111. saatlerde ise 100 ng/ml FSH uygulanan grupta kontrole göre artan etkinin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu gösterildi ( $p < 0,05$ ) (Şekil. 4.7-4.8).



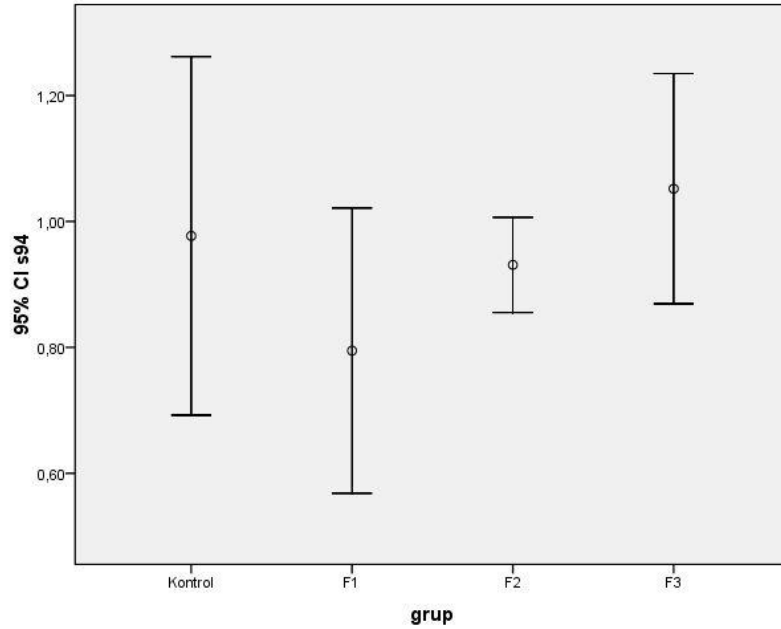
**Şekil. 4.2.** Kontrol, 1 ng/ml FSH (F<sub>1</sub>), 10 ng/ml FSH (F<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml FSH (F<sub>3</sub>) uygulanan grupların zamana bağlı hücre indeks eğrisi



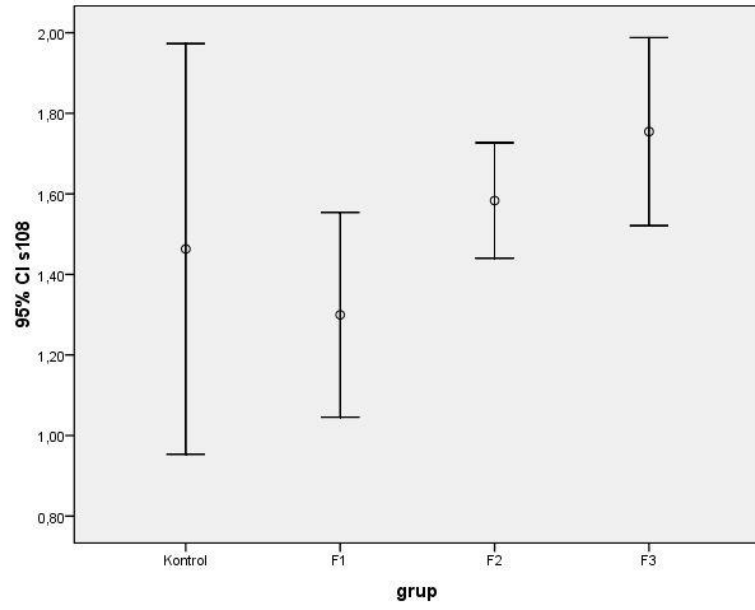
**Şekil. 4.3.** Kontrol, 1 ng/ml FSH (F<sub>1</sub>), 10 ng/ml FSH (F<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml FSH (F<sub>3</sub>) uygulanan grupların 44. saatte hücre indeks ortalamaları



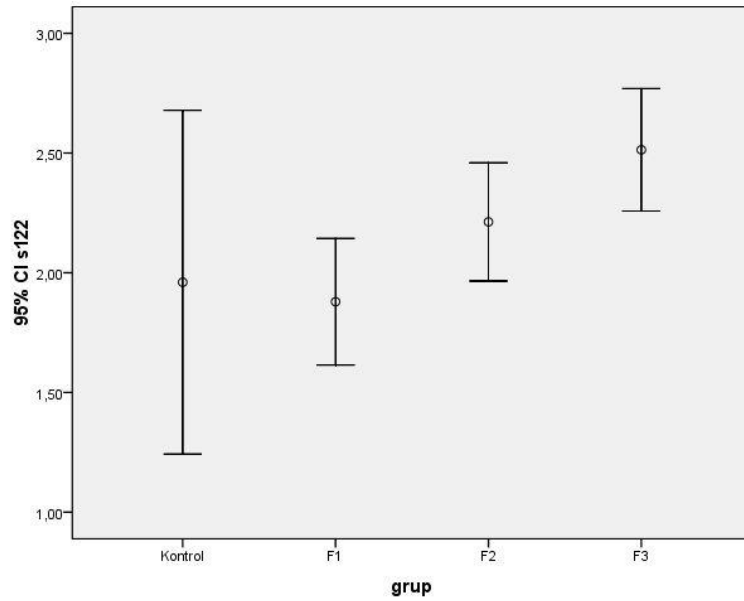
**Şekil. 4.4.** Kontrol, 1 ng/ml FSH (F<sub>1</sub>), 10 ng/ml FSH (F<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml FSH (F<sub>3</sub>) uygulanan grupların 57. saatte hücre indeks ortalamaları



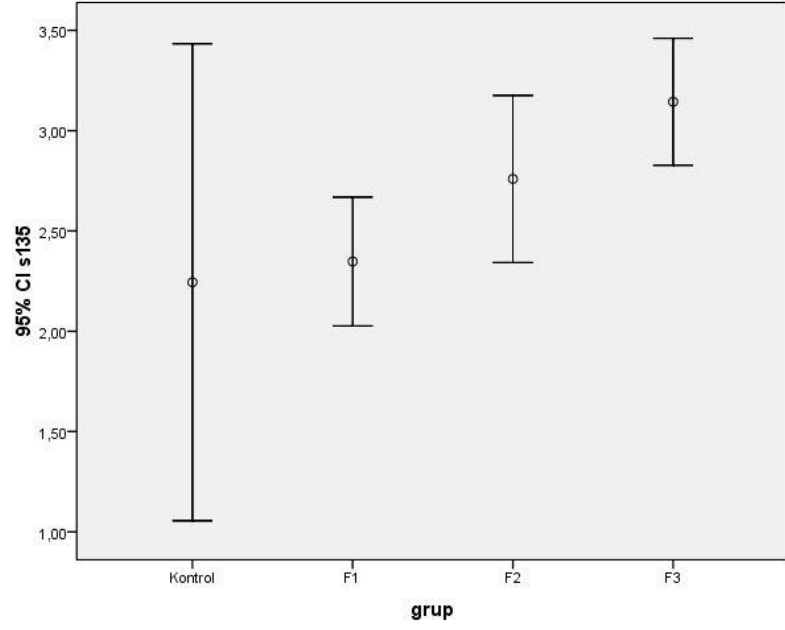
**Şekil. 4.5.** Kontrol, 1 ng/ml FSH (F<sub>1</sub>), 10 ng/ml FSH (F<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml FSH (F<sub>3</sub>) uygulanan grupların 70. saatte hücre indeks ortalamaları



**Şekil. 4.6.** Kontrol, 1 ng/ml FSH (F<sub>1</sub>), 10 ng/ml FSH (F<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml FSH (F<sub>3</sub>) uygulanan grupların 84. saatte hücre indeks ortalamaları

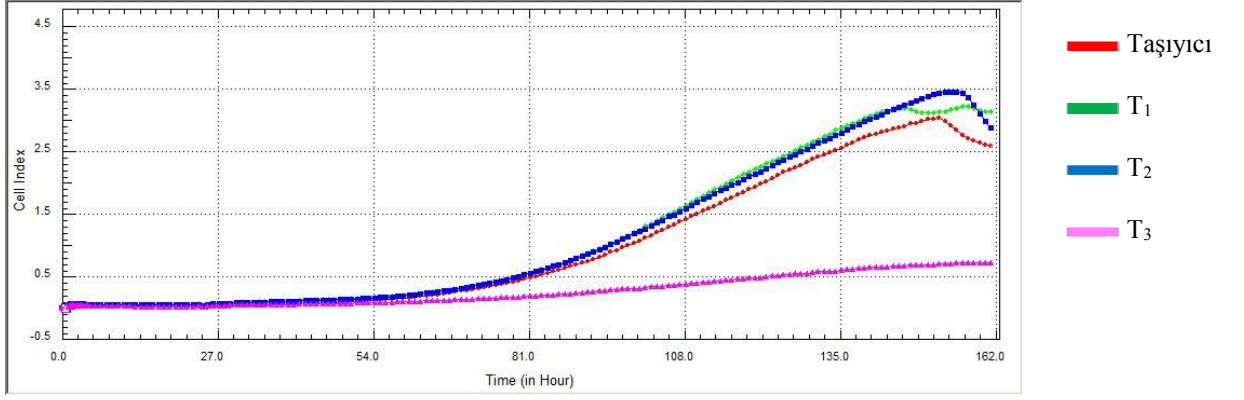


**Şekil. 4.7.** Kontrol, 1 ng/ml FSH (F<sub>1</sub>), 10 ng/ml FSH (F<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml FSH (F<sub>3</sub>) uygulanan grupların 98. saatte hücre indeks ortalamaları

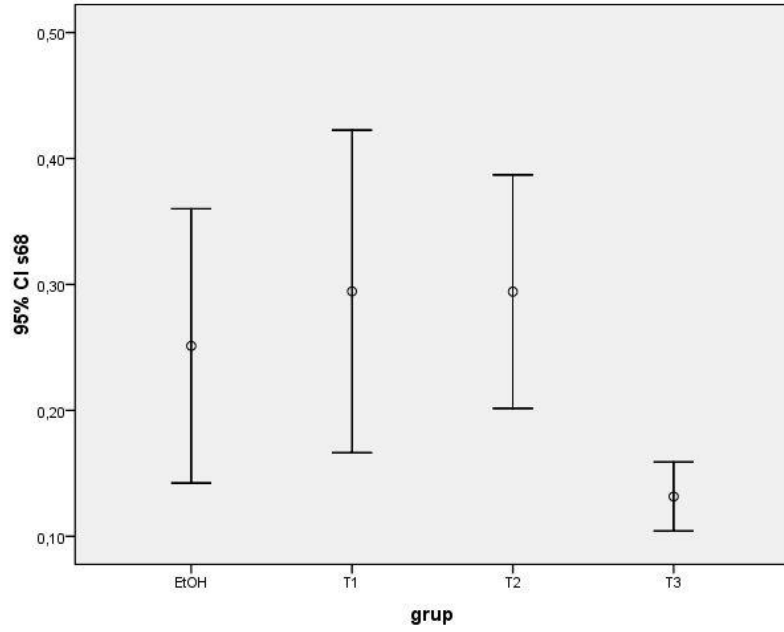


**Şekil. 4.8.** Kontrol, 1 ng/ml FSH (F<sub>1</sub>), 10 ng/ml FSH (F<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml FSH (F<sub>3</sub>) uygulanan grupların 111. saatte hücre indeks ortalamaları

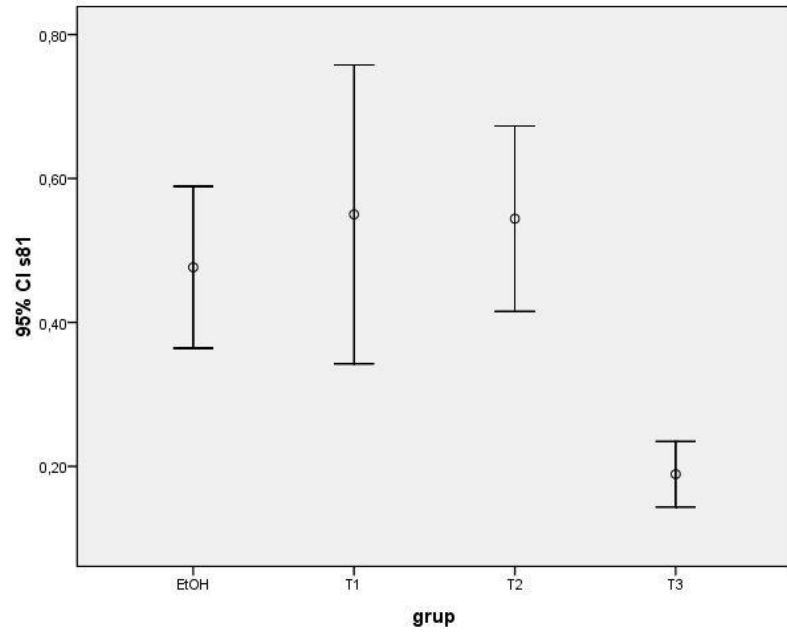
Sıçan aort düz kas hücrelerinin, hücre indeks ortalama değerleri açısından taşıyıcı grup ile 1 ng/ml testosteron uygulanan grup, 10 ng/ml testosteron uygulanan grup ile 100 ng/ml testosteron uygulanan grup karşılaştırıldığında, hücre indeks ortalama değerleri açısından 100 ng/ml testosteron uygulanan grupta tüm saatlerdeki azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.10-4.15).



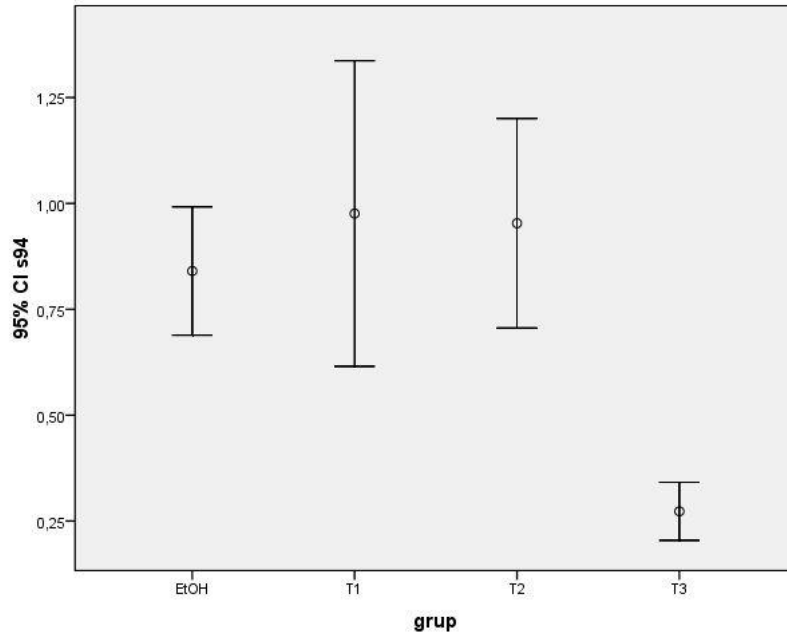
**Şekil 4.9.** Taşıyıcı, 1 ng/ml testosteron (T<sub>1</sub>), 10 ng/ml testosteron (T<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml testosteron (T<sub>3</sub>) uygulanan grupların zamana bağlı hücre indeks eğrisi



**Şekil 4. 10.** Taşıyıcı (EtOH), 1 ng/ml testosteron (T<sub>1</sub>), 10 ng/ml testosteron (T<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml testosteron (T<sub>3</sub>) uygulanan grupların 44. saatte hücre indeks ortalamaları

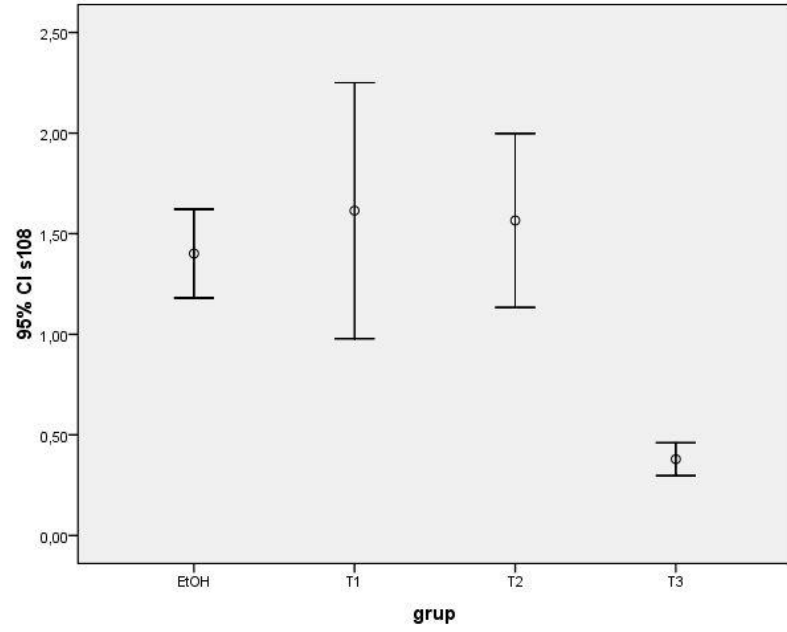


**Şekil 4.11.** Taşıyıcı (EtOH), 1 ng/ml testosteron (T<sub>1</sub>), 10 ng/ml testosteron (T<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml testosteron (T<sub>3</sub>) uygulanan grupların 57. saatte hücre indeks ortalamaları

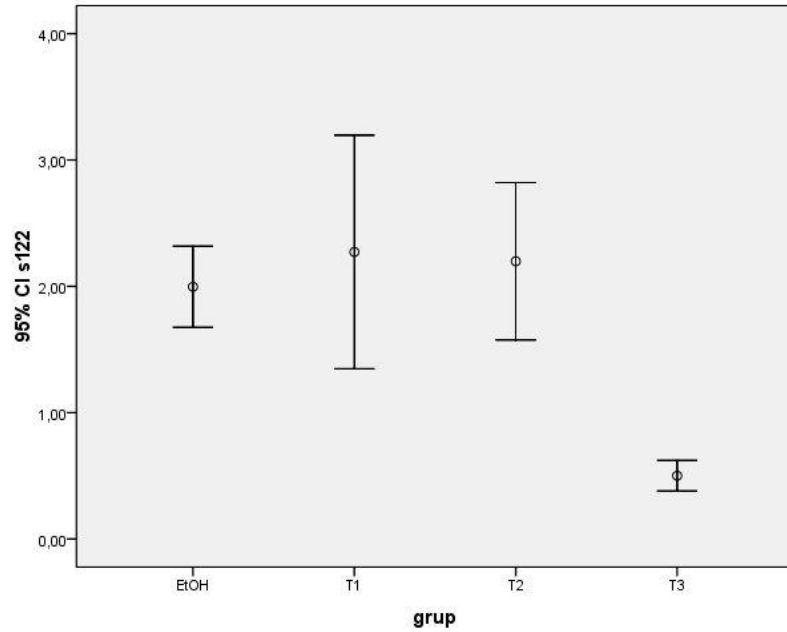


**Şekil 4.12.** Taşıyıcı (EtOH), 1 ng/ml testosteron (T<sub>1</sub>), 10 ng/ml testosteron (T<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml testosteron (T<sub>3</sub>) uygulanan grupların 70. saatte hücre indeks ortalamaları

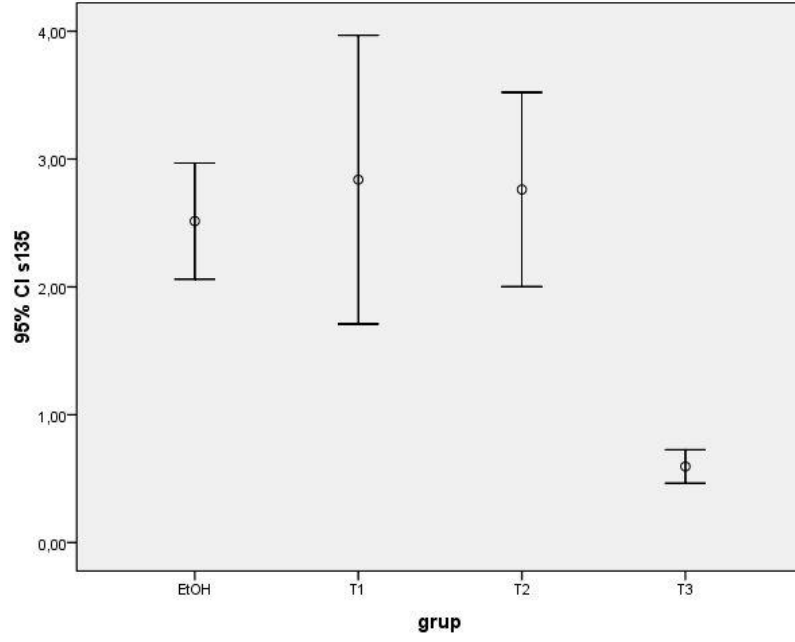




**Şekil 4.13.** Taşıyıcı (EtOH), 1 ng/ml testosteron (T<sub>1</sub>), 10 ng/ml testosteron (T<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml testosteron (T<sub>3</sub>) uygulanan grupların 84. saatte hücre indeksi ortalamaları



**Şekil 4. 14.** Taşıyıcı (EtOH), 1 ng/ml testosteron (T<sub>1</sub>), 10 ng/ml testosteron (T<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml testosteron (T<sub>3</sub>) uygulanan grupların 98. saatte hücre indeksi ortalamaları



**Şekil 4. 15.** Taşıyıcı (EtOH), 1 ng/ml testosteron (T<sub>1</sub>), 10 ng/ml testosteron (T<sub>2</sub>) ve 100 ng/ml testosteron (T<sub>3</sub>) uygulanan grupların 111. saatte hücre indeks ortalamaları

Gerçek zamanlı hücre analiz sonuçlarına göre hücre indeks ortalama değerleri karşılaştırılan diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır.

#### 4.2. İmmünofloresan İşaretleme Bulguları

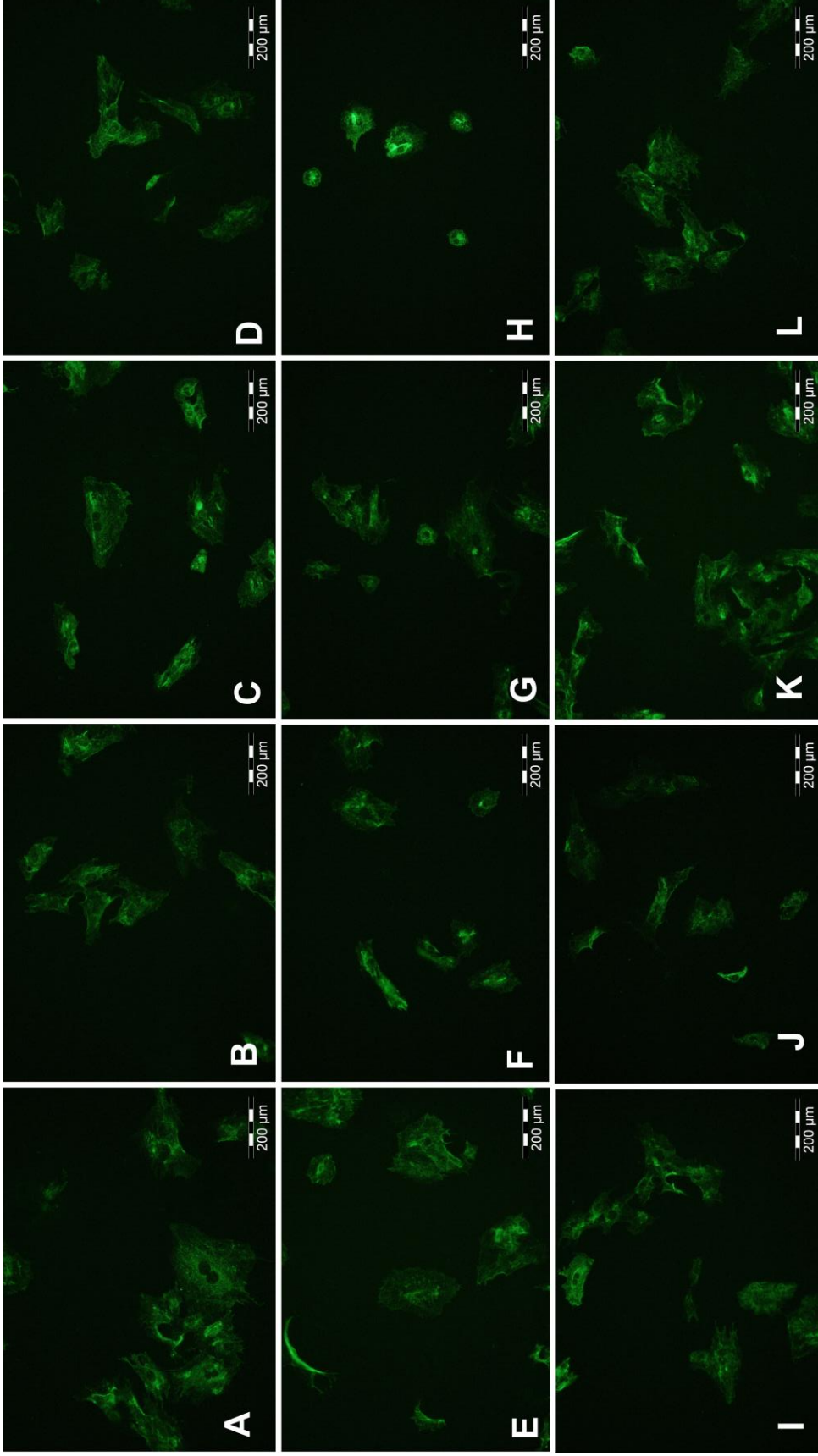
Hücre kültürü ortamında 96 well plate içinde bulunan sıçan aortik düz kas hücrelerine %0,01 etanol ve değişen konsantrasyonlarda testosteron ve FSH uygulandıktan 24 saat ve 72 saat sonrasında Cav-1, DNMT1 ve DNMT3a

ekspresyonları immünofloresan işaretleme ile değerlendirildi. Kontrol grubuna hücreler eklendikten sonra hiçbir işlem yapılmadı.

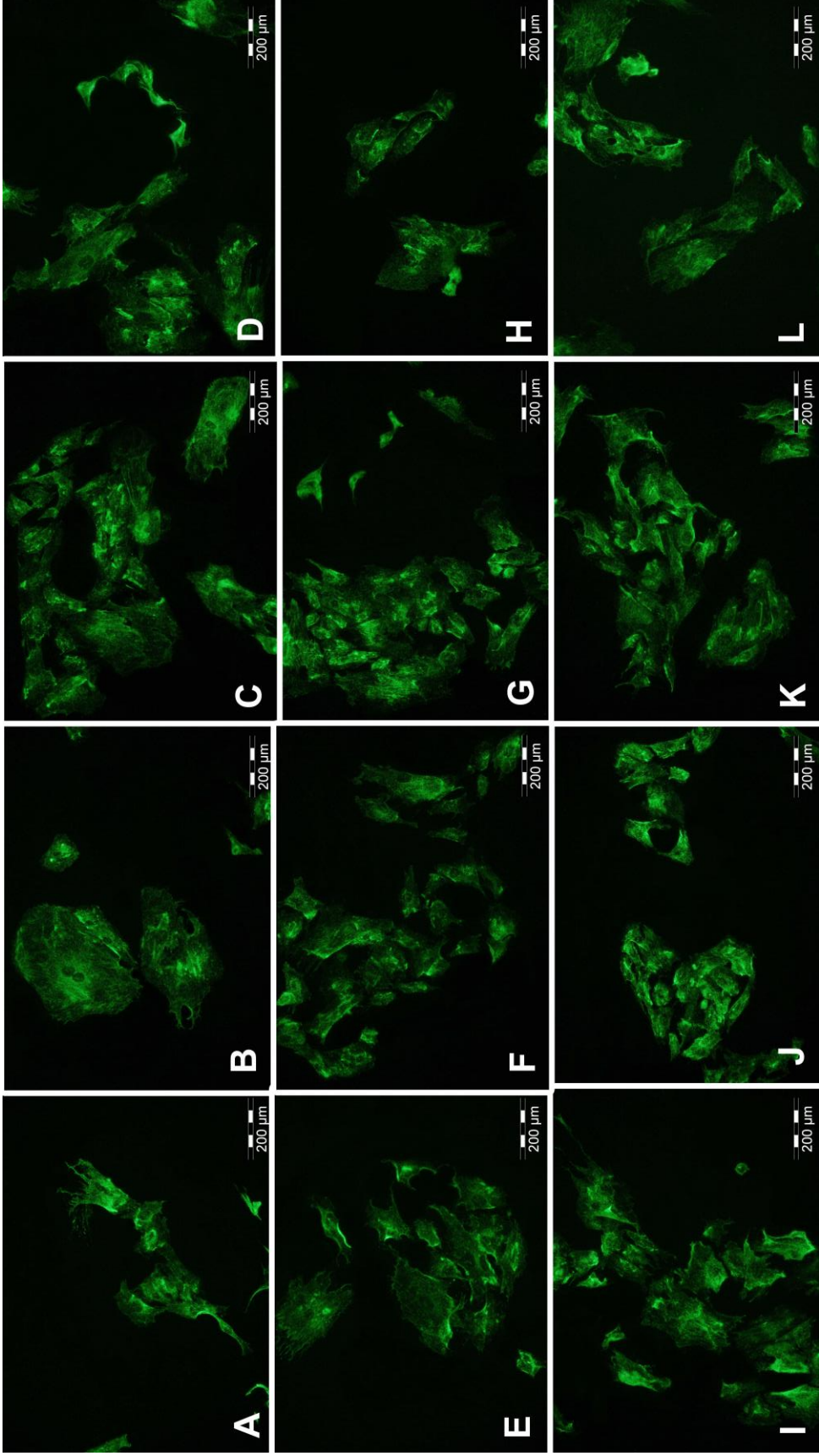
#### **4.2.1. Kaveolin-1 İşaretleme Bulguları**

Cav-1 işaretleme yoğunlukları için kontrol ve taşıyıcı grupları arasında, 24. ve 72. saatlerde yapılan karşılaştırmada istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.16-4.17).





**Şekil 4.16.** 24 saat sonunda Cav-1 immünofloresan işaretlenmesi (20X). A. Kontrol grubu, B. 1 ng/ml FSH uygulanan grup, C. 10 ng/ml FSH uygulanan grup, D. 100 ng/ml FSH uygulanan grup, E. Taşıyıcı grup, F. 1 ng/ml testosteron uygulanan grup, G. 10 ng/ml testosteron uygulanan grup, H. 100 ng/ml testosteron uygulanan grup, I. 1 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron, içeren kombine grup J. 1 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup, K. 10 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup, L. 10 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron içeren kombine grup

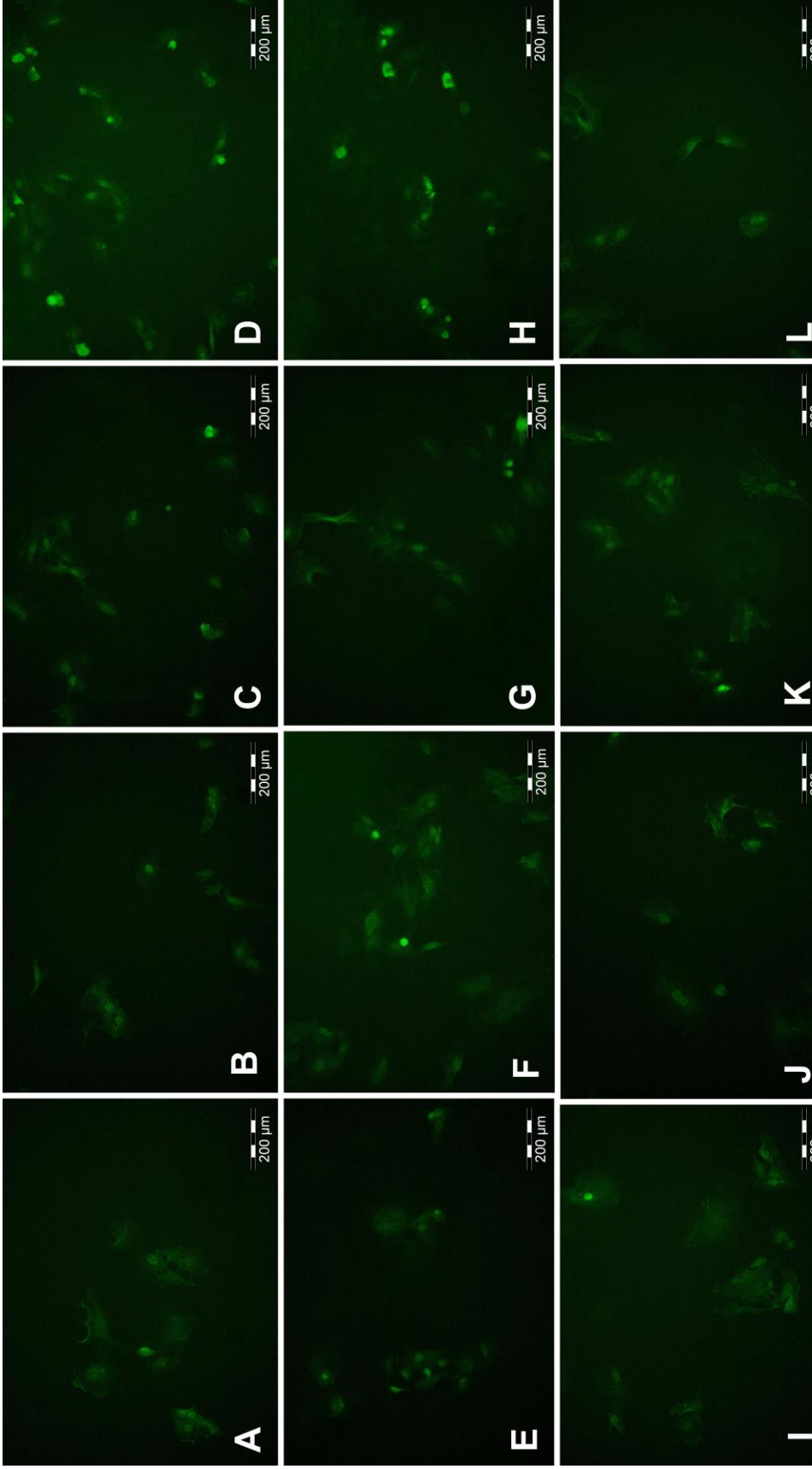


**Şekil 4.17.** 72 saat sonunda Cav-1 immünofloresan işaretlenmesi (20X). A. Kontrol grubu, B. 10 ng/ml FSH uygulanan grup, C. 100 ng/ml FSH uygulanan grup, D. 100 ng/ml FSH uygulanan grup, E. Taşıyıcı grup, F. 1 ng/ml testosteron uygulanan grup, G. 10 ng/ml testosteron uygulanan grup, H. 100 ng/ml testosteron uygulanan grup, I. 1 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron, içeren kombine grup J. 1 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron, içeren kombine grup, K. 10 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup, L. 100 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup

#### 4.2.2. DNMT1 İşaretleme Bulguları

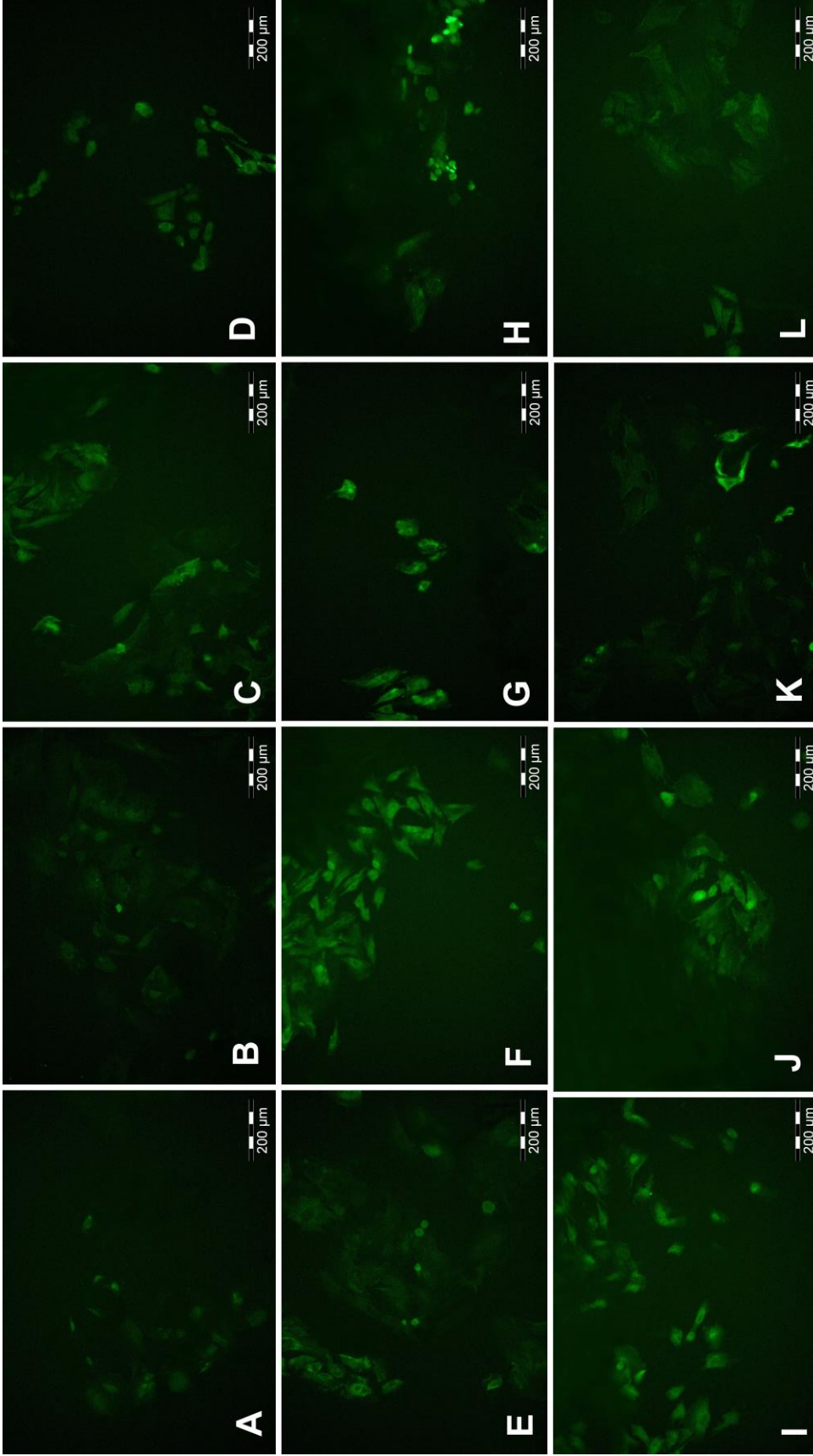
DNMT1 işaretleme yoğunlukları için kontrol ve taşıyıcı grupları arasında 24. saat ve 72. saatlerde yapılan karşılaştırmada istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.18-4.19).





**Şekil 4.18.** 24 saat sonunda DNMT1 immünofloresan işaretlenmesi (20X). A. Kontrol grubu, B. 1 ng/ml FSH uygulanan grup, C. 10 ng/ml FSH uygulanan grup, D. 100 ng/ml FSH uygulanan grup, E. Taşıyıcı grup, F. 1 ng/ml testosteron uygulanan grup, G. 10 ng/ml testosteron uygulanan grup, H. 100 ng/ml testosteron uygulanan grup, I. 1 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron, içeren kombine grup J. 1 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup, K. 10 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup, L. 10 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron içeren kombine grup





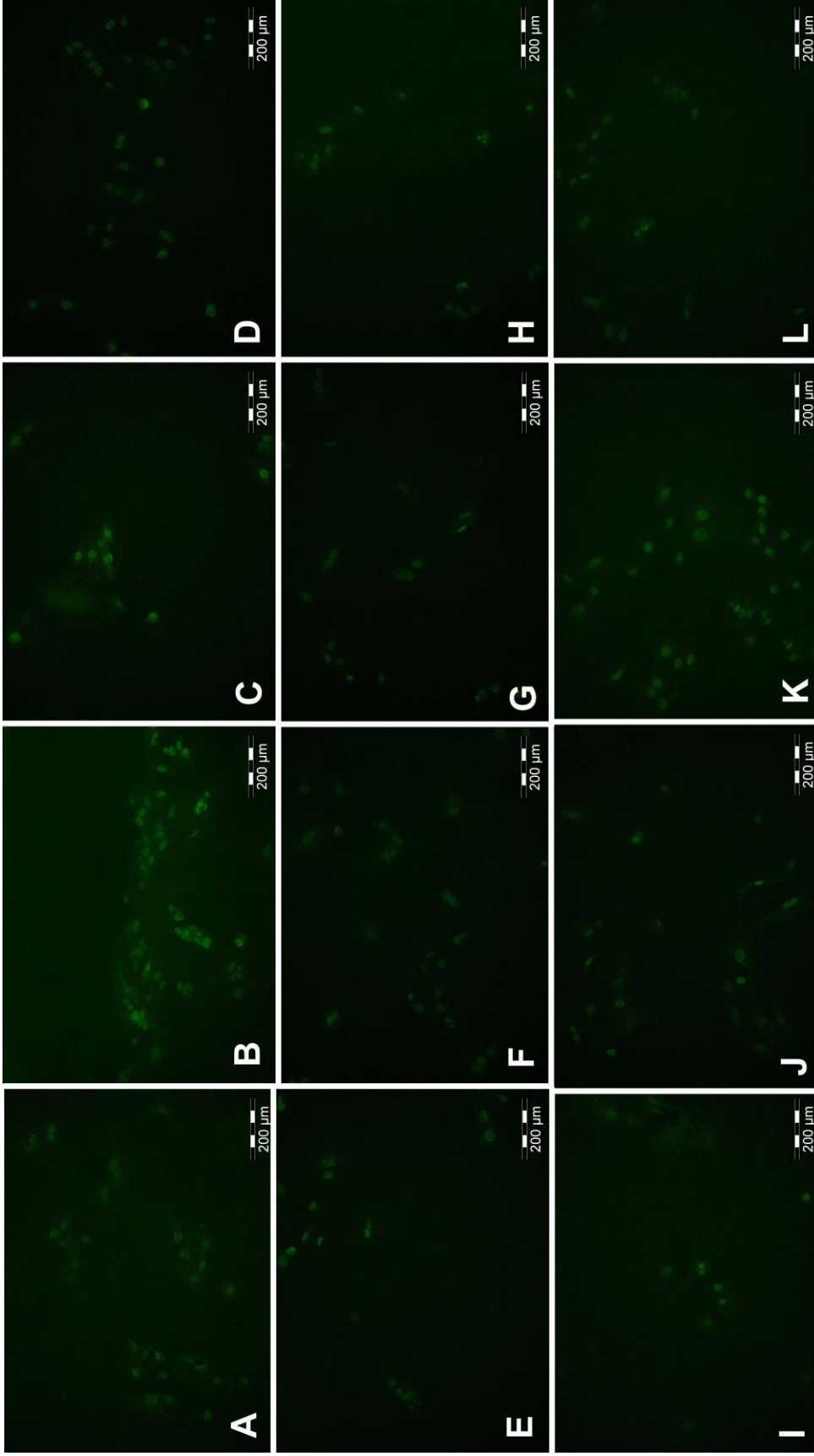
**Şekil 4.19.** 72 saat sonunda DNMT1 immünofloresan işaretlenmesi (20X). A. Kontrol grubu, B. 1 ng/ml FSH uygulanan grup, C. 10 ng/ml FSH uygulanan grup, D. 100 ng/ml FSH uygulanan grup, E. Taşıyıcı grup, F. 1 ng/ml testosteron uygulanan grup, G. 10 ng/ml testosteron uygulanan grup, H. 100 ng/ml testosteron uygulanan grup, I. 1 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron, içeren kombine grup J. 1 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup, K. 10 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup, L. 10 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron içeren kombine grup



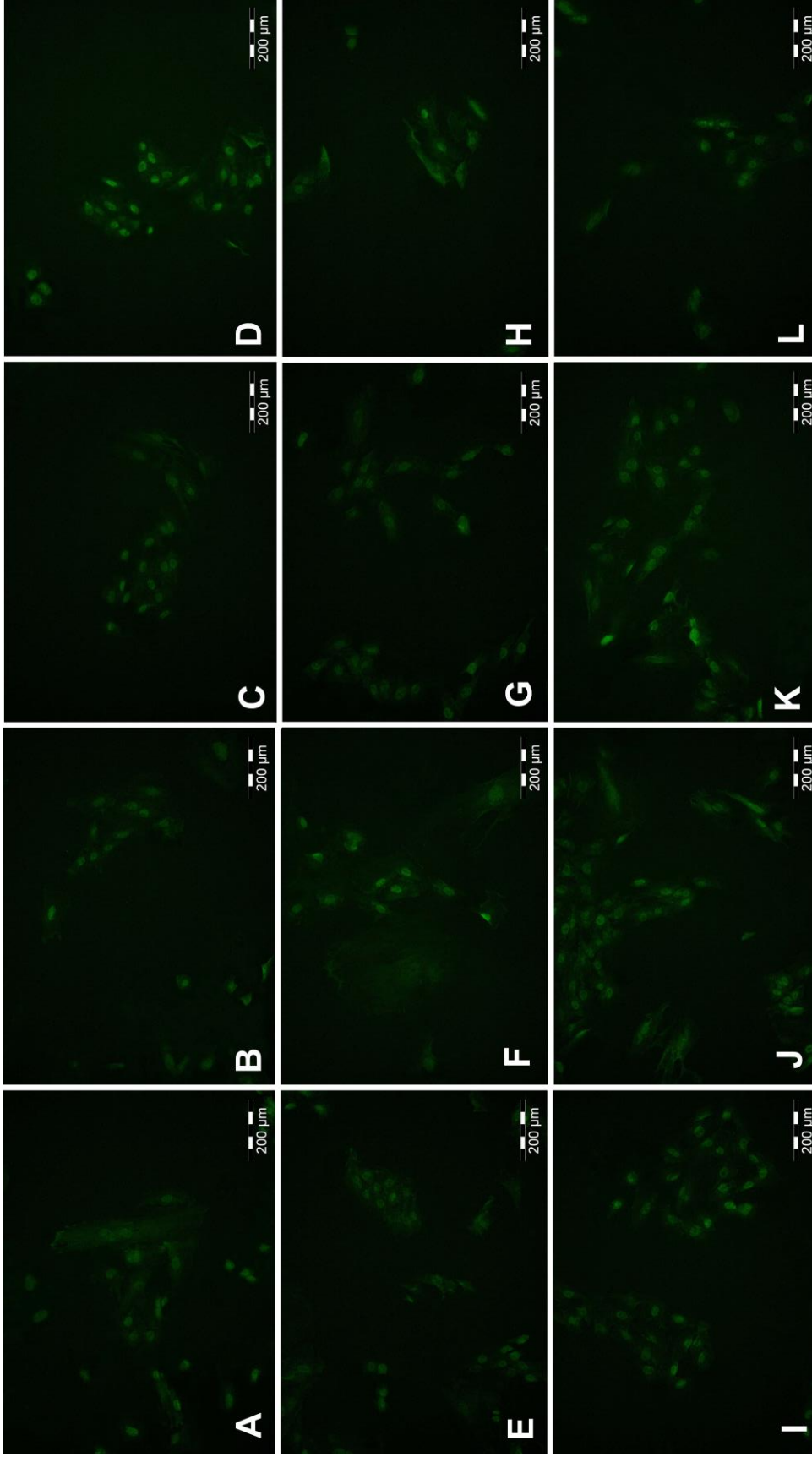
### 4.2.3. DNMT3a İşaretleme Bulguları

DNMT3a işaretleme yoğunlukları için kontrol ve taşıyıcı grupları arasında 24. ve 72. saatlerde karşılaştırmalar yapıldı. 72. saatte DNMT3a işaretleme yoğunluğunun kontrol grubuna göre 1 ng/ml FSH uygulanan grupta azaldığı, taşıyıcı gruba göre ise 10 ng/ml testosteron uygulanan grupta arttığı ve 1 ng/ml FSH + 10 ng/ml testosteron uygulanan kombine grupta azaldığı ve bu artış ve azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.21).





**Şekil 4.20.** 24 saat sonunda DNMT3a İmmünofloresan işaretlenmesi (20X). A. Kontrol grubu, B. 1 ng/ml FSH uygulanan grup, C. 10 ng/ml FSH uygulanan grup, D. 100 ng/ml FSH uygulanan grup, E. Taşıyıcı grup, F. 1 ng/ml testosteron uygulanan grup, G. 10 ng/ml testosteron uygulanan grup, H. 100 ng/ml testosteron uygulanan grup, I. 1 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron, içeren kombine grup J. 1 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup, K. 10 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup, L. 10 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron içeren kombine grup



**Şekil 4.21.** 72 saat sonunda DNM3a immünofloresan işaretlenmesi (20X). A. Kontrol grubu, B. 1 ng/ml FSH uygulanan grup, C. 10 ng/ml FSH uygulanan grup, D. 100 ng/ml FSH uygulanan grup, E. Taşıyıcı grup, F. 1 ng/ml testosteron uygulanan grup, G. 10 ng/ml testosteron uygulanan grup, H. 100 ng/ml testosteron uygulanan grup, I. 1 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron, içeren kombine grup J. 1 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup, K. 10 ng/ml FSH, 10 ng/ml testosteron içeren kombine grup, L. 10 ng/ml FSH, 1 ng/ml testosteron içeren kombine grup

## 5. TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıklar, ömür uzunluğunu etkileyen ve ölüme neden olabilen önemli hastalıkların başında gelmektedir. Ateroskleroz, arter duvarında plak oluşumu ile karakterize kardiyovasküler hastalıkların bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (80). Arter duvarında meydana gelen bir hasar, burada bulunan endotel hücrelerini uyarır ve bu durumun bir sonucu olarak damar duvarında bulunan düz kas hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonu gerçekleşir. Hasarın uzun süre devam etmesi halinde damar lümeni daralır ve lümen içindeki kan akımı zorlaşır (8). Ateroskleroz gibi komplike bir hastalığın altında yatan sebepleri anlamaya çalışmak zorlu bir iştir. Çünkü çevresel ve/veya genetik kaynaklı bir çok etkene bağlı gelişebilmektedir. Bu yüzden bu hastalıkla ilişkili her bir bilimsel bulgu, aterosklerozun anlaşılması açısından çok önemlidir. Östradiol (E2), testosteron, seks hormonu bağlayıcı globülin (sex hormone binding globülin, SHBG) ve FSH gibi endojen cinsiyet hormonlarının aterosklerozun ilerlemesi ile ilişkili olup olmadığını anlamak için çalışmalar yapılmaktadır. Östrojen Reseptör  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) knock out farelerle yapılan çalışmalarda vasküler düz kas hücre proliferasyonuna karşı korumanın bozulduğu ve vasküler hasar sonrası medyal kalınlaşmada artış olduğu gösterilmiştir (1).

Çalışmamızda *in vitro* ortamda sıçan aort düz kas hücreleri üzerinde testosteron ve FSH hormonlarının çeşitli dozlarda ve iki hormonun birlikte verilmesi durumunda, bu hücrelerde ne gibi farklılıklar yaratacağının dahası bu olası farklılıkların altında yatan metabolik ve epigenetik nedenlerin anlaşılması amaçlandı. Bu farklılıkları gözlemleyebilmek için hücrelerin gerçek zamanlı hücre analizi ile proliferasyon özellikleri ve immünofloresan işaretleme ile protein ve metilasyon boyanma yoğunlukları değerlendirildi.

Yaptığımız literatür araştırmalarında, üreme sistemi üzerinde önemli bir rolü bulunan FSH'nin, düz kaslardaki etkisiyle ilgili veya kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisini gösteren yeterli sayıda çalışmaya rastlanmadı. İnsan miyometrial düz kas hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda FSH uygulanan hücrelerin hCG cevabı

çalışılmış ve bunların FSH reseptörüne sahip olduğu gösterilmiştir (21). Aynı çalışmada LH ile birlikte uygulanan FSH'nin bu hücrelerde mitojenik aktiviteyi uyardığı gösterilmiştir. Çalışmamızda uygulanan FSH dozunun erken saatlerdeki proliferasyonu azaltıcı etkisi düşük dozlarda (10 ng/ml,) istatistiksel olarak anlamlıyken ilerleyen saatlerde yüksek dozda (100 ng/ml) proliferasyonu arttırıcı etkisi anlamlı bulunmuştur. (Şekil 4.3-4.8) Bu durumun hücre içindeki genomik ya da non genomik olaylardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek dozdaki FSH'nin proliferatif etkisinin diğer dozlara göre daha geç saatlerde anlamlı bulunması genomik olayların işleyişinin zaman alan bir süreç olmasından kaynaklanabileceği erken saatlerde düşük dozlardaki etkinin non genomik olduğu ve zamanın ilerlemesine bağlı olarak bu etkinin ortadan kalkmış olabileceği sonucuna varıldı.

Çok sayıda klinik çalışma, testosteronun kardiyovasküler hastalıklardaki olumlu etkilerini rapor etmiştir (107-109). Erkeklerde kandaki testosteron seviyesinin düşük olması ile koroner kalp hastalıklarının sık gözlenmesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (109). Testosteronun düz kas hücreleri üzerine etkileri ile ilgili yapılan *in vitro* ve/veya *in vivo* çalışmaların büyük çoğunluğu testosteronun kasılma durumuna olan etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (109-112, 115, 116). Koroner arter hastalığı bulunan kişilerde testosteronun potansiyel tedavi edici etkisini göstermek için yapılan bir çok klinik çalışma sonucunda, testosteronun damar gevşetici özelliği rapor edilmiştir (31, 32, 39, 40). Testosteronun bu metabolizmayı nasıl gerçekleştirdiği ile ilgili bir çok çalışma mevcuttur (40, 45- 48). Ancak düz kas hücreleri üzerine testosteronun proliferatif özelliği ile ilgili yeterli sayıda çalışma mevcut değildir. Testosteronun bir çok hücre tipinde pro-apoptotik ve anti-apoptotik etkisi olduğu bilinmekle birlikte, erkek farelerin düz kas hücreleri üzerinde *in vitro* bir çalışmada, bazal mitokondriyon sayısını azaltarak ve bazı apoptotik yolları uyararak pro-apoptotik bir androjen olduğu bildirilmiştir (117). Yapılan başka çalışmalarda ise testosteronun konsantrasyona bağlı olarak proliferasyonu durdurduğu gösterilmiştir (31-33). Yapmış olduğumuz çalışmada, uygulanan dozlar arasında düşük testosteron konsantrasyonu uygulanan gruplarda (1 ng/ml ve 10 ng/ml) taşıyıcı gruba göre proliferatif etkiyi azaltıcı yönde bir gelişme gözlenmezken, yüksek testosteron konsantrasyonuna sahip gruplarda (100 ng/ml) proliferasyonda azalma gözlendi ve bu sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulundu. Aynı zamanda bu fark seçilen tüm

saatler için de benzer bulundu (Şekil 4.10-4.15). Koroner arter hastalıklarının patofizyolojisinde vasküler düz kas hücre apoptozu ve sitokin aktivasyonunun etkin olduğu bilinmektedir. Aterosklerozda, plak gelişimi ve bağışıklığı yatıştırıcı etkisi üzerinde testosteronun pro-inflamatuar sitokin aktivitesini bastıran, apoptozu durduran ve proliferasyonu arttıran bir faktör olduğu bildirilmiştir (118). Bu durum bizim bulgularımızla çelişmektedir. Ancak deneyimizin *in vitro* ortamda gerçekleştirilmesinden ve *in vivo* ortamda düz kas hücrelerinin bir çok diğer başka faktörden etkilenmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kaveolaların ve kaveolinlerin tüm hücre tiplerinde, hücre metabolizmasında önemli görevleri bulunmaktadır. Kaveolinler, kaveolaların yapı birimidir ve kaveolin protein ailesinin bir üyesi olan Cav-1'in düz kas fizyolojisi ve patofizyolojisinde etkili bir role sahip olduğu bildirilmiştir (103). Aynı zamanda Cav-1 eksikliği olan aortik düz kas hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve endotelin temelli sinyal transdüksiyonunda sorunlara yol açtığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (119). Cav-1 ekspresyonunun baskılanmasının hücrelerin androjenlere karşı duyarlı olmasına neden olduğunu ve *in vivo* olarak androjenlere karşı bu direncin artan Cav-1 seviyesiyle bağlantılı olduğunu gösteren sonuçlar da literatürde yer almaktadır (81). Bazı kanser hücrelerinin androjenlere karşı direnç kazanması ile kaveolin protein seviyeleri arasında bir ilişki olduğu, androjen reseptör direnci artan hücrelerde kaveolin ekspresyonlarının da artmış olduğu gösterilmiştir (120). Ayrıca, prostat kanser hücreleri ile yapılan bazı *in vitro* çalışmalarda testosteronun Cav-1 transkripsiyonunu uyardığı ve artan testosteron konsantrasyonunun prostat kanser hücre canlılığını ve koloni gelişimini arttırdığı bildirilmiştir (121). Bu bulgular, androjen reseptör sinyalinin Cav-1 gen ve protein ekspresyonunun kontrol mekanizmasını değiştirebileceğinin bir kanıtıdır çünkü hücrelerde androjen reseptör fonksiyonu hormon baskılanmış aşamada da devam etmektedir. Ayrıca yapılan son çalışmalarda insan folikül uyarıcı hormon reseptörü (human follicle-stimulating hormone receptor, hFSHR) ile kaveolalar arasında bir ilişki olduğu bildirilmektedir. Miralles ve arkadaşlarının (122) HEK293 hücreleri ile yapmış olduğu moleküler düzeyde bir çalışmada, plazmit transfeksiyonu ile bir grupta sürekli Cav-1 eksprese etmeleri sağlanmıştır (Cav1/WT ). Diğer grupta ise Cav-1'in bir izoformu olan S80E transfeksiyonu sonucu sürekli bu izoformu eksprese etmemesi sağlanmış (Cav1/S80E) olup iki grupta hücrelerin kinaz aktivitesi 0-15 dakikalık sürede

belirli zamanlar seçilerek incelenmiştir. İlk sürelerde kinaz aktivitesi ile ilgili bir etki gözlenmezken 15. dakikada mutant kaveolin üreten hücrelerde (Cav1/S80E) kinaz aktivasyonunun belirgin bir şekilde yüksek olduğu bildirilmiştir. Kinaz aktivitesinin hücrelerin sinyal iletimi, apoptoz ve proliferasyonu üzerinde rol aldığı bilinmektedir ve sebeple FSH'nin hücre içine alınmasında kaveolinlerin etkili olabileceği düşünülmektedir. hFSHR üzerinde kaveolin düzenlenmesini anlamak için yapılan bu çalışmada hücrelerde FSH reseptörleriyle Cav-1 arasında bir ilişki olduğunu, FSH reseptör varlığının Cav-1 ekspresyonlarını ilk beş dakikalık sürede etkilemeyip ilerleyen zamanlardaki (15 dakika) Cav-1 mutant formun ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Çalışmamızda, farklı dozlarda testosteron ve FSH uygulanmış aortik düz kas hücrelerinin Cav-1 protein işaretlemesi yapıldı. Tüm gruplarda Cav-1'in boyanma yoğunluğu açısından fark gözlenmedi. Cav-1'in farklı zamanlara bağlı boyanma yoğunluğu açısından da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadı. Bu durum aortik düz kas hücrelerinde FSH reseptörünün bulunmamasından ve bu hücrelerin Cav-1 ekspresyon miktarının FSH hormonuna karşı fark edilir bir yanıt oluşturulmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, eklenen dozun yanıt oluşturmak için yeterli olmaması da bu sonuca yol açmış olabilir.

İnsan genomunda DNA'yı etkileyen birçok intirinsik ve ekstrinsik faktör olduğu bilinmektedir. Bu faktörler genin ifadesini etkileyen ve geri dönüşümlü veya kalıtlabilir epigenetik değişikliklere neden olabilmektedir. Düz kas hücrelerinin epigenetik değişiklikleri genel olarak histon modifikasyonları yönündedir (123). DNA metilasyonun bu hücreler üzerindeki rolüyle ilgili sınırlı sayıda literatür bilgisi bulunmaktadır. Mevcut bilgiler insan ve hayvan çalışmalarında, aterosklerotik lezyon oluşumlarında, düz kas hücre farklanmasında DNA hipometilasyonu olduğu yönündedir (76, 77). En ileri aşamada aterosklerotik lezyona sahip hastaların genomları incelendiğinde hipometilasyon görüldüğü son çalışmalarda gösterilmiştir (76). Yapılan *in vitro* çalışmalarda da aortik düz kas hücrelerinin ilk replikasyonlarında hipometilasyon belirgin bir şekilde gözlemlendiği bildirilmiştir (76, 77). Yapmış olduğumuz çalışmada, testosteron ve FSH hormonlarına farklı dozlarda ve belirli zamanlarda maruz bırakılan aortik düz kas hücrelerinin epigenetik değişiklikleri incelendi ve sonuçlar immünofloresan olarak işaretlenen hücrelerin bulguları göz önüne alınarak değerlendirildi. Çalışmamızda kullanılan DNMT1 ve DNMT3a metilasyon

işaretlemesinde, boyanma yoğunluğu açısından gruplar arasında hormonlara bağlı farklılık gözlenmedi. Bu işaretlemelerde zaman açısından da bir farklılık yoktu. 72. saatte DNMT3a metilasyon işaretlenmesinde tek başına 10 ng/ml testosteron uygulanan grupta işaretlenme yoğunluğu açısından bir artış gözlenirken, tek başına 1 ng/ml FSH ve 1 ng/ml FSH+10 ng/ml testosteron ile oluşturulan kombine dozları içeren grupta anlamlı azalma gözlemlendi. DNMT3a *de novo* metillenmeyi katalizleyen bir enzimdir ve *de novo* metilasyon hücrenin ihtiyacı halinde, geri dönüştürülebilir ve kalıtılmayan bir olaydır. İşaretlenme yoğunluğunun sadece 72. saatte 1 ng/ml FSH ve 1 ng/ml FSH+10 ng/ml testosteron ile oluşturulan kombine dozları içeren grupta azalan yönde anlamlı çıkması, FSH'ın epigenetik etkisinin, ilerleyen zamana bağlı olarak ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmayla testosteron ve FSH hormonlarının düz kas hücreleri üzerindeki *in vivo* etkileri ve bu etkilerin proliferatif ve epigenetik sonuçları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, elde ettiğimiz bilgiler göz önüne alındığında,

1. FSH'ın 10 ng/ml uygulanan dozunda proliferasyonun erken saatlerde azaldığı ve ilerleyen saatlerde 100 ng/ml olan FSH dozunun proliferasyonu artırıcı bir etkisinin olduğu gösterildi. FSH etkisini erken saatlerde düşük dozlarla non-genomik (ör. reseptör aracılı) bir yoldan gösteriyorken, daha geç saatlerde genomik etkinin ön plana çıkıyor olabileceği ve bu etki için de yüksek dozlarda FSH gerekli olabileceği sonucuna ulaşıldı. Bu bilginin doğrulanabilmesi ve olası mekanizmaların açıklığa kavuşturulabilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerektiği sonucuna da ulaşıldı.

2. Testosteronun proliferasyonu azaltıcı etkisi olduğu görüldü. Bu etki, artan dozla birlikte artış göstermekteydi. Bu hormonun düz kas hücreleri üzerinde pro-apoptotik etkileri de bilindiği için devam çalışmalarımızda apoptotik yolların ve bu yolların etki mekanizmalarının da çalışılmasının yararlı olacağını düşündük.

3. Ca<sup>++</sup> metabolizmasında ve diğer birçok hücre fonksiyonunda etkili olduğu bilinen kaveolanın temel proteinlerinden biri olan kaveolinlerin başlıca bir üyesi olan Cav-1'in immünofloresan işaretlemesi yapıldı. Sonuçlar gruplar arası değerlendirildi. Aynı zamanda işaretlenmenin zamana bağlı değişimi de incelendi. Cav-1'in boyanma yoğunluğu açısından gruplar arasında bir fark oluşturmadığı bulundu. Kurguladığımız deney koşullarının *in vitro* olması ve ortamda sadece düz kas hücrelerinin bulunmasının gruplar arası fark çıkmamasında etkili olabileceği düşünüldü. Hücrelerin *in vivo* ortamda hormon ve benzeri moleküllere yanıtlarının farklı olabileceği, sonraki çalışmalarda bu olasılığın göz önünde bulundurularak *in vivo* FSH uygulama denemelerinin de yapılması gerektiği sonucuna ulaşıldı.

4. DNA metilasyonu, hücrenin birçok aktivitesi üzerinde önemli etkiye sahiptir. Yapmış olduğumuz çalışmada, parakrin olarak uyarılan düz kas hücrelerinin epigenetik değişiklikleri DNA metilasyon enzimleri işaretlenerek değerlendirildi. Gruplar arasında boyanma yoğunluğu açısından anlamlı farklılık gözlenmedi. Bu durum zamana bağlı

değerlendirildiğinde de boyanmalar arasında fark yoktu. Çalışmanın sadece *in vitro* ortamda yapılmış olması bu parametrenin değerlendirilmesini kısıtlayıcı bir eksiklik olarak değerlendirilmektedir. Düz kas hücreleri, *in vivo* koşullarda çok daha zengin ve karmaşık bir mikroçevrede yer almaktadırlar. Bu koşullarda hücrelerin epigenetik özellikleri deney koşullarımızdan farklılık gösterebilir. Bu nedenle, fark tespit edemediğimiz diğer parametrelerle birlikte epigenetik değişikliklerin *in vivo* olarak da tekrar analiz edilmesi gereği düşünüldü. Düz kas hücreleri üzerinde DNA metilasyonu ile ilgili yeterli sayıda çalışma bulunmadığı için bulmuş olduğumuz sonuçlar literatür bilgisi açısından önemlidir. Bu konuyla ilgili daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Yukarda belirtilen tüm sonuçlar elde ettiğimiz bulgular değerlendirilerek ortaya konmuştur.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Tostes R.C., Nigro D., Fortes Z.B. and Carvalho M.H.C.**, Effects of estrogen on the vascular system, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, September **2003**, Volume 36(9) 1143-1158 (Review)
2. **Eckardstein A., Wu F.C.W.**, Testosterone and Atherosclerosis, *Growth Hormone & IGF Research* **13**, **2003**, S72–S84
3. **Berne R. M., Levy M. N., Koeppen B. M., Stanton B. A.**, Fizioloji, Güneş Tıp Kitabevleri, **2008**, Ankara.
4. **Alexander MR, Owens GK.**, Epigenetic control of smooth muscle hücre differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiology* ,**2012**;74:13–40. This review provides an exhaustive and detailed description of epigenetic mechanisms in smooth muscle hücre differentiation.
5. **Spin JM, Maegdefessel L, Tsao PS.** Vascular smooth muscle hücre phenotypic plasticity: focus on chromatin remodelling. *Cardiovasc Res.* **2012**; 95(2):147–155.
6. **Ross M. H. ve Pawlina W.**, Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas, Ankara, **2014**, Palme Yayıncılık, Ankara.
7. **Wilson PW.** Established risk factors and coronary artery disease: The Framingham study. *Am J Hypertension* **1994**; 7:7-12.
8. **Nikol S, Huehns TY, Hofling B.** Molecular biology and post-angioplasty restenosis. *Atherosclerosis.* **1996**;123:17–31.
9. **Libby P, Ridker PM, Hansson GK.** Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* **2011**;473(7347):317–325.
10. **Libby P.** Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2012**;32(9):2045–2051.
11. **Irani K, Herzlinger S, Finkel T.** RAS proteins regulate multiple mitogenic pathways in a vascular smooth muscle hücre. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**; 202:1252-1258.
12. **Doran AC, Meller N, McNamara CA.** Role of smooth muscle hücre in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2008**; 28(5):812–819.

13. **Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB.** The vascular smooth muscle hücre in arterial pathology: a hücre that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res.* **2012**;95(2):194–204.
14. **Olijve W., De Boer W., Mulders JW, van Wezenbeek PM.,** Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon), *Molecular Human Reproduction*, **1996**, vol.2 no.5 pp. 371-382.
15. **Can A.,** Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımı, **2014**, Akademisyen Tıp Kitapevi, Ankara.
16. <http://arbl.cvmbms.colostate.edu>
17. **Sprengel R, Braun T, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH.** The testicular receptor for follicle-stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol Endocrinol* **1990**;4:525-530.
18. **Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E.** The follicle stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* **1997**; 18:739-773.
19. **Vannier B, Loosfelt H, Meduri G, Pichon C, Milgrom E.** Anti-human FSH receptor monoclonal antibodies: immunochemical and immunocytochemical characterization of the receptor. *Biochemistry* **1996**; 35:1358- 1366.
20. **Vu Hai MT, Lescop P, Loosfelt H, Ghinea N.** Receptor-mediated transcytosis of follicle stimulating hormone through the rat testicular microvasculature., *Biol Hücre*, **2004**;96:133-144.
21. **Korneyi JL, Li X, Lei ZM and Rao ChV,** Restoration of human chorionic gonadotropin response in human myometrial smooth muscle hücre by treatment with follicle-stimulating hormone (FSH): evidence for the presence of FSH receptors in human myometrium, **1996**, *European Journal of Endocrinology*, 134: 225-231.
22. **Radu A., Pichon C., Camparo P., Antoine M., Allory Y., Couvelard A., Fromont G., Thu Vu Hai M., and Ghinea N.,** Expression of Follicle-Stimulating Hormone Receptor in Tumor Blood Vessels, *The New England Journal of Medicine*, **2010**, 363;17.
23. **Seyhan A.İ.,** Stabil Anjina Pektorisli Erkek Hastalarda Serum Östradiol, Testosteron, Östradiol/Testosteron Düzeyinin Koroner Arter Hastalığı ile İlişkisi, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, **2010**, Mersin.
24. **Emer E.,** Testosteron ve Dehidroepiandrosteronun Sıçanlarda Kalp Dokusu ve Oksidatif Stres Parametrelerine Etkisi, Ankara Üniversitesi Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı, Doktora Tezi, **2014**, Ankara.
25. **Griffin JE, Wilson JD.** Disorders of the testis and the male and the male reproductive tract. In: Wilson JD et. Al. Williams textbook of endocrinology. **1998**, Philadelphia, *WB Saunders Company* 819-875,.

26. **William F.** Review of Medical Physiology, 6th ed. London: WB Saunders, **1993**: 391-394.
27. **Howell S, Shalet S.** Testosterone deficiency and replacement, **2001**, *Horm Res* 56:86- 92.
28. **Final Mortality Statistics, U.S.** Department of Health. Education and Welfare, National Center for Health Statistics, Washington, DC, **1971**, No. 23.
29. **Malkin C J, Pugh P J, Jones R D, Jonesand T H, Channer K S,** Testosterone as a protective factor against atherosclerosis – immunomodulation and influence upon plaque development and stability, *Journal of Endocrinology*,**2003**, Review, 178, 373–380.
30. **Mosca L, Grungy SM, Judelson D.** Guide to Preventive Cardiology for women: AHA/ACC Scientific Statement Consensus Panel Statement. *Circulation* **1999**; 99:2480-2484.
31. **Liu, P.Y.,** Androgens and cardiovascular disease., **2003**, *Endocr. Rev.* 24, 313–340
32. **Wu, F.C. and von Eckardstein, A,** Androgens and coronary artery disease. **2003**, *Endocr. Review* 24, 183– 217
33. **Malkin C.J., Pugh P.J., Jones T.H., Channer K.S.,** Testosterone for secondary prevention in men with ischaemic heart disease?, **2003**, *QJM* 96, , 521–529.
34. **Van den Beld A.W., Bots M.L., Janssen J.A., Pols H.A., Lamberts S.W., Grobbee D.E.,** Endogenous hormones and carotid atherosclerosis in elderly men, *Am. J. Epidemiol.* 157, **2003**, 25–31.
35. **Hak A.E., Witteman J.C., de Jong F.H., Geerlings M.I., Hofman A., Pols H.A.,** Low levels of endogenous androgens increase the risk of atherosclerosis in elderly men: the Rotterdam study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, **2002**, 3632–3639.
36. **Muller M., van der Schouw Y.T., Thijssen J.H., Grobbee D.E.,** Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, **2003**, 5076–5086.
37. **Liu P.Y., Death A.K., Handelsman D.J.,** Androgens and cardio- vascular disease, *Endocr. Rev.* 24, **2003**,313–340.
38. **Pugh P.J., Morris P.D., Hall J., Malkin C.J., Asif S., Jones R.D., Channer K.S., Jones T.H.,** High prevalence of low testosterone levels in men with coronary heart disease and an association with hypertension and obesity—the South Yorkshire study, *Endocr. Abstr.* 5, **2003**, 225.
39. **Webb C.M., McNeill J.G., Hayward C.S., de Zeigler D., Collins P,** Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease, *Circulation*, 119 (10),**1999**, 1690–1696.

40. **Webb, C.M.** Effect of acute testosterone on myocardial ischemia in men with coronary artery disease, **1999**, *Am. J. Cardiol.* 83, 437– 439
41. **Webb, C.M.**, Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. **1999**, *Circulation*, 100, 1690– 1696.
42. **Rosano, G.M.C.**, Acute anti-ischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease. . **1999**, *Circulation*, 99, 1666–1670
43. **Jones, R.D.**, The influence of testosterone upon vascular reactivity. **2004**, *Eur. J. Endocrinol.* 151, 29–37
44. **Jones, R.D.**, Pulmonary vasodilatory action of testosterone: Evidence of a calcium antagonistic action., **2002**, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 39, 814–823
45. **Yue, P.**, Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta., **1995**, *Circulation*, 91, 1154–1160
46. **Jones, R.D.**, Altered circulating hormone levels, endothelial function and vascular reactivity in the testicular feminised mouse., **2003**, *Eur. J. Endocrinol.* 148, 111–120.
47. **Deenadayalu, V.P.**, Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel, **2001**, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, H1720–H1727
48. **Ding, A.Q. and Stallone, J.N.**, Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K<sup>+</sup> channel activation. **2001**, *J. Appl. Physiol.* 91, 2742–2750
49. **Hall, J.**, Selective inhibition of L-type Ca<sup>++</sup> channels in A7r5 hücre by physiological levels of testosterone, **2006**, *Endocrinology* 147, 2675– 2680
50. **Scragg, J.L.**, Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca<sup>++</sup> channels, **2004**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 503–506
51. **Zhou W , Liu W , Liao H , Cao Z , Xie H , Zhang S , Chen M** Testosterone suppresses oxidized low-density lipoprotein-induced vascular smooth muscle hücre phenotypic transition and proliferation, *Chinese Journal of Hücreular and Molecular Immunology*, **2015**, 31(6):775-778.
52. **Leimgruber C**, Testosterone abrogates TLR4 activation in prostate smooth muscle hücre contributing to the preservation of a differentiated phenotype, , **2013**, *Journal of Hücreular Physiology*, 228: 1551–1560.
53. **Joshua D. Stone, A.**, AMP-activated protein kinase inhibits vascular smooth muscle hücre proliferation and migration and vascular remodeling following injury, *the Journal American Physiological Society*, **2013**, 304: H369–H381.

54. **Aaron D. Goldberg** "Epigenetics: A Landscape Takes Shape" *Hücre*, **2007**, 134: 635–638.
55. [www.commonfund.nih.gov/epigenomics](http://www.commonfund.nih.gov/epigenomics)
56. **Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS**, Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Hücre*. **2011**;146(6):1016–1028.
57. **Dawson MA and Kouzarides T**. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Hücre*. **2012**;150(1):12–27.
58. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/methylation>
59. **M. Murph**, Research on Melanoma - A Glimpse into Current Directions and Future Trends" **2011** Chapter 2: Epigenetic Changes in Melanoma and the Development of Epigenetic Therapy for Melanoma.
60. **Euskirchen G, Auerbach RK, Snyder M**. SWI/SNF chromatin- remodeling factors: multiscale analyses and diverse functions. *J Biol Chem*. **2012**;287(37):30897–30905.
61. **Cheung P, Lau P**. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol*. **2005**;19(3):563–573.
62. **Kouzarides T**. Chromatin modifications and their function. *Hücre*. **2007**;128(4):693–705.
63. **Alkemade FE, Vliet P van, Henneman P, Dijk KW van, Hierck BP, et al**. Prenatal exposure to apoE deficiency and postnatal hypercholesterolemia are associated with altered hücre-specific lysine methyltransferase and histone methylation patterns in the vasculature. *Am J Pathol*. **2010**;176(2):542–548.
64. **G. Rose**, Familial patterns in ischaemic heart disease, **1964**, *Br. J. Prev. Soc. Med.* 18 (75–80) ,75.
65. **D.J. Barker**, Fetal programming of coronary heart disease, **2002**, *Trends Endocrinol. Metab.* 13 364.
66. **F.E. Alkemade, A.C. Gittenberger-de Groot, A.E. Schiel, J.C. VanMunsteren, B. Hogers, L.S. van Vliet, R.E. Poelmann, L.M. Havekes, D.K. Willems van, M.C. DeRuiter**, Intrauterine exposure to maternal atherosclerotic risk factors increases the susceptibility to atherosclerosis in adult life, **2007** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27; 2228.
67. **Baylin SB, Jones PA**. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. **2011**, *Nature Rev Cancer*.;11(10):726–734.
68. **Robertson KD**. DNA methylation and human disease. **2005**, *Nature Rev Genet*;6(8):597–610.

69. **Suzuki MM, Bird A.** DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **2008**, *Nat Rev Genet*;9(6):465–476.
70. **Goetz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP.** Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. **1985**, *Science*.; 228:187–190.
71. **Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M.** The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. **1983**, *Nucleic Acids Res.* 11:6883–6894.
72. **Feinberg AP.** Genomic imprinting and gene activation in cancer. **1993**, *Nat Genet*.;4:110–113.
73. **Counts JL, Goodman JI.** Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. **1995**, *Hücre*.;83:13–15.
74. **Bird A.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. **2002**, *Genes Dev*, 16(1):6–21.
75. **Laird PW.** Mouse models in DNA-methylation research. **2000**, *Curr Top Microbiol Immunol*.;249:119–134.
76. **Hiltunen MO, Turunen MP, Hakkinen TP, Rutanen J, Hedman M, Makinen K, Turunen AM, Aalto-Setälä K, Ylä-Herttuala S.** DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions. **2002**, *Vasc Med*.;7:5–11.
77. **Laukkanen MO, Mannermaa S, Hiltunen MO, Aittomäki S, Airenne K, Janne J, Ylä-Herttuala S.** Local hypomethylation in atherosclerosis found in rabbit *ec-sod* gene. **1999**, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.;19: 2171–2178.
78. **Mikko O. Hiltunen, Seppo Ylä-Herttuala,** DNA Methylation, Smooth Muscle Hüces, and Atherogenesis, **2003**, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.; 23:1750-1753
79. **Mikol DD, Scherer SS, Duckett SJ et al.** Schwann hücre Cav-1-expression increases during myelination and decreases after axotomy, **2002**; *Glia* 38(3): 191-199.
80. **Jean-François J., Philippe F. G., Michael L.P.,** Caveolins and Caveola; Roles in Signaling and Disease Mechanisms, **2012**, Springer Science and Business Media, LLC., USA.
81. **Melkonian KA., Ostermeyer AG, Chen JZ et al.,** Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated., **1999**, *J Biol Chem*, 274(6):3910-3917.



82. **Pyenta PS, Holowka D, Baird B.**, Cross-correlation analysis of inner-leaflet-anchored green fluorescent protein core distributed with IgE receptors and outer leaflet lipid raft components., **2001**, *Biophys J*, 80(5):2120-2132.
83. **Simons K., Toomre D**, Lipid rafts and signal transduction, **2000**, *Nature Reviews*; 1(1):31-39.
84. **Anderson RG.**, The caveolae membrane system, **1998**, *Annu Rev Biochem.*, 67:199-225.
85. **Parton RG.** Caveolae and caveolin. **1996**, *Curr Opin Hücre Biology.*, 8(4):542-548.
86. **Schnitzer JE, Oh P, Pinney**, Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis and capillary permeability of select macromolecules., **1994**, *J Hücre Biology*, 127(5):1217-1232
87. **Yamanda E.**, The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse, **1955**, *J. Biophys Biochem Cytol*, 1(5): 445-458.
88. **Palade GE.**, Blood capillaries of the heart and other organs., **1961**, *Circulation*, 24:368-388.
89. **Razani B., Lisanti MP.**, Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships. **2001**, *Exp Hücre Res*, 271(1): 36-44.
90. **Razani B., Engelman JA, Wang XB** Cav-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities., **2001**, *J Biol Chem*, 276(41):38121- 38138.
91. **Drab M., Verkade P., Elger M.**, Loss of caveolae, vascular dysfunction and pulmonary defects in Cav-1 gene-disrupted mice. **2001**, *Science*, 293(5539): 2449-2452.
92. **Sargiacomo M., Scherer PE, Tang Z.**, Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization, **1995**, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(20):9407-8411.
93. **Williams TM, Lisanti MP.**, "The Caveolin genes: from hücre biology to medicine". **2004**, *Ann. Med.* 36 (8): 584–595.
94. **Smart EJ, Ying Y., Donzel WC.**, A role for caveolin transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane, **1996**, *J Biol Chem* 271(46):29427- 29435.
95. **Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, and Lisanti MP.** Role of caveolae and caveolins in health and disease. **2004**. *Physiol Rev* 84: 1341–1379.
96. **Rothberg KG, Heuser JE., Donzell WC**, Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats., **1992**, *Hücre*, 68(4):673-682.

97. **Dupree P, Parton RG, Raposo G**, Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial hücreler., **1993**, *EMBO*, 12(4):1597-1605.
98. **Glenney JR Jr.** Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virüs., **1989**, *J Biol Chem*, 264(34):20163-20166.
99. **Glenney JR Jr.**, The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles, **1992**, *FEBS Letters*, 314(1):45-48.
100. **Uittenbogaard A, Ying Y**, Smart EJ., Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking., **1998**, *J Biol Chem*, 273(11):6525-6532.
101. **Oh YS., Lee TS, Cheon GJ**, Modulation of insulin sensitivity and caveolin-1 expression by orchidectomy in a non-obese type 2 diabetes model, **2010**, *Mol Med*, 16.
102. **Park DS., Cohen AW, Frank PG**, Caveolin-1 null (-/-) mice show dramatic reductions in life span, **2003**, *Biochemistry*, 42(51):15124-15131.
103. **Thyberg J.** Caveolin-1 and caveolae act as regulators of mitogenic signaling in vascular smooth muscle hücreler. **2003**, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1481–1483,
104. **Yamamoto M., Toya Y., Schwencke C.**, Caveolins is an activator of insulin receptor signaling, **1998**, *J Biol Chem*, 273(41):26962-26968.
105. <http://www.lonza.com>
106. **Spoerke J. M , O'Brien C. , Huw L., Koeppen H., Fridlyand J., Brachmann R. K., Haverty P. M., Pandita A., Mohan S., Sampath D., Friedman L. S., Ross L., Hampton G. M., Amler L. C., Shames D. S., and Lackner M. R.**, Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Pathway Alterations Are Associated with Histologic Subtypes and Are Predictive of Sensitivity to PI3K Inhibitors in Lung Cancer Preclinical Models, December 15 **2012**, *Clin Cancer Res*; 18(24), 6771-6783.
107. **Wary KK., Mariotti A., Zurzolo C.**, Requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage- depended hücre growth, **1998**, *Hücre*; 94(5):625-634.
108. **English KM, Steeds R, Jones TH.**, Testosterone and coronary heart disease: is there a link? , **1997**, *QJM* 90:787–791.
109. **English KM, Mandour O, Steeds RP.**, Men with coronary artery disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms., **2000**, *Eur Heart J*, 21:890–894.
110. **Duell PB, Bierman EL.** The relationship between sex hormones and highdensity lipoprotein cholesterol levels in healthy adult men. **1990**, *Arch Intern Med* 150:2317– 2320,

111. **Khaw KT, Barrett-Connor E.**, Endogenous sex hormones, high density lipoprotein cholesterol, and other lipoprotein fractions in men. **1991**, *Arterioscler Thromb* 11:489– 494,.
112. **Hromadova M, Hacik T, Malatinsky E.**, Alterations of lipid metabolism in men with hypotestosteronemia. **1991**,*Horm Metab Res* 23:392–394.
113. **Hromadova M, Hacik T, Malatinsky E**, Lipid metabolism in young males with hypotestosteronaemia and oligospermia prior to, during, and after treatment. **1991**, *Int Urol Nephrol* 23:69–75.
114. **Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I.**, Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits. **1999**, *Circ Res* 84:813–819.
115. **Rosano GM, Leonardo F, Pagnotta P.**, Acute anti-ischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease, **1999**, *Circulation* 99:1666–1670.
116. **Webb CM, Adamson DL, de Zeigler D**, Effect of acute testosterone on myocardial ischemia in men with coronary artery disease., **1999**, *Am J Cardiol* 83:437– 439.
117. **Lopes, RAM; Neves, KB; Pestana, CR; Queiroz, AL; Zanotto, CZ; Chignalia, AZ; Valim, YML; Silveira, LR; Curti, C; Tostes, RC.**, Testosterone induces apoptosis in vascular smooth muscle hücres via extrinsic apoptotic pathway with mitochondria-generated reactive oxygen species involvement, **2014**, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, doi:10.1152/ajpheart.00809.2013.
118. **Malkin C J, Pugh P J, Jones R D, Jones T H and Channer K S**, Testosterone as a protective factor against atherosclerosis – immunomodulation and influence upon plaque development and stability, **2003**, *Journal of Endocrinology* 178, 373–380.
119. **Ghada S. Hassan, Terence M. Williams, Philippe G. Frank, and Michael P. Lisanti**, Caveolin-1-deficient aortic smooth muscle hücre show hücre autonomous abnormalities in proliferation, migration, and endothelin-based signal transduction, **2006**, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H2393–H2401.
120. **Yasutomo Nasu, Terry L. Timme, Guang Yang, Chris H. Bangma, Likun Li, Chengzhen Ren, Sang Hee Park, Marlene DeLeon, Jianxiang Wang and Timothy C. Thompson**, Suppression of caveolin expression induces androgen sensitivity in metastatic androgen-insensitive mouse prostate cancer hücre, **1998**, *Nature Medicine* 4, 1062 – 1106.
121. **Li L., Yang G, Ebara S**, Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer hücre, **2001**, *Cancer Res*, 61:4386-4392.
122. **Grace Miralles and Brian D Cohen**, Analyzing the Role of Caveolin in Human Follicle Stimulating Hormone Receptor Regulation, April 1–4 **2016**, Endocrine Society's 98th Annual Meeting and Expo, Boston.
123. **Hannes M. Findeisen, Florian K. Kahles, Dennis Bruemmer**, Epigenetic Regulation of Vascular Smooth Muscle Hücre Function in Atherosclerosis, **2013**, *Curr Atheroscler Rep*, 15:319.

## ÖZGEÇMİŞ



1986 yılında Mersin’de doğdum. İlkokulu Mersin Pirireis İlköğretim Okulunda, orta okul ve liseyi Mersin Yusuf Kalkavan Anadolu Lisesi’nde okudum. Lisans eğitimimi 2010 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde tamamladım. 2014 Şubat ayında başladığım Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı’ndaki yüksek lisans eğitimime hala devam etmekteyim.