

## Folik Asidin Endotel Hücresinde Proliferasyon Üzerine Etkisi

### The Effect of Folic Acid on Proliferation in Endothelials

Ahu Pakdemirli , Feriha Toksöz 

Özgün Arařtırma  
Research Article

#### öz

**Amaç:** Endotel hasarın iyileşmesi, doku yenilenmesi ve onarımında önemli bir faktör olan folik asit, yapı taşı moleküllerin sentezinde görev almaktadır. Bu çalışmada, folik asitin endotel hasarı iyileştirmedeki etkisi araştırıldı.

**Yöntem:** Endotel hücre hasarının onarımı gerçek zamanlı canlı hücre görüntüleme sistemi xCELLigence RTCA ile HUVEC hücre hattı kullanılarak gerçek zamanlı olarak ölçüldü. Kullanılan hücre hattında 2,5-100 µM aralığındaki yedi farklı konsantrasyonlarda folik asit ve folik asit inhibitörlerinin hücre proliferasyonuna etkisi incelendi. Elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizi SPSS Windows V.15.0. programı ile yapıldı.

**Bulgular:** Oluşturulan standart in vitro yara iyileşme modelinde folik asitin endotel hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi olduğu gözlemlendi. Folik asit aynı zamanda hücre migrasyonunda da artırıcı bir etkiye sahiptir.Yapılan çalışmada, yara kapanma hızı folik asit varlığında artmıştır.

**Sonuç:** Folik asitin yedi farklı konsantrasyonu ile yapılan çalışmada (2,5-100 µM), kültür ortamı ile büyütülen kontrol hücrelerine göre çoğalmayı %90 arttıran folik asit dozu (EC 90 dozu) 100 µM olarak; EC 50 dozu 25 µM olarak bulundu. Kırk sekiz saat süresince kaydedilen hücre çoğalması, hücre indeksi (CI) olarak zamana göre grafiklendi ve yara iyileşmesi görüntüleri alındı. Folik asitin endotel hasar onarımındaki artırıcı etkisi folik asit inhibitörleri varlığında etkinin azalmasıyla kanıtlandı.

**Anahtar kelimeler:** Folik asit, endotel hasar, standart in vitro yara iyileşme modeli

#### ABSTRACT

**Objective:** Folic acid, an important factor in the recovery, and repair of endothelial damage, assumes a role in the synthesis of building block molecules. In this study, the effect of folic acid on improving endothelial injury was investigated.

**Methods:** Repair of endothelial cell damage was measured in real time using real-time live cell imaging system xCELLigence RTCA on HUVEC cell line. The effect of different concentrations of folic acid and folic acid inhibitors on cell proliferation was investigated. All data were statistically analyzed by using the SPSS for Windows V.15.0.

**Results:** In the standard in vitro wound healing model constructed, it was observed that folic acid had a proliferative effect on endothelial cells. Folic acid also has an enhancing effect on cell migration. In the study, the rate of wound closure increased in the presence of folic acid.

**Conclusion:** In a study performed with seven different concentrations of folic acid (2.5-100 µM), the dose of folic acid (EC 90 dose) that increased cellular proliferation by 90%, and 50% (EC50) with respect to control cells grown in culture medium were found to be 100 µM, and 25 µM, respectively. Cell proliferation index (CI) recorded for 48 hours was plotted against time, and images cellular healing at different time points were obtained. The effect of folic acid on endothelial damage repair was evidenced by the decrease in the presence of folic acid inhibitors.

**Keywords:** Folic acid, endothelial damage, standard in vitro wound healing model

Alındığı tarih: 18.02.2019

Kabul tarihi: 07.03.2019

Online Yayın tarihi: 26.03.2019

Ahu Pakdemirli

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu İlk ve Acil Yardım Programı, İzmir, Türkiye

✉ ahu@pakdemirli.com

ORCID: 0000-0001-9224-3007

F. Toksöz 0000-0002-6262-173X

Dokuz Eylül Üniversitesi

Taylor of Science

Biyoteknoloji İnovasyon A.Ş.

Dokuz Eylül Teknoloji

Departmanı Zone-DEPARK,

İzmir, Turkey

Bu makale için 31.12.2019 tarihinde 29:3 sayımızda düzeltme yayınlanmıştır.

This article has been published in our 29: 3 issue on 31.12.2019.



© Telif hakkı T.C. Sağlık Bakanlığı İzmir Tepecik Eđit. ve Arařt. Hastanesi. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Association of Publication of the T.C. Ministry of Health İzmir Tepecik Education and Research Hospital. This journal published by Logos Medical Publishing.

Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

Cite as: Pakdemirli A. Folik asidin endotel hücrelerinde proliferasyon üzerine etkisi. Tepecik Eđit. ve Arařt. Hast. Dergisi. 2019;29(1):86-90.

## GİRİŞ

Doku hasarı, beraberinde nötrofiller ve makrofajlar gibi proinflamatuvar sitokin üreten hücrelerin infiltrasyonu ile karakterize edilen iyileşme sürecini başlatır, bunu ekstraselüler matriks (ECM) oluşturan fibroblastların gelmesi ve yeni doku formasyonunun oluşumu izler. Bu süreçte yara kapanmasında hücre sel proliferasyon etkilidir. Hücreler ECM'in yeniden modellemesini pozitif olarak düzenleme ve normal cilt mimarisinin ve işleyişinin rejenerasyonunu uyarma eğilimindedir. Bu etkilere parakrin sinyalleme aracılığı eder <sup>(1)</sup>. Yara iyileşmesi, hücre göçü, iltihaplanma, anjiyogenez, granülasyon dokusu oluşumu, yeniden epitelizasyon ve ECM yeniden modellemesi gerektiren karmaşık bir süreçtir <sup>(2)</sup>. Endotel gibi özelleşmiş doku hasarlarının tedavisi ve önlenmesi klinik öneme sahiptir. Geliştirilen modern tedavi yöntemlerine rağmen kronik yaraların %50'sinden fazlası tedaviye dirençli kalmaktadır <sup>(3)</sup>.

Folik asit (folat, pteroylglutamic asit veya vitamin B9), pteridin halka yapısı ve/veya glutamik asit kalıntılarının sayısı ile üretilen bir grup kimyasal yapı olarak bilinen, vücut sağlığı, büyüme ve gelişme için gerekli suda çözünür B vitaminidir <sup>(4)</sup>. Folik asit DNA bazlarının sentezi için gereklidir <sup>(5)</sup> ve DNA'ya metil grubu sağlayarak DNA sentezini ve DNA metilasyonunu etkileyebilen bir kanser önleyicidir <sup>(6)</sup>. Aynı zamanda birçok metabolizma sürecinde önemli rol oynar ve kardiyovasküler, zihinsel hastalıklar, kanser ve doğum kusurlarına karşı korunmaya yardımcı olabilir. Literatürde folik asidin nöral tüp üzerine etkileri <sup>(7-9)</sup> ve kanser önleyici etkilerine yönelik çalışmalar bulunmaktadır <sup>(10)</sup>.

Çalışmada folik asit inhibitörü olarak Metotreksat (MTX) kullanılmıştır. Metotreksat kimyasal yapısı, "4-Amino-10-methylfolic acid hydrate" olan bir "Antifolan hydrate"dir. Metotreksat, dihidrofolatın tetrahidrofolata dönüşümünü katalize eden enzim olan dihidrofolat redüktazın (DHFR) allosterik inhibi-

törüdür. Pürin ve pirimidin sentezi için tetrahidrofolat gerekli olduğundan, metotreksat etkisi DNA ve RNA sentezinin inhibisyonu ile sonuçlanır <sup>(11)</sup>.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hücre Kültürü

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) (ATCC CRL-1730) hücre hattı American Type Culture Collection (Rockville, CT, USA) tarafından sağlandı. %10 fetal bovine serum (FBS, Cegrogen Biotech GmbH, Stadtallendorf, Germany) ve %1 penicillin/streptomycin (BiochromGmbH, Berlin, Germany) eklenen Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) hücre kültür ortamında ve normoksik koşullar altında (37°C'de, %5'lik CO<sub>2</sub>) kültüre edildi.

### xCELLigence ile Gerçek Zamanlı Hücre Büyümesi ve Çoğalması Deneyi

xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) hücre canlılık analizi için hücreler uygun besi ortamında çoğaltıldı. 96 kuyucuklu hücre kültürü platerine 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekildi ve cihazda 48 saat boyunca her 15 dk.'da bir olacak şekilde ölçüm yapılarak CI (cell index) grafiği elde edildi. Negatif kontrol olarak hücre kültür ortamı, pozitif kontrol olarak folik asit eklenmeyen hücre grupları kullanıldı.

### İstatistiksel Analiz

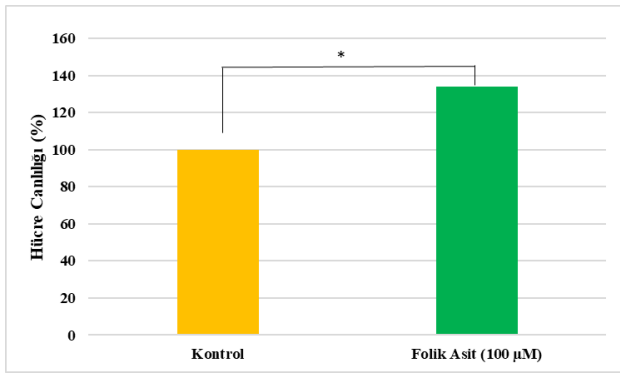
Veri analizi için SPSS V.15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA) yazılım programı kullanıldı. SE (standart sapma) ve ortalamalar hesaplandı. Gruplar arasındaki anlamlılık non-parametrik Mann Whitney U testi ile yapıldı. İstatistiksel anlamlılık için p değeri <0.05 olarak kabul edildi.

## BULGULAR

### Folik Asit Hücresel Proliferasyonu Uyarır

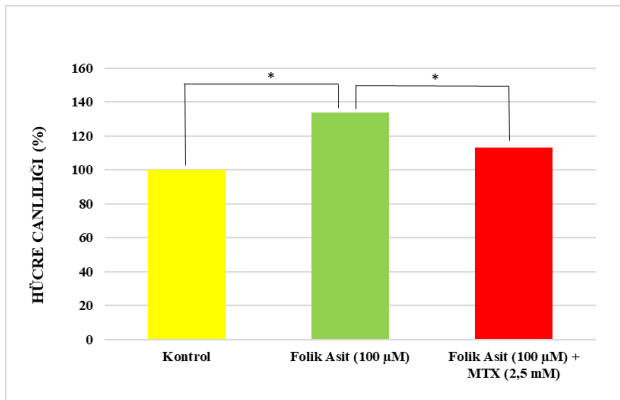
Endotel hücre hattı ile oluşturulan proliferasyon deneylerinde folik asidin farklı konsantrasyonlarda

hücre proliferasyonuna etkisi araştırılmıştır. Bu etkinin folik asitten kaynaklandığını göstermek için folik asidin inhibitörü olan MTX'in toksik olmayan dozu saptanmış ve hücre kültür ortamına eklenmiştir. Folik asit tek başına endotel hücre hattında hücre çoğalmasını arttırdığı gözlenmiştir. Folik asidin yedi farklı konsantrasyonu ile (2.5-100  $\mu$ M), kültür ortamında büyütülen kontrol hücreleri karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda 100  $\mu$ M folik asit dozunda hücreler %33 oranında daha fazla proliferasyon göstermiştir. Şekil 1'de 48 saat sonunda kontrol grubuna karşı kaydedilen hücre çoğalması Hücre Canlılığı (%) olarak verilmiştir.



Şekil 1. Folik asit proliferasyon analizi.

Farklı konsantrasyonlarda denenen folik asidin endotel hücre hattı üzerinde %33 proliferasyonu indükleyici konsantrasyonu 100 $\mu$ M ölçülmüştür. Hücre proliferasyon artışı 48. saat sonunda %Hücre Canlılığı oranı ile verilmiştir.



Şekil 2. Folik asit inhibitörünün folik asit üzerindeki etkisi.

Folik asit inhibitörünün toksik olmayan en yüksek dozu 2,5mM olarak saptanmıştır ve folik asidin endotel hücreleri üzerindeki etkisi, inhibitörü ile kombine kullanımda 48. saat sonunda %Hücre Canlılığı grafiği olarak verilmiştir.

Folik asit inhibitörünün endotel hücre hattında toksik olmayan dozlarının saptanması amacı ile farklı konsantrasyonlarda MTX ile hücre kültürü çalışmaları yapılmış ve toksik olmayan en yüksek doz 2,5 mM olarak saptanmıştır.

Folik asidin endotel hücre hattı üzerindeki etkisini inhibitörü ile kombine veren Hücre Canlılığı (%) grafiği Şekil 2'de verilmiştir.

## TARTIŞMA

Endotel doku hasarının karmaşık süreci, iltihaplanma, proliferasyon, anjiyogenez, epidermal restorasyon, yara kontraksiyonu ve yeniden modelleme dahil, örtüşen fazlarda meydana gelir. Pro-inflamatuar reaksiyonlar yara onarımını başlatırken vazgeçilmez roller oynadığından, uzun süreli inflamasyon cilt yaralanmasında zararlı etkiler gösterir. Doku hasarının onarımında rejenerasyon işlemleri normal olarak hücre dışı matris, hücreler ve parakrin faktörleri arasındaki karmaşık etkileşimler aracılığıyla gerçekleşir. Bir ya da birkaç bozuk mekanizmanın neden olduğu başarısız ya da dağınık iyileşme süreçleri birçok hastalıkta yara iyileşmesinde zorluklara neden olabilir <sup>(12)</sup>.

Bu çalışmada folik asidin endotel dokudaki proliferasyonuna etkisi ve bununla beraber hasar onarım mekanizmasına etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar folik asidin hücre çoğalması üzerinde arttırıcı bir etkiye sahip olduğuna ve endotel hasarın onarımını indüklediğine işaret etmektedir. Bununla beraber folik asit inhibitörü olan MTX'in varlığı proliferasyonu sınırlar.

Endotel hasar onarımı sırasında hücrelerin göçü ve mitotik bölünme hızları üzerinde önemli bir etkisi vardır. Winter <sup>(13)</sup>, tarafından yapılan çalışmada endotel hasar onarımının, hücrelerin hasar yüzeyinde birbiri üzerindeki hareketlerinden etkilendiğini göstermiştir. Ayrıca, folik asidin DNA sentezi ve ona-

rımı için gerekli olduğu bilinmektedir <sup>(14)</sup>. Folik asit, in vivo folik asit redüktaza cevap olarak aktif tetrahidro-folik aside indirgenebilir. Tetrahidrofolik asit, karbon biriminin ana taşıyıcısı olduğundan ve pürin ve pirimidin sentezinde ve amino asitlerin karşılıklı dönüşümünde rol oynadığından, in vivo olarak bu vitamin eksikliği, karbon biriminin iletimini engelleyebilir. Bunun sonucu olarak nükleik asit sentezi ve hücre çoğalması, doku büyümesi ve gelişimi için gerekli amino asit metabolizmasını da etkiler. Bu nedenle folik asit, kök hücrelerin proliferasyonunun ve farklılaşmasının gelişiminde de kritik bir rol oynar <sup>(15)</sup>. Ohrvik ve ark. <sup>(16)</sup> tarafından yapılan bir çalışmada 14 günlük folik asit tedavisinin otolog yetişkin kök hücre proliferasyonunu ve in vivo olarak farklılaşmasını indükleyerek yara iyileşmesini arttırdığını göstermişlerdir. Bir diğer in vivo çalışma ise Zhao M ve ark. <sup>(17)</sup> tarafından diabetik fareler üzerinde yapılan yara iyileşmesi çalışmasıdır. Çalışma sonucunda folik asidin yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkisi gözlenmiştir.

Bu çalışma ile, standart in vitro proliferasyon modelinde folik asidin hasar onarımını indükleyici bir etkisi olduğu folik asit inhibitörü olan MTX'in kombine kullanımını ile kanıtlanmıştır. Literatürden elde edilen hayvan modellerinin de katkısıyla, endotel hasarı nedeniyle oluşan hastalıklarda folik asidin iyileştirici etkisi üzerine in vivo çalışmalar yapılarak tıp alanında katkı sağlayacağı ön görülmektedir.

---

**Çıkar Çatışması:** Yoktur.

**Finansal Destek:** Hiçbir kurum/kuruluş tarafından destek alınmamıştır.

---

**Conflict of Interest:** None.

**Funding:** No support from any institution.

---

## KAYNAKLAR

1. Dylan EL, Nagi A, Devendra K, Agrawal L. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016;7:37. [\[CrossRef\]](#)
2. Ding D, Shyu W, Lin S. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*. 2011;20:5-14. [\[CrossRef\]](#)
3. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *Journal of Cell Physiology*. 2007;211:27. [\[CrossRef\]](#)
4. Wilson J. Folic Acid supplementation stimulates notch signaling and cell proliferation in embryonic neural stem cells. *Journal of Clinic Biochemistry Nutrition*. 2010;47:174-80. [\[CrossRef\]](#)
5. Lucock M. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *BMJ*. 2004;328:211-4. [\[CrossRef\]](#)
6. Choi SW, Mason JB. Folate status: Effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *The Journal of Nutrition*. 2001;132:2413-185. [\[CrossRef\]](#)
7. De-Regil LM, Fernández-Gaxiola AC, Dowswell T, Peña-Rosas JP. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010;10 CD007950. [\[CrossRef\]](#)
8. Imbard A, Benoist JF, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation. *International Journal of Environmental Research and Public*. 2013;9:4352-89. [\[CrossRef\]](#)
9. Melo FR, Bressan RB, Costa-Silva B, Trentin AG. Effects of folic acid and homocysteine on the morphogenesis of mouse cephalic neural crest cells in vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2017;37:371-6. [\[CrossRef\]](#)
10. Kuo CT, Chang C, Lee WS. Folic acid inhibits COLO-205 colon cancer cell proliferation through activating the FRα/c-SRC/ERK1/2/NFκB/TP53 pathway: in vitro and in vivo studies. *Scientific Reports*. 2015;5, Article number: 11187. [\[CrossRef\]](#)
11. Philip JH, Mara LB, David AC, Ronald ML, Amy SP, Eglar R, Dan T, Francesco Z. Methotrexate: new uses for an old drug. *The Journal of Pediatrics*. 2013;11-30.
12. Portou MJ, Baker D, Abraham D, Tsui J. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review. *Vascular Pharmacology*. 2015;71:31-6. [\[CrossRef\]](#)
13. Walter S. Krawczyk. A Pattern of epidermal cell migration during wound healing. *Journal of Cell Biology*. 1971;49(2):247. [\[CrossRef\]](#)
14. Duthie SJ, Hawdon A. DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. *The FASEB Journal*. 1998; 12. [\[CrossRef\]](#)

15. Chen Z, Lin S. Folic acid in combination with adult neural stem cells for the treatment of spinal cord injury in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(7).
16. Ohrvik VE, Witthoft CM. Human folate bioavailability. *Nutrients*. 2011;3:475-90. [\[CrossRef\]](#)
17. Zhao M, Zhou J, Chen YH, Yuan L, Yuan MM, Zhang XQ, Hu Y, Yu H. Folic acid promotes wound healing in diabetic mice by suppression of oxidative stress. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*. 2018;64(1):26-33. [\[CrossRef\]](#)