

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HOMOSİSTEİN TOKSİSİTESİNE SÜLFİT MOLEKÜLÜNÜN OLASI KATKISI VE
OKSİDATİF STRESİN ROLÜNÜN NÖROBLASTOMA HÜCRE DİZİSİNDE
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. GÜLŞAH GÜNDOĞDU

DANIŞMAN

Doç. Dr. VURAL KÜÇÜKATAY

DENİZLİ - 2012

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HOMOSİSTEİN TOKSİSİTESİNE SÜLFİT MOLEKÜLÜNÜN OLASI KATKISI VE
OKSİDATİF STRESİN ROLÜNÜN NÖROBLASTOMA HÜCRE DİZİSİNDE
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. GÜLŞAH GÜNDOĞDU

DANIŞMAN

Doç. Dr. VURAL KÜÇÜKATAY

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin201... tarih venolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2012

Doç. Dr. Vural KÜÇÜKATAY danışmanlığında Dr. GÜLŞAH GÜNDOĞDU tarafından yapılan “**Homosistein Toksisitesine Sülfid Molekülünün Olası Katkısı Ve Oksidatif Stresin Rolünün Nöroblastoma Hücre Dizisinde İncelenmesi**” başlıklı tez çalışması 17/10/2012 Tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim/Bilim Dalı’nda TIPTA /YANDAL UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof. Dr. Günfer TURGUT

ÜYE: Prof. Dr. Sadettin ÇALIŞKAN

ÜYE: Doç. Dr. Vural KÜÇÜKATAY

**Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.
26/11/2012.**

**Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanı
Prof. Dr. Mustafa KILIÇ**

TEŞEKKÜR

Başta tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Vural Küçükataş olmak üzere her birinin eğitimime sonsuz katkısı bulunan Fizyoloji Anabilim Dalında görevli öğretim üyeleri Prof. Dr. Melek Bor-Küçükataş, Prof. Dr. Sebahat Turgut, Prof. Dr. Günfer Turgut, Prof. Dr. Osman Genç, Prof. Dr. Saadettin Çalışkan'a; tezimin her aşamasında emeği geçen Tıbbi Biyoloji öğretim üyesi Dr. Yavuz Dodurga'ya; tez çalışmam boyunca yardımlarını ve laboratuvarını benden esirgemeyen Histoloji ve embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Çevik Tufan'a; tez çalışmam boyunca her zaman yanımda olan sevgili eşim Dr. Köksal Gündoğdu'ya; her konuda yardımcı olan abim Yrd. Doç. Dr. Alper Kürşat Demirkaya, ablam Yrd. Doç. Dr. Fatma Demirkaya Milođlu ve eşi Yrd. Doç. Dr. Özkan Milođlu'ya; her türlü manevi desteği nedeniyle Zuhal Güçlü'ye; asistan arkadaşlarıma; morfoloji binasında görev yapan temel bilimler öğretim elemanları ve çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak yaşamımın bana verdiği en değerli hediye olan ailemin, her bireyine teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIII
TABLolar DİZİNİ....	XV
ÖZET.....	XVI
SUMMARY.....	XVII
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
AMİNO ASİDLER.....	3
KÜKÜRT İÇEREN AMİNO ASİDLER	3
HOMOSİSTEİN	4
Homosistein Metabolizması	5
Remetilasyon Yolu	7
Transsülfürasyon Yolu	8
Homosisteinin Hidrolizi.....	9
Homosistein Metabolizmasının Regülasyonu.....	9

Plazmadaki Homosistein Formları	11
Hiperhomosisteinemi ve Nedenleri	12
Homosistein Metabolizmasındaki Genetik Bozukluklar	13
Kronik Hastalıklar	14
Edinsel Nedenler	15
Fizyolojik Nedenler.....	17
İlaçlar	18
Hiperhomosisteinemi ile İlişkili Hastalıklar	18
SÜLFİTLER	19
SO ₃ ⁻ 'in Hücresel Sıvılarda Temel Kimyasal Reaksiyonu	20
SO ₃ ⁻ 'e Maruz Kalma.....	21
Endojen Maruz Kalma	21
Eksojen Maruz Kalma	22
SO ₃ ⁻ Toksisitesi	23
SO ₃ ⁻ 'in O ₂ ve Kükürt Merkezli Radikaller Oluşturması	24
SO ₃ ⁻ Metabolizması.....	26
Oksidatif Olmayan SO ₃ ⁻ Metabolizması.....	26
Oksidatif SO ₃ ⁻ Metabolizması	26
İnsanlarda Gözlenen SOX Eksikliği	28
SO ₃ ⁻ 'in Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	29
GEREÇ VE YÖNTEMLER	33

HÜCRE KÜLTÜRÜ AŞAMASINDA KULLANILAN CİHAZLAR VE KİMYASALLAR.....	33
SH-SY5Y HÜCRELERİNİN KÜLTÜRE EDİLMESİ	34
SH-SY5Y Hücrelerinin Çoğaltılması ve Pasajlanması	35
SH-SY5Y Canlı Hücrelerinin Sayılması.....	36
SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması.....	38
Dondurulmuş SH-SY5Y Hücrelerinin Çözdürülmesi.....	38
SÜLFİT VE HOMOSİSTEİN SİTOTOKSİSİTESİNİN BELİRLENMESİ İÇİN DENEY DÜZENEĞİNİN KURULMASI.....	39
XTT SİTOTOKSİSİTE TESTİ	39
OKSİDATİF STRES DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ.....	41
Total Oksidan (TOS) ve Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçüm Yöntemleri	41
TOS, TAS, OSİ, ve Comet Analizi İçin Deney Düzeneginin Kurulması ...	42
TOS, TAS, OSİ Değerinin Hesaplanması.....	42
Lowry Yöntemi.....	44
SÜLFİT VE HOMOSİSTEİN GENOTOKSİSİTESİNİN BELİRLENMESİ.....	46
Komet Assay (Tek Hücre Elektroforezi)	47
Görüntü Analizi	48
İSTATİKSEL YÖNTEMLER.....	48
BULGULAR	49
SİTOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ.....	49

Sülfit Sitotoksitesinin Belirlenmesi	49
Homosistein Sitotoksitesinin Belirlenmesi	50
Sülfit + Homosistein kombinasyonunun Sitotoksitesi	51
OKSİDATİF STRES İNDEKSİNİN BELİRLENMESİ.....	54
Total Oksidan Seviyelerinin Belirlenmesi (TOS).....	54
Total Antioksidan Seviyelerinin Belirlenmesi (TAS)	54
Oksidatif Stres İndeksinin Belirlenmesi (OSİ).....	55
GENOTOKSİSİTENİN BELİRLENMESİ.....	56
Baş Uzunluğunun Belirlenmesi.....	57
Baş Yoğunluğunun Belirlenmesi.....	58
Kuyruk Yoğunluğunun Belirlenmesi.....	59
Kuyruk Uzunluğunun Belirlenmesi.....	60
Kuyruk Momenti ve migrasyonunun Belirlenmesi.....	61
TARTIŞMA	63
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR.....	76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

α_1 -AP	: α_1 -antiproteinaz
$\cdot O_2^-$: Süperoksil radikali
$^{\circ}C$: Santigrat derece
μmol	: Mikromol
5,10-MTHFR	: 5,10- Metilen Tetra Hidro Folat
5-MTHF	: 5-metiltetrahidrofolat
A β	: β -amiloid
AD	: Alzheimer hastalığı
ADMA	: Asimetrik dimetil arginin
AO	: Akaidin oranj
AOX	: Aldehit oksidaz
BHMT	: Betain homosistein metiltransferaz
Ca	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
CBS	: Sistasyonin beta sentaz
CDO	: Sistein dioksijenaz
CO₂	: Karbon dioksit
COOH	: Karboksil grup
CuSO₄.5H₂O	: Bakır sülfat 5 sulu
DF	: Dilüsyon faktörü
dL	: Desilitre
DMG	: N,N-dimetilglisin
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DTT	: Dithiothreitol
EB	: Etidyum bomür
FBS	: Fötal sığır serum
g	: Gram

GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSSO₃	: S-sulfoglutasyon
GST	: Glutasyon S-transferaz
H	: Hidrojen
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₂SO₃	: Sülföröz asit
HCl	: Hidroklorik asit
HL	: Baş uzunluğu
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografi
HR	: Horseradish peroksidaz
HS⁻	: Hidra sülfid anyonu
HSO₃⁻	: Bisülfid
IgE	: İmmünglobulin E
IL 6	: İnterlökin 6
ILBD	: Incidental Lewy Body hastalığında
IL-β	: İnterlökin β
KBY	: Kronik böbrek yetmezliği
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
KKH	: Konjestif kalp hastalığı
L	: Litre
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LMA	: Düşük ısıda eriyen agaroz
mA	: Mili amper
MAT	: Metiyonin adenozil transferaz
mg	: Miligram
Mg	: Magnezyum
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mm³	: Milimetre küp

MMA	:	Metilmalonik asit
mmol	:	Milimol
MPT sentaz	:	Molibtopterin Sentaz
MS	:	Metiyonin sentaz
Na/K-tartarat	:	Sodyum potasyum tartarat
Na₂CO₃	:	Sodyum karbonat
Na₂S₂O₅	:	Sodium Metabisulphite
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaOH	:	Sodium hidroksit
NH₂	:	Amino grup
NH₄	:	Amonyum
nm	:	Nanometre
NMA	:	Normal ısıda eriyen agoroz
NMDA	:	N-metil- D-aspartat
NO	:	Nitrik oksit
·O₃SOO	:	Kükürt peroksit radikali
OH	:	Hidroksil radikali
ONOO-	:	Peroksitnitrit anyonu
OSAHS	:	Obstruktif uyku apne/hipopne sendromu
OSİ	:	Oksidatif Stres İndeksi
PAH	:	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların
PBS	:	Fosfat tamponu
PD	:	Parkinson hastalığı
PDO	:	Polifenol oksidaz
PGH sentaz	:	Prostaglandin hidroperoksidaz
R	:	Amino asidlerin yan grubu
RNA	:	Ribo nükleik asit
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
SDMA	:	Simetrik dimetil arginin
SO₄⁻	:	İnorganik sülfat
SO₂	:	Kükürt dioksit
SO₃	:	Kükürt trioksit

SOX	:	Sülfit oksidaz
TAS	:	Total Antioksidan Seviye
TBARS	:	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri
TL	:	Kuyruk uzunluğu
TNF α	:	Tümör nekroz faktör α
TOS	:	Total Oksidan Seviye
UV	:	Ultraviole
XO	:	Ksantin oksidaz
μg	:	Mikrogram

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Kükürt İçeren Amino Asitlerin Yapısı.....	3
Şekil 2. Homosistein Oluşumu.....	6
Şekil 3. Homosistein Çeşitli Yolaklar İle Metabolize Edilmesi.....	7
Şekil 4. Sistein Katabolizması Esnasında Sülfite Oluşumu.....	21
Şekil 5. Sülfite Oksidaz Enziminin Şematik Gösterimi	27
Şekil 6. Sülfite Oksidaz Tarafından Katalizlenen Reaksiyonun Şematik Gösterimi	27
Şekil 7. SH-SY5Y Hücrelerinin Mikroskopik Görüntüsü	33
Şekil 8. SH-SY5Y Hücrelerinin Yaklaşık 1 Hafta Sonraki Pasajlanma Öncesi Mikroskopik Görüntüsü.....	36
Şekil 9. Thoma Lamı	37
Şekil 10. XTT' nin Formazana Dönüşümü	40
Şekil 11. Lowry Protein Standart Eğrisi	45
Şekil 12. Artan sülfite dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi	49
Şekil 13. Artan homosistein dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi	50
Şekil 14. Artan homosistein dozlarına 0.1 mM sülfite ilavesiyle 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi	51
Şekil 15. Artan homosistein dozlarına 1 mM sülfite ilavesiyle 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi.	52
Şekil 16. Artan homosistein dozlarına 5 mM sülfite ilavesiyle 24 saat inkübasyonunu takiben XTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi	53
Şekil 17. Yüksek sülfite (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat	

inkübasyonunu takiben belirlenen total oksidan düzeyi	54
Şekil 18. Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben belirlenen total antioksidan düzeyi	55
Şekil 19. Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben belirlenen oksidatif stres indeksi	55
Şekil 20. Grupların 24 saat inkübasyonunu takiben Comet analizi ile demonstratif olarak görüntüsü	56
Şekil 21. Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen baş uzunluğu değerleri	57
Şekil 22. Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen baş yoğunluğu değerleri	58
Şekil 23. Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen kuyruk yoğunluğu değerleri	59
Şekil 24. Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen kuyruk uzunluğu değerleri	60
Şekil 25. Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen kuyruk momenti değerleri	61
Şekil 26. Yüksek sülfid (5 mM) ve homosistein (250 µM) dozlarının 24 saat inkübasyonunu takiben Comet yöntemi ile değerlendirilen kuyruk migrasyonu değerleri	62

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Total Plazma Homosistein Bileşenleri ve Yüzdeleri.....	11
Tablo 2. Total Plazma Homosistein Dağılımı	12
Tablo 3. Hiperhomosisteinemi Nedenleri.....	13
Tablo 4. Hücre Kültürü Aşamasında Kullanılan cihazlar	33
Tablo 5. Hücre Kültürü Aşamasında Kullanılan kimyasal maddeler	34

ÖZET

Homosistein Toksisitesine Sülfıt Molekülünün Olası Katkısı Ve Oksidatif Stresin Rolünün Nöroblastoma Hücre Dizisinde İncelenmesi

Dr. Gülşah GÜNDOĞDU

Homosistein, Metiyonin metabolizması sırasında oluşan kükürt içeren bir amino asittir. Sağlıklı kişilerde plazma homosistein düzeyi, remetilasyon ile metiyonine, transsülfürasyon yolu ile sistein aminoasidine dönüşümünü sağlayan yollar aracılığıyla yaklaşık 5-15 $\mu\text{mol/L}$ gibi düşük bir düzeyde tutulur. Artmış plazma homosistein düzeyi başta nörolojik olmak üzere pek çok hastalık için risk faktörüdür. Nörodejeneratif hastalıklarda, homosisteine ilaveten plazma sistein düzeyi artmakta ve sülfat düzeyi azalmaktadır. Sülfat temel olarak güçlü bir nörotoksik molekül olan sülfıt molekülünden sülfıt oksidaz aracılığı ile oluşturulur. Sülfıtın sülfıt oksidaz enzimi ile sülfata çevrilerek detoksifiye edilmesi hayati önem taşır. Bu çalışmanın amacı, homosistein nörotoksitesine sülfıt molekülünün olası katkısı ve bu katkıda oksidatif stresin rolünü SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri kullanarak araştırmaktır. Çalışmamızda, homosistein ve sülfıtın oluşturduğu sitotoksosite XTT testi ile genotoksosite Comet yöntemi ile oksidatif stresin rolü TAS-TOS kiti ile incelendi. Sülfıt ve homosistein'in beraber uygulandığı hücre dizisinde tek başlarına oluşturdukları sitotoksositeye göre toksik etkilerinin istatistiksel olarak daha da önemli olduğu bulunmuştur. Bu etkide oksidan stresin oynadığı önemli rol oksidatif stres indeksinin beraber uygulandıklarında, diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulunması ile ortaya konmuştur. Genotoksosite açısından ise en fazla hasarın yine homosistein+sülfıt grubunda olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasından çok önce izlenen homosistein artışına, benzer şekilde sülfıt artışında eşlik etmesi izlenen nörodejenerasyonun önemli bir bileşeni olabilir.

Anahtar Kelimeler: Homosistein, Sülfıt, Nörotoksosite, Nörodejeneratif hastalıklar.

SUMMARY

Possible Contribution of Sulfide Molecule on Homocysteine Toxicity and Investigation of Role of Oxidative Stress in Neuroblastoma Cell Line

Dr. Gülşah GÜNDOĞDU

Homocysteine is an amino acid, which is formed during methionine metabolism that contains sulfur. Plasma homocysteine level in healthy individuals is kept in a low level such as 5-15 $\mu\text{mol/L}$ by means of the pathways that ensure transformation to methionine via remethylation and to cystein amino acid through transsulfuration. An increased plasma homocysteine level is a risk factor for many diseases, particularly for neurological ones. In neurodegenerative diseases, the cystein level of plasma increases along with the homocystein, and the sulfate level decreases. Basically, Sulfate is formed from sulfite which is a strong neurotoxic molecule produced by sulfite oxidase enzyme. Transformation of sulfite to sulfate plays a vital role. The purpose of our study is to investigate the potential contribution of sulfite molecule to homocystein induced neurotoxicity and the role of oxidative stress in this process. In our study, the cytotoxicity caused by sulfide and homocysteine was investigated with XTT test in SH-SY5Y neuroblastoma cells. Genotoxicity and the role of oxidative stress was also investigated with comet method and TAS-TOS kit, respectively. According to statistical calculations, simultaneous administration of sulfite and homocystein on SH-Sy5Y cell line was found to be significantly more toxic than the individual administration of them in terms of sitotoxicity. In this effect, the significant role of the stress of oxidant was declared by statistically significant results of that administration with respect to other groups when both of them were administrated at the same time. The maximum damage in terms of genotoxicity was also found in the homocysteine + sulfite group. In conclusison, Consequently, an elevation of sulfite accompanying that of the homocysteine increase observed before the occurrence of disease symptoms characterized with neurodegeneration, may be an important component neurodegeneration.

Key words: Homocysteine, Sulfide, Neurotoxicity, Neurodegenerative Diseases