

**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KOLLAJEN BİYOSENTEZİNİ ARTTIRAN EPİDERMAL BÜYÜME
FAKTÖRÜ VE İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-1
MOLEKÜLLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE OPTİMUM
KONSANTRASYONLARININ BELİRLENEREK FİBROBLAST
HÜCRELERİ ÜZERİNDE DENENMESİ**

Erdal ERDOĞAN

MART 2017

ÖZET

KOLLAJEN BİYOSENTEZİNİ ARTTIRAN EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (EGF), İNSÜLİN BÜYÜME FAKTÖRÜ-1 (IGF-1) MOLEKÜLLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE OPTİMUM KONSANTRASYONLARININ BELİRLENEREK FİBROBLAST HÜCRELERİ ÜZERİNDE DENENMESİ

ERDOĞAN, ERDAL

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi

Danışman: Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Mart 2017, 65 sayfa

Kollajen; deri, kemik, kıkırdak, tendon ve diğer bağ dokularında bulunan ipliksi bir protein olup aynı zamana derinin orta katmanı olarak ifade edilen dermisin de iskelesini oluşturur. Kollajen, derinin sağlığını destekler ve deride dağınık olarak bulunan fibroblast hücrelerince üretilir. Yaşlanma süreci ile birlikte yapısal proteinler birbirlerine tutunurlar veya şekil değiştirirler. Bu değişimler proteinlerin görevlerini tam olarak yapamamalarına yol açar ve sonuçta kollajen kayıplarına, dokuların gevşekliğine ve cilt kırışıklıklarına yol açarlar.

Kozmetik sorunların çözümüne odaklı dermatoloji son yılların en popüler araştırma dallarından birini oluşturmaktadır. Cildin doğal yapısını ve gençliğindeki canlı rengini korumak , doğasında olan güzelliği yakalamak, derin çizgiler, ince çizgiler, akne ve sivilce izleri gibi kusurların ortaya çıkmasını ertelemek ve onarmak amacıyla geliştirilmiş pek çok raf ürünü pazarda yer almaktadır. Hızlı etki göstererek çabuk toparlanma sağlayan, cildi sıkılaştıran otolog fibroblast içeren hücreli ürünlere giderek talep artmaktadır.

Bu çalışmada, deri rejenerasyonunda kullanılan iki önemli büyüme faktörünün EGF ve IGF-1 (Epidermal Büyüme Faktörü ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1)' in kollajen tip-1 üretimi üzerindeki etkileri insan dermal fibroblast hücreleri

kullanılarak araştırılmıştır. EGF ve IGF-1'in; öncelikle sitotoksik olmayan konsantrasyon seviyelerine, hücre canlılıklarına, proliferasyon seviyelerine ve ardından kollajen tip-1 protein üretimi üzerindeki etkilerine bakılarak karar verilmiştir. Bu amaçla normal insan fibroblast hücreleri, her bir büyüme faktörünün farklı konsantrasyonları ile muamele edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, EGF'nin 20ng/ml konsantrasyonunun insan dermal fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği ve bunun sonucu olarak, 48 saat sonunda kontrol grubuna göre, hücre canlılığı üzerinde % $3,61 \pm 0,30$ azalmaya sebep olmuştur. Ayrıca elde edilen 2 ayrı analiz neticesinde proliferasyon hızını % $45,82 \pm 0,40$ oranında en çok artıran ve bununla beraber en az nekrotik hücre oluşumunu sağlayan büyüme faktörünün; EGF'nin 5ng/ml konsantrasyonu olduğu tespit edilmiştir.

DAB kromojen boyama metodu ile yapılan immünohistokimya analizinde; büyüme faktörü uygulanan hücrelerde, pozitif kontrol grubuna kıyasla kollajen tip-1 sentezinin daha fazla olduğu gözlemlendi. Büyüme faktörü uygulanmış hücreler arasında; en fazla proliferasyon artışını ve kollajen tip-1 sentezini EGF'nin 5ng/ml konsantrasyonunun gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Fibroblast, Epidermal Büyüme Faktörü, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1, Proliferasyon, Kollajen Tip-1.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EGF (EPIDERMAL GROWTH FACTOR) AND IGF-1
(INSULIN LIKE GROWTH FACTOR-1) MOLECULES WHICH INDUCE
COLLAGEN BIYOSYNTHESIS AND TESTING ON FIBROBLAST CELLS
WITH DETERMINING OF OPTIMUM CONCENTRATIONS

ERDOĞAN, Erdal

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Bioengineering, Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa TÜRK

March 2017, 65 pages

Collagen is a fibrous protein found in skin, bone, cartilage, tendon, and other connective tissues and the main structural component of the lower layer of the skin . Collagen is responsible for the skin's strength and produced by cells called fibroblasts, which are found scattered throughout the dermis. As aging occurs, cellular proteins hook together or change shape. These changes keep the proteins from doing their jobs properly resulting in a loss of collagen, less firmness to body tissues and leads to wrinkles.

Cosmetic dermatology is one of today's most popular areas of research. There are many products in the market developed to protect the natural appearance, youth color, enhance the inherent beauty and in order to delay and repair the emergence of defects such as wrinkles, fine lines, discoloration. The use of products that has recombinant protein, continues to expand rapidly across the world. In addition to the benefits, manufactured products from these recombinant proteins have adverse effects as a result of incorrect uses.

In this study, type I collagen biosynthesis-inducing effect of 2 important growth factors (Epidermal Growth Factor and Insulin-like Growth Factor-1) were researched

using human dermal fibroblasts. The effects of EGF and IGF-1 were investigated on non-cytotoxic concentration levels, viability of cells, proliferation level and then producing of Type 1 collagen protein. For this purpose, human fibroblast cells were treated with different concentrations of each growth factors.

It is indicated that , 20ng/ml concentration of EGF has a cytotoxic effect on human dermal fibroblast cells which is made to decrease the cell viability about $\% 3,61 \pm 0,30$ in comparison to the control group in the end of 48 hours. However, two different results proved that the most proliferative effect about $\%45,82 \pm 0,40$ and the minimum necrotic cells occurred by 5ng/ml concentration of EGF.

In immunocytochemistry analyses which is performed by DAB chromogen staining method, all growth factors induce the collagen type-1 synthesis in comparison to the control group. The most increment of proliferation and collagen type-1 synthesis are performed by 5ng/ml concentration of EGF among the growth factors.

Key words: Fibroblast, Epidermal Growth Factor, Insuline Like Growth Factor-1, Proliferation, Collagen Type-1.

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımı yönlendiren, araőtırmalarımın her aőamasında bilgi, öneri ve yardımlarımı esirgemeyerek yetiőme ve geliőmeme katkıda bulunan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa TÜRK'e,

Beni yüksek lisans yapmaya teővik eden ve her zaman maddi ve manevi yardımlarını yanımda hissettiğim annem; Naciye Erdoğan'a, kardeőim; Yeőim Erdoğan'a, ailem; Ersin Erdoğan'a, Naci Erdoğan'a, Serkan Erdoğan'a, Buket Erdoğan'a, Sekine Erdoğan'a, Selma Erdoğan'a, Emre Erdoğan'a, őule Özdemir'e, Can Erdoğan'a ve çalışma arkadaşlarım Aslıgül Kurt'a, Aslı Taőpolatođlu'na, Ayőe Çırak'a, Rümeyza Akçapınar'a sonsuz teşekkür ederim.

Her zaman her koőulda yanımda olan, bana bu süreçte cesaret veren hayat arkadaşım Ayőe İpek Karol'a ve değerli ailesi; Mübeccel Karol, Nazlı Karol ve Ali Karol'a ayrıca teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER	viii
ŞEKİLLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Ekstraselüler Matriks	3
1.2. Fibroblast	3
1.3. Kollajen	3
1.4. Deri Rejenerasyonunda Rol Oynayan Büyüme Faktörleri	4
1.4.1. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	6
1.4.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü -1 (IGF-1)	6
1.4.3. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	7
1.4.4. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	8
1.5. Apoptoz Mekanizması	10
1.6. Nekroz Mekanizması	11
2. MATERYAL VE YÖNTEM	13
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	13
2.1.1. Cihazlar	13
2.1.2. Kimyasallar	13
2.1.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Solüsyonlar	14
2.1.3.1. Besiyeri Hazırlanması	14
2.1.3.2. İkili Boyama (Double Staining) Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması	14
2.2. Yöntem	15
2.2.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi	15

2.2.2 IGF-1 ve EGF'nin Hücreler Üzerine Uygulanması	15
2.2.3. WST-1 Analizi ile Hücre Proliferasyonunun ve Canlılığının İncelenmesi .	16
2.2.4. İkili Boyama Analizi ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi	16
2.2.5. İmmünotokimya Analizi ile Kollajen Tip-1 Proteinin İncelenmesi.....	16
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	18
3.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi.....	18
3.2. Büyüme Faktörleri ile Hücrelerin Muamele Edilmesi.....	19
3.3. WST-1 Analizi ile Toksisitenin Belirlenmesi.....	28
3.4. İkili Boyama (Double Staining) Metodu ile Apoptoz ve Nekroz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	29
3.5. DAB Kromojen Boyama ile Kollajen Tip-1 Analizi.....	44
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	56
KAYNAKLAR	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

	<u>Sayfa</u>
1.1. Deri Rejenerasyonunda Rol Oynayan Büyüme Faktörleri	5
3.1. Büyüme Faktörleri Uygulanmış İnsan Dermal Fibroblast Hücrelerinin WST-1 Analizi Sonucundaki Canlılık Yüzdeleri.....	28



ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

Sayfa

Şekil 1.1. İnsan Fibroblast Hücre Kültürünün Görüntüsü	1
Şekil 1.2. Hava Akış Kabini Altında Hücre Kültürü Çalışan Araştırmacı Görüntüsü. 2	
Şekil 3.1. İnsan Dermal Fibroblast Hücrelerinin Invert Mikroskoptaki 24. Saat Sonu Kültür Görüntüsü (Negatif Kontrol Kuyucukları)	18
Şekil 3.2. İnsan Dermal Fibroblast Hücrelerinin Invert Mikroskoptaki 24. Saat Sonu Kültür Görüntüsü (Negatif Kontrol Kuyucukları)	19
Şekil 3.3. IGF-1 20ng/ml, 24.Saat Sonu (Büyüme Faktörü Eklendikten Sonra).....	20
Şekil 3.4. EGF 20ng/ml, 24.Saat Sonu (Büyüme Faktörü Eklendikten Sonra)	21
Şekil 3.5. IGF-1 10ng/ml, 24.Saat Sonu (Büyüme Faktörü Eklendikten Sonra).....	22
Şekil 3.6. EGF 10ng/ml, 24.Saat Sonu (Büyüme Faktörü Eklendikten Sonra)	23
Şekil 3.8. EGF 5ng/ml, 24.Saat Sonu (Büyüme Faktörü Eklendikten Sonra)	25
Şekil 3.9. IGF-1 5ng/ml, 48.Saat Sonu (Büyüme Faktörü Eklendikten Sonra).....	26
Şekil 3.10. EGF 5ng/ml, 48.Saat Sonu (Büyüme Faktörü Eklendikten Sonra)	27
Şekil 3.11. Büyüme Faktörü Uygulanan Hücrelerin Kontrol (Standart) Grubuna Göre Proliferasyon Artış Grafiği.....	29
Şekil 3.12. Negatif Kontrol Apoptoz Görüntüsü (Büyüme Faktörü Eklenmemiş)....	30
Şekil 3.13. Negatif Kontrol Nekroz Görüntüsü (Büyüme Faktörü Eklenmemiş).....	31
Şekil 3.14. 20ng/ml IGF-1 Apoptoz Görüntüsü.....	32
Şekil 3.15. 20ng/ml IGF-1 Nekroz Görüntüsü.....	33
Şekil 3.16. 10ng/ml IGF-1 Apoptoz Görüntüsü.....	34
Şekil 3.17. 10ng/ml IGF-1 Nekroz Görüntüsü.....	35
Şekil 3.18. 5ng/ml IGF-1 Apoptoz Görüntüsü.....	36
Şekil 3.19. 5ng/ml IGF-1 Nekroz Görüntüsü.....	37
Şekil 3.20. 20ng/ml EGF Apoptoz Görüntüsü.....	38
Şekil 3.21. 20ng/ml EGF Nekroz Görüntüsü.....	39
Şekil 3.22. 10ng/ml EGF Apoptoz Görüntüsü.....	40
Şekil 3.23. 10ng/ml EGF Nekroz Görüntüsü.....	41
Şekil 3.24. 5ng/ml EGF Apoptoz Görüntüsü.....	42
Şekil 3.25. 5ng/ml EGF Nekroz Görüntüsü.....	43

Şekil 3.27. Negatif Kontrol Kuyucuk Görüntüsü (Büyüme Faktörü Uygulanmış, Antikor Eklenmemiş)	45
Şekil 3.28. Pozitif Kontrol Kuyucuk Görüntüsü (Büyüme Faktörü Uygulanmamış)	46
Şekil 3.29. Pozitif Kontrol Kuyucuk Görüntüsü (Büyüme Faktörü Uygulanmamış)	47
Şekil 3.30. 20ng/ml IGF-1 Uygulanmış Kuyucuk Görüntüsü	48
Şekil 3.31. 10ng/ml IGF-1 Uygulanmış Kuyucuk Görüntüsü	49
Şekil 3.32. 5ng/ml IGF-1 Uygulanmış Kuyucuk Görüntüsü	50
Şekil 3.33. 5ng/ml IGF-1 Uygulanmış Kuyucuk Görüntüsü	51
Şekil 3.34. 20ng/ml EGF Uygulanmış Kuyucuk Görüntüsü	52
Şekil 3.35. 10ng/ml EGF Uygulanmış Kuyucuk Görüntüsü	53
Şekil 3.36. 5ng/ml EGF Uygulanmış Kuyucuk Görüntüsü	54
Şekil 3.37. 5ng/ml EGF Uygulanmış Kuyucuk Görüntüsü	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

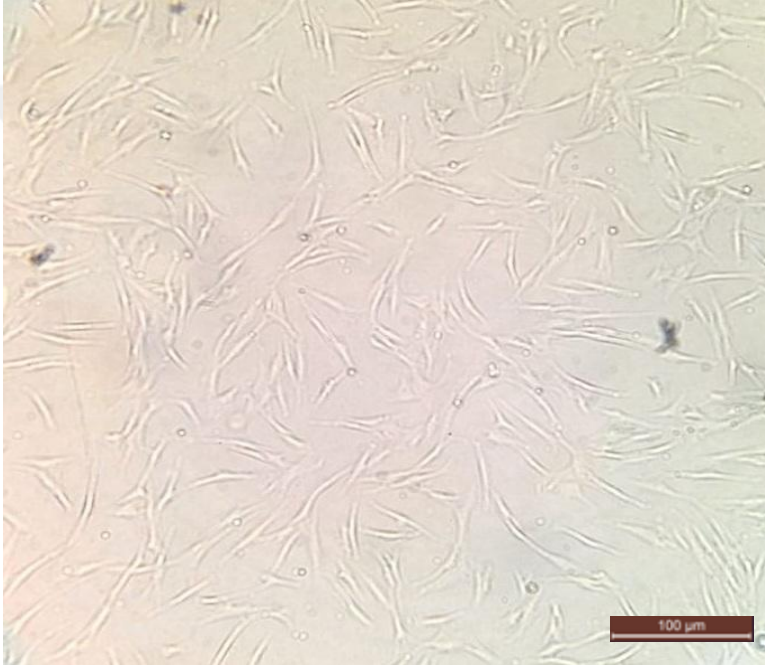
ATCC	American Type Culture Collection
BCIP	5-bromo 4-chloro 3-indoyl phosphate
BSA	Bovine serum albumin
BCA	Bicinchoninic acid
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
FBS	Fetal bovine serum
IGF-1	Insulin Like Growth Factor-1
IL	Interleukin
kDa	kilo Dalton
MAP	Mitogenactivated protein
mRNA	Messenger RNA
MMPs	Matrix metalloproteinases
PBS	Phosphate buffered saline
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin

RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
rpm	Revolutions per minute
RNA	Ribonucleic acid
FGF	Fibroblast Growth Factor
PDGF	Platelet Growth Factor
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor



1. GİRİŞ

Ekstraselüler matriksin düzenli bir şekilde sıralanışı epitel dokuya kuvvet ve fonksiyonellik kazandırır. Hücrelerarası bu madde, fibroblast hücrelerince üretilirler ve öncelikle kollajen ve elastin liflerinden meydana gelirler ki bunlar da epitel dokuya dinamiklik ve elastikiyet katar [1, 2].



Şekil 1.1. İnsan fibroblast hücre kültürünün görüntüsü

(Bar=100µm-20X büyütmede Leica Inverted Mikroskop ile görüntülenmiştir.)

Epitel dokunun zamanla yaşlanıyor olması, orta tabaka olarak bilinen demisteki ekstraselüler matriks miktarının düşmesi ve düzenli şekildeki dağılımının bozulması ile ilgilidir. İnsan epitel dokusunda en çok bulunan kollajen tip 1'dir [3].



Şekil 1.2. Hava akış kabini altında hücre kültürü çalışan araştırmacı görüntüsü

(Doku Biyoteknoloji Ltd.Şti., Class 100 Temiz Oda Sistemi)

Yaşlılık süreci, cilt dokusundaki pürüzsüzlüğün bozulması, lekelenme, çukurluklar, renk tonundaki koyulaşmalar, ince çizgiler ve incelen deri katmanı ile kendini gösterir. Bu değişimlerden korunmak için, başta yaşam konforunun (beslenme, spor vb. alışkanlıklar) artırılması ve buna müteakip topikal uygulamalar ile ve özellikle son yıllarda artan bir talep olarak karşımıza çıkan noninvaziv operasyonlar önem taşımaktadır. Topikal uygulamalarda, büyüme faktörü içeren kremler ve serum yapıları yer alırken, noninvaziv uygulamalarda ise botoks (botulinum toksin), hyalüronik asit (dolgu preparatları) ile otolog olarak fibroblast ve trombositçe zengin plazma enjeksiyonları tercih edilmektedir.

1.1. Ekstraselüler Matriks

Ekstraselüler matriks (ECM); dokuların bir birleriyle olan haberleşmesinde ve işlevlerinin düzenlenmesinde önemli bir görev üstlenir. ECM, peptid ve karbonhidrat içeriğine sahip olmakla birlikte kompleks bir molekül yapısındadır [4, 5]. ECM’de yer alan bazı özelleşmiş moleküller, köken olarak benzer hücrelerle sinyal alışverişi yaparak birtakım biyolojik geri bildirimlere sebep olurlar [6]. ECM, fibroblast hücreleri tarafından üretilirler [7, 8]. ECM’nin yapısı, içerdiği maddelerin miktarı ve işlevselliği yer aldığı dokuya göre farklılık gösterir.

1.2. Fibroblast

Fibroblastlar, bağ dokusunun ana elemanı olup, epitel dokunun orta katmanında yer alan ve pek çok görev üstlenen hücrelerdir [9-11]. Ekstraselüler matriksin üretilmesinde görev alırlar. Epitelin yapısını ve dinamikliği üstünde kritik önemi olan fibroblast hücrelerinin rejeneratif ve reperatif etkileri vardır. Epitelde en fazla yer alan protein olan kollajen, spesifik yapısı ile derinin sağlamlığında ve elastikiyetinde önemli rol oynar [12]. Fibroblast hücrelerince üretilen kollajen ve elastin proteinlerinin ekstraselüler matriks içerisinde azalması, kollajen sindiren birtakım enzimlerin artış göstermesi ve cilt yapısındaki bozulmaların belirginleşmesi, yaşlılık belirtilerinin bir göstergesi olarak ortaya çıkmaktadır [13, 14, 15].

1.3. Kollajen

Memelilerdeki proteinlerin yaklaşık %7’sini, tüm vücut proteinlerinin ise yaklaşık %31’ini kollajen proteini temsil etmektedir [16]. Bu proteinin en spesifik özelliği; 3 polipeptit alt ünitesinin sarmal yapıyı oluşturacak nitelikte bir araya gelmesidir [17]. Alt ünite olan alfa zincirleri dönüş yaparak iplikçikleri, iplikçikler de yine bir bütün oluşturarak kollajen demetlerini oluştururlar. Kollajen lifleri ve demetleri, epitel dokuda ve bağ dokuda daha nizami, kıkırdak dokuda esnek yapıda, kemik ve diş dokularında kristal yapısında olup ekstraselüler matriks içerisinde konumlanırlar.

Kollajenin en çarpıcı taraflarından biri aminoasit dizilerinin birbiri ardı sıralanan üçlü peptid yapısında olmasıdır. Glisin aminoasidi ağırlıklı olmak üzere bu üçlü dizide sıklıkla yer alır [18-20]. Fibroblast hücreleri içerisinde yer alan ve protein sentezlenmesinden sorumlu olan ribozom içerisinde bu peptitler sentezlenirler. Kollajenin öncül yapısı prokollajendir. Prokollajenler üretildikten sonra hücre dışına gönderilir. Burada tropokollajenlere ve ardından kollajen proteinine dönüşmektedir [21, 22]. Kollajen proteinini meydana getiren alfa zincirlerinin değişken yapılarına göre yaklaşık 18 farklı kollajen tipi olduğu ifade edilmiştir. Epitel dokuda en çok rastlanan kollajen tip-1 protein yapısıdır [23].

1.4. Deri Rejenerasyonunda Rol Oynayan Büyüme Faktörleri

Hücrelerce sentezlenen, bununla beraber kan serumunda var olan, peptid ve daha kompleks protein özelliğindeki pek çok büyüme faktörü üzerine yapılan araştırmalar son dekatta oldukça artmıştır. Bu faktörleri temel anlamda 3 ana kategoriye ayırabiliriz. Birinci kategoride, sayıları oldukça fazla olan (150 üzeri) tek çekirdekli hücreler olarak bilinen ve bağışıklık hücresi grubunda yer alan B, T lenfositleri ile monositlerdir. Bu moleküllerden salgılanan sitokinler bağışıklık sisteminin ve yangı gibi olayların düzenlenmesinde görev alırlar [24-26]. İkinci kategoride, hücrelerin olgunlaşmasını ve proliferasyonunu tetikleyen moleküller yer alır. Bunlar sayıları 15'ten fazla olduğu bilinen fibroblast büyüme faktörü ve epidermal büyüme faktörü gibi moleküllerdir. Son kategoriyi ise, eritrositleri ve akyuvarları uyararak onların çoğalmasını regüle eden büyüme faktörleri teşkil etmektedir [27].

Çizelge 1.1. Deri Rejenerasyonunda Rol Oynayan Büyüme Faktörleri [28]

Büyüme Faktörü	Hedef Hücre	Hücrenin Kaynağı
Epidermal Büyüme Faktörü, EGF	Endotelyum Fibroblast Epitelyum	Monositler Makrofajlar
Fibroblast Büyüme Faktörü, FGF	Endotelyum Fibroblast Keratinosit	Monositler Makrofajlar Endotelyum
Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü, PDGF	Fibroblastlar Düz Kas Hücreleri	Trombositler Endotelyum Monositler Makrofajlar Düz Kas Hücreleri
Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta, TGF- β	Fibroblastlar Endotelyum Epitelyum Monosit Lenfosit	Trombositler Kemik Makrofajlar Mast Hücreleri
İnterlökin-1, IL-1	Monosit Keratinosit Fibroblastlar Nötrofiller	Lenfosit Keratinosit Makrofajlar
Tümör Nekrozis Faktörü-Alfa, TNF- α	Nötrofiller Fibroblastlar	Monositler
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü, IGF	Fibroblastlar Keratinositler	Fibroblastlar

Epidermal büyüme faktörü ve insülin benzeri büyüme faktörü 1; epitel dokunun yenilenmesinde ve onarımında en fazla tercih edilen ve genellikle kozmetik ile estetik sektöründe sıklıkla kullanılan iki önemli majör moleküllerdir [29].

1.4.1. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

Epidermal Büyüme Faktörü ilk kez 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından erkek fare submandibuler tükürük bezinden izole edilmiştir. Cohen, erkek fare submandibuler tükürük bezinde sinir büyüme faktörü (NBF) izole etmeye çalışırken, bu bezlerden elde ettiği ekstrenin yeni doğan farelere enjekte edildiğinde erken göz kapağı açılışına ve erken diş sürmesine neden olduğunu gözleyerek etken maddeyi izole etmiş ve epidermis gelişimini hızlandırıcı etkisi nedeni ile bu maddeye Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü-EGF) adını vermiştir [30-32]. EGF bir çok memeli türünün değişik doku ve vücut sıvılarında bulunan 53 aminoasitten oluşmuş mitojenik bir polipeptittir. Subkutan yolla enjekte edildiğinde 48 aminoasitli şekle dönüşmekte ve etken hale gelmektedir [33]. Mitojenik bir polipeptid olan EGF, yara iyileşmesine enflamasyon fazının bitiminde etki etmeye başlamakta ve fibroblastik oluşumu indüklediği ve bunun yanı sıra granülasyon dokusu oluşumunu ve epitelizasyonu uyardığı bilinmektedir [34, 35]. Son zamanlarda gerek genel tıp alanında gerekse ağız cerrahisinde yapılan çalışmalarda EGF'nin yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Genel tıp alanında EGF özellikle yanık tedavilerinde ve korneal yaralanmalarda kullanılmaktadır. Araştırmacılar deride oluşan yarıklarda ve korneal yaralanmalarda EGF'nin kullanıldığı durumlarda yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Topikal formda ilaç uygulamalarının tıp alanında kullanılmasına başlandıktan sonra oluşan yaralanmalarda topikal olarak solüsyonların ve biyoadesif taşıyıcı sistemlerin uygulanması yara iyileşmesinde olumlu bir etki sağlamış, oluşan deri yaralanmalarında, korneal yaralanmalarda, yanıklarda ve gastrointestinal sistem yaralanmalarda olumlu etkisi gösterilmiştir [36-38].

1.4.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü -1 (IGF-1)

İnsülin Benzeri Büyüme faktörleri (IGF) genellikle lokal olarak etki gösteren ve spesifik hücrelerde büyümeyi uyararak, primer aminoasit dizilimleri birbirlerine ve insan proinsüline benzeyen küçük peptidlerdir [39]. Yapısal ve fonksiyonel olarak

büyüme faktörleri ailesi içerisinde yer alır. Kısmen büyüme hormonuna (BH) bağımlı ve BH'nin anabolik ve mitojenik etkilerinden bir çoğuna aracılık eden bir peptid grubudur. IGF-1, büyüme hormonunun büyüme hızlandırmada major mediyatörü olarak görev alan ve 7647 dalton ağırlığında küçük bir peptittir [40-42]. Postnatal yaşam boyunca dolaşımında anlamlı seviyelerde bulunur ve insüline benzer dozlarda glukoregülatuar ve mitojenik özellik gösterir. IGF-2 de yapısal olarak IGF-1'e benzer fakat başka bir gen tarafından kodlanmıştır. IGF-1, BH'nin kontrolü altında karaciğerde sentez edilir ve kana sekrete edilir [43]. IGF-1 kemik gibi periferel dokularda da otokrin/parakrin sentezlenir. IGF-1 ve IGF-2'nin birbirinden ayrı reseptörleri vardır. İnsülin ve IGF-1 reseptörleri yaklaşık olarak %38 oranında benzerlik gösterir [44]. IGF bağlayıcı proteinler yüksek afiniteli protein ailesinin bir üyesidir. IGF-1 ve IGF-2 için afinitesi, IGF-1 reseptörlerinden daha fazladır [45].

1.4.3. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) yaklaşık 30.000 dalton ağırlığında bir glikoprotein molekülüdür [46]. A ve B olmak üzere iki polipeptid zincirinin disülfid bağları ile birleşmesinden meydana gelmiştir [46, 47]. PDGF'nin mitojenik etkisine beta reseptörleri aracılık etmektedir. PDGF reseptörleri hücre zarında yer alırlar ve glikoprotein yapısındadırlar. Alfa ve beta reseptörleri hücre içinde birden fazla haberci sistem ile bağlantılıdırlar. PDGF reseptörlerinin uyarılması ile hücre içinde bir fosforilasyon zincir reaksiyonu başlamaktadır. Beta reseptöründe hücre içinde ikinci haberci sistem, tirozin kinaz enziminin aktivasyonuna neden olmaktadır. Tirozin kinaz enzim aktivasyonunun, mitojenik cevabın oluşumuna aracılık eden faktörlerden biri olabileceği üzerinde durulmaktadır [48, 49]. PDGF'nin dolaşım sistemi içinde yarılanma ömrü iki dakika gibi çok kısa bir süredir. Bu onun lokal olarak üretilip lokal olarak etkili olduğuna işaret etmektedir. PDGF, plazmada alfa-2 makroglobulin yapısında bir proteine bağlanarak aktivitesini kaybetmektedir. PDGF'nin etkili olduğu hücrelerin belli başlıları; arteriyel düz kas hücreleri, fibroblastlar, glia hücreleri, arteriyel, kapiller endotel hücreleri ve bazı lökositlerdir. PDGF'nin bir çok farklı biyolojik etkisi vardır [50]. PDGF , normal hücreleri ve tümör hücrelerini parakrin veya otokrin yolla uyararak çoğalmalarını sağlar. Bağ

doku hücrelerinin çoğalarak matriks proteinlerini üretmelerine sebep olur. Fibroblastlarda aktin reorganizasyonunu artırır. Damarlar üzerinde kuvvetli bir vazokonstriktördür. Polimorf nükleer lökositler ve monosit/makrofajları uyarır. Kemotaksiye neden olurlar [51]. Yapılan çalışmalarda, PDGF'nin yara iyileşmesininin neredeyse tüm süreçlerinde rol aldığı ve önemli bir stimule edici faktör olduğu ifade edilmiştir [52].

1.4.4. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Fibroblast büyüme faktörü (FGF), polipeptit büyüme faktörlerinin büyük bir ailesini oluşturmaktadır. FGF değişik organizmalarda (hematodlardan insanlara kadar geniş bir yelpazede) bulunmaktadır [52]. Fibroblast büyüme faktör ailesinin, biyolojik aktiviteleri açısından benzerlik gösteren, 17-34 kDa aralığında molekül ağırlığına sahip olan üyeleri mevcuttur. Omurgalılarda gen yapısı ve amino asit sırası (özellikle reseptöre bağlanma alanları) bakımından FGF yüksek oranda korunmuşlardır. FGF çeşitli mezoderm ve nöroektodermden türeyen hücreler (fibroblastlar, osteoblastlar, düz kas hücreleri, endotel hücreler, kondrositler, melanositler gibi) için kuvvetli mitojenik aktiviteleri, nörotropik özellikleri ve heparin bağlama özellikleri ile karakterize edilmişlerdir [53]. Çok bilinen iki FGF izoelektrik noktalarının (pI) farklı olması nedeni ile birbirinden ayırt edilmiştir. Asidik FGF (aFGF, FGF-1; 15 kDa)'nin pI 4.5-6, bazik FGF (bFGF, FGF-2)'nin ise pI 9.6-9.8'dir. Bu iki büyüme faktörü % 55 sıra benzerliğine sahiptir. Genom taraması ile birçok FGF geni bulunmuştur. İnsanda 22 tane FGF geni tanımlanmıştır. bFGF'yi kodlayan, FGF-2 geni insanlarda; 4. kromozom, q26-q27 bandı üzerinde lokalize olmuştur. bFGF salımı hala biyoloji alanında cevap bekleyen bir soru olarak karşımıza çıkmaktadır [54]. bFGF klasik bir işaret sırasına sahip değildir ve bu nedenle işaret iletim yolu ile salınmaz. Hücrelerden bFGF'nin salımı ile ilgili bir görüş ise bFGF'nin hücre ölümü, yaralanma ve kimyasal yaralanma gibi pasif mekanizmalar sonucu salındığı görüşüdür. Salınan bFGF ekstraselüler alanda heparan sülfat proteoglikanlara (HSPG) bağlı olarak depolanmaktadır. bFGF veya aFGF'ye cevap veren tüm hücre tipleri spesifik FGF hücre yüzey reseptörleri taşımaktadırlar. bFGF yüksek (FGFRs, tirozin kinaz (TK) aktiviteli FGF

reseptörleri) ve düşük afiniteli reseptörlere (HSPG) bağlanmaktadır. FGF parakrin ve otokrin faktörlerin çok önemli gruplarından birisidir. FGF'nin reseptöre bağlanması ile reseptörler dimerize olmakta ve bunun sonucunda tirozin kinaz aktivitesi gerçekleşmektedir. Bu kinazlar birbirlerini fosforilleyerek sinyal iletimini başlatmaktadırlar. Yapılan çalışmalarda bFGF'nin hücre içine alınması ve ilerlemesinde HSPG'lerin pekiştirici etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir. FGF'nin reseptörüne bağlanması HSPG'lerin yardımı ile başarılmaktadır. bFGF'nin HSPG ile etkileşiminin fizyolojik önemi net değildir; Ancak in vivo olarak FGF molekülleri HSPG'ye bağlanarak korunmakta ve ekstraselüler matrikste FGF-HSPG kompleksi halinde saklanmaktadır [55]. bFGF yapısal ve fonksiyonel olarak önemli stabilite sorunlarına sahiptir. bFGF metiyonin, aspartat ve asparajin dizilerine sahiptir ve bu diziler potansiyel degradasyon alanlarıdır. bFGF cam ve plastik yüzeylere büyük bir afinite ile yapışmaktadır. Bu durum saklama sırasında bFGF'nin fiziksel kaybına neden olmakta ve biyolojik aktivite kaybının nedenlerinden birini oluşturmaktadır. bFGF'nin plastik yüzeylere yapışmasını engellemek için değişik plastik tipleri ile çalışılmıştır. Polipropilen ve polistiren kaplar karşılaştırıldığında, bFGF'nin en az polietilen kaplara yapıştığı gözlenmiştir. bFGF'nin polietilen kaplara spesifik olmayan bağlanmasını engellemek amacı ile bu kaplar sığır serum albumini (BSA) ile kaplanmıştır. BSA kaplı polietilen kaplar içinde bFGF'nin 4°C'de 4 hafta boyunca ilk aktivitesinin % 37.5'ini koruduğu tespit edilmiştir [56]. bFGF; çok sayıda hücre, doku ve organ sistemlerinin fonksiyon ve gelişiminde etkili olan bir büyüme faktörüdür. bFGF öncelikle fibroblastik hücreler için mitojenik bir faktör olarak tanımlanmıştır. bFGF dokuların rejenerasyonunda etkilidir. Endotel hücre çoğalması, göç etmesi ve yeni kan damarı oluşumunun uyarılması bFGF'nin en iyi karakterize edilen fonksiyonlarıdır. bFGF'nin son zamanlarda nörodejeneratif hastalıkların tedavisi (Alzheimer, Parkinson, beyin iskemisi vb.) üzerine etkisi yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. bFGF; nöronlar, hipokampus, striatum, spinal kord, serebellum ve parasempatik gangliyonlar üzerinde tropik etkiye sahiptir. Mitoz sonrası farklılaşmış nöronların yaşamını artırır. Nöronları serbest radikallere, nitrik okside, hipoglisemiye, eksitatör aminoasitlere (glutamik asit) ve oksijensizliğe karşı korur. bFGF beyni geçici ve devamlı iskemiye karşı korur. Deneysel beyin iskemisinde, KBE'de bir dağılma varlığında, orta beyin arter oklüzyonu (arterin tıkanması) modelinde (middle

cerebral artery occlusion (MCAO) model) sıçanlara i.v. olarak yüksek dozda (135 µg/kg) uygulandığında bFGF nöroprotektif etki göstermiştir. bFGF'nin ve reseptörlerinin seviyesi nörodejeneratif hastalıklarda, Parkinson hastalığında, substantia nigra nöronlarında bFGF kaybı söz konusudur. In vivo bFGF uygulanmasının dopaminerjik nöronları kurtardığı ve bu nedenle Parkinson hastalığının tedavisinde ümit verici olduğu bildirilmiştir. Alzheimer hastalığındaki amiloid plaklarda bFGF azalmıştır. bFGF plakların ana yapıtaşı olan amiloid β proteininin nörodejeneratif etkilerini azalttığı gösterilmiştir. Büyüme faktörlerinin biyolojik yarı ömürleri çok kısadır (bFGF ve PDGF, < 2-3 dak. vb.). Bu faktörler, enjekte edildiklerinde hızlı bir şekilde kandan uzaklaştırılır ve doku bariyerlerinden özellikle kapiler duvarlara yavaş bir şekilde penetre olurlar. Bu nedenlerden dolayı, sistemik uygulama sırasında farmakolojik etkinin oluşabilmesi için yüksek dozda ilaç kullanılmakta ve sonuçta istenmeyen yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Büyüme faktörlerinin in vivo etkinliğini artırmanın ve istenmeyen etkilerinin ortadan kaldırılmasının bir yolu biyoaktif molekülün bir polimerik taşıyıcı sistem içine hapsedilmesi ve belli bir zaman periyodu içinde uzun süreli salınmasının sağlanmasıdır. Kontrollü salım sistemleri, mikrogram veya daha küçük miktarlarda etkinlik gösteren büyüme faktörlerinin taşınmasında uygun sistemlerdir. Büyüme faktörleri bu sistemler içine hapsedilerek yapı ve aktivitelerini korumaları sağlanmakta ve uzun süreli olarak aktif formları halinde salınmaları gerçekleştirilmektedir [57].

1.5. Apoptoz Mekanizması

Vücudumuzdaki her hücre belli bir süre yaşar ve zamanı gelince ölür. Hücre ölümüyle hücre çoğalması arasında kontrollü bir denge vardır. Hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz yunanca ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten ayrılan petal anlamına gelir. Apo: ayrı, Ptoxis: düşme demektir. Apoptoz terimi ilk kez 1972'de Avusturyalı bir patolog olan J.F.K. Kerr tarafından tanımlanmıştır. Apoptoz genel olarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır. Kemik iliğinde kan üretiminin dengede tutulması

için 5×10^{11} kan hücresinin uzaklaştırılması, menstruasyon sırasında endometriyumun fonksiyonel tabakasının dökülmesi, menstruel siklus sonunda korpus luteumun involusyonu apoptoz ile gerçekleşir. İnce barsaklardaki kriptaların tabanlarında yeni oluşan hücreler de, zamanla kriptaların uçlarına göç ederler ve apoptoz sonrasında barsak boşluğuna dökülürler. Deri hücreleri de derinin bazal tabakasında oluştuktan sonra derinin en üst tabakasına doğru göç ederler. Bu göç sırasında derinin her tabakasında çeşitli farklılaşma özellikleri gösterip en sonunda organizmayı dış etkenlere karşı koruyan tabakayı oluşturmak üzere ölürlür. İmmün sistemin çok önemli hücreleri olan T lenfositler timusda olgunlaşırlar. Bu hücrelerin etkisiz olanları veya organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli taşıyanlar da kan dolaşımına girmeden önce apoptozla ölürlür. Sütten kesilen dişilerin meme bezlerinde ve kastrasyon yapılan erkeklerin prostat bezlerinde de apoptoz gözlenir. Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriyonlar rol oynar. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları; endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alır. Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksidir. Hücre dışı sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS – FAS ligand aracılığı ile apoptoz, TNF aracılığı ile apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (İskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon)'dir. Her 2 sinyal yolunda da kaspazlar görev almaktadır. Hücre içi sinyaller instrinsik apoptoz yolunu devreye sokarken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yol ile apoptozu indükler [58, 59].

1.6. Nekroz Mekanizması

Rastgele gelişen, genler tarafından kontrol edilemeyen düzensiz bir süreçtir. En yaygın nedeni hipoksidir. Arsenik, siyanid, insektisitler gibi toksik maddeler ve ağır metaller nekroza neden olur. Nekroz sırasında mitokondriyal ROS üretimi artar, nonapoptotik proteazlar aktive olur, ATP üretimi azalır ve Ca^{++} kanalları açılır.

Dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılar (ısı, yanma, toksik md.) hücrenin iyon dengesini bozar. DNA tamirinden sorumlu nuklear enzim PARP (Poli ADP-riboz polimeraz) NAD⁺'ı ikiye bölerek NAD kaybına neden olur. Bu durumda gerçekleşen ATP noksanlığı, iyon pompası yetersizliğine yol açar. Böylece hücre sıvı alır ve organeller şişer. Plasma membran bütünlüğü bozulur ve osmotik basınç nedeniyle hücre patlar. Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması yangı (enflamasyon, iltihaplanma) olayına sebep olur. Bu olayın karakteristik özelliği makrofaj ve nütrofillerin nekrotik dokuya göç etmesidir. Göç eden bu hücreler nekrotik dokuyu fagosite eder. Bu nedenle enflamasyon nekrozun önemli bir işaretidir [59, 60].



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

2.1.1. Cihazlar

Elisa petri okuyucu (BİOTEK GEN5 Elisa Reader PowerWave XS2)

Karbondioksitli etüv (Binder CB150)

Laminar flow kabin (ESCO class II BSC Laminar Flow Cabinet, Labor İdam, Türkiye)

Soğutmalı santrifüj (ROTINA 380R Hettich, Almanya)

Inverted mikroskop (Leica DM6000B, İsveç)

Floresan Mikroskopu (Leica, İsveç)

Vorteks (Heidolph)

2.1.2. Kimyasallar

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Biological Industries, İsrail)

Fetal bovine serum (FBS, Biological industries, İsrail)

Penicillin-streptomycin (Antibiyotik, Biological Industries, İsrail)

Trypsin-EDTA Solution C in PBS (Biological Industries, İsrail)

WST-1 (Roche, Almanya)

48 kuyucuklu petri (BD, USA)

15 ml santrifüj tüpü (Nunc, Almanya)

Mikropipet (20µm-100µm-1000µm Scaltec, Almanya)

Disposable pipet (2ml, 5ml, 10ml, Corning)

Etanol (Merck, Almanya)

PBS (fosfat buffer saline) (Sigma, ABD)

Toluidine blue (Bio Optica)

Sodyum klorür (Amresco, İsrail)

Propodium Iodide (Roche, Almanya)

Hoescht 33342 (Amresco, İsrail)

Kollajen Tip 1 Antikoru (Sigma, Almanya)

Horse Radish Peroxidase kit (Amresco, İsrail)

DAB chromogen kit (Amresco, İsrail)

Ribonükleaz A (Sigma, Almanya)

Dimetil metilen mavisi (Sigma, ABD)

EDTA (Amresco, İsrail)

Primer antikorlar(kollajen tip-I) (Roche, Almanya)

Hydrolise probe master kit (Roche, Almanya) ve çeşitli cam malzemeler kullanılmıştır.

2.1.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Solüsyonlar

2.1.3.1. Besiyeri Hazırlanması

%89 Dulbecco's Modified Eagle Medium

%10 Fetal bovine serum

%1 Penicillin-Streptomycin

2.1.3.2. İkili Boyama (Double Staining) Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

100ul Ribonükleaz A, 100ul Propodium İodide, 500ul Hoescht 33342, 10ml PBS içerisinde çözülerek hazırlandı. Ribonükleaz A; sitoplazmik RNA'nın boyanmasını önler. Propodium İodide nekrotik hücreleri boyar. Hoescht 33342 apoptotik hücreleri boyar. Solüsyonlar kullanılana kadar – 20 °C'de saklanır [61].

2.2. Yöntem

Çalışmada kullanılacak büyüme faktörünün, normal insan fibroblast hücre hattı (ATCC: catalog no. PCS-201-012) üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, fibroblastların hücre kültürü ortamında çoğaltılması, örneklerin uygulanması, sitotoksikite analizleri yapılarak hücre canlılığının (%) belirlenmesi, apoptoz-nekroz bakılması, kollajen tip 1 sentezinin immüno blot analizleri ile test edilmesi ve analiz sonuçlarının istatistiksel olarak ifade edilmesi işlemleri sırasıyla uygulandı.

2.2.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi

48 kuyucuğa, her kuyucuğa 5×10^3 adet olacak şekilde insan primer dermal fibroblast hücresi ekildi. Üzerlerine, hücreler zedelenmeden kültür vasatı (%89 DMEM, %10 Serum, %1 Antibiyotik) ilave edildi. Hücreler 37°C, %5 CO₂ içeren nemli inkübatöre yerleştirildi ve 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonunda, hücreler Invert mikroskopta incelendi. Hücrelerin tutunduğu ve çoğalmaya başladığı tespit edildi [62].

2.2.2 IGF-1 ve EGF'nin Hücreler Üzerine Uygulanması

24 saat sonunda 48 kuyucuklu petri içerisindeki kültür vasatı pipetle çekilerek atıldı. İki farklı örneğin bir arada çalışılması için 48 kuyucuklu petri işaretlenerek 2 ayrı alana ayrıldı. Birinci alandaki hücreler üzerine, ilk kuyucuğa normal kültür vasatı (negatif kontrol), diğer kuyucuklara ise kültür vasatı içerisinde çözülmüş IGF-1'in; 20ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml konsantrasyonları 2 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara pipetlendi (Her bir kuyucuğa 200µl eklendi). İkinci alandaki hücreler üzerine, ilk kuyucuğa normal kültür vasatı (negatif kontrol), diğer kuyucuklara ise kültür vasatı içerisinde çözülmüş EGF'nin; 20ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml konsantrasyonları 2 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara pipetlendi (Her bir kuyucuğa 200µl eklendi). Petri 37°C, %5 CO₂ içeren nemli inkübatöre yerleştirildi ve inkübasyona bırakıldı. 48. ve 72. saatlerde hücreler invert mikroskopta incelenerek çoğaldıkları gözlemlendi.

2.2.3. WST-1 Analizi ile Hücre Proliferasyonunun ve Canlılığının İncelenmesi

48 saatlik toplam inkübasyonun ardından kuyucuklardaki hücrelerin vasatları atıldı, yerine 100µl fenol kırmızısı içermeyen kültür vasatı eklendi. Her kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 440nm dalga boyunda mikropetri okuyucuda absorbans ölçümü yapıldı [63].

2.2.4. İkili Boyama Analizi ile Apoptoz ve Nekrozun Belirlenmesi

İkili boyama solüsyonu; 100µl Ribonükleaz A, 100µl Propodium İodide, 500µl Hoescht 33342 10ml PBS içerisinde çözülerek hazırlandı. Ribonükleaz A; sitoplazmik RNA'nın boyanmasını önler. Propodium İodide nekrotik hücreleri boyar. Hoescht 33342 apoptotik hücreleri boyar. İnkübasyonun ardından hücrelerin vasatları atıldı, her kuyucuğa 70µl ikili boyama solüsyonu damlatıldı. 15 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyonun ardından florasan ataçmanlı mikroskopla FITC ve DAPI filtresinde inceleme yapıldı. Tüm görüntüler 20X büyütmede çekildi [64].

2.2.5. İmmünohistokimya Analizi ile Kollajen Tip-1 Proteinin İncelenmesi

Örneklerin uygulandığı kuyucuklardaki hücrelerin vasatları atıldı. Hücreler %3 lük metanollü hidrojen peroksit ile 15 dk. muamele edildi. Daha sonra PBS ile 15 dk. yıkama yapıldı. HRP kitinin içindeki protein bloklama solüsyonu ile 15 dk. muamele edildi. Daha sonra Kollajen Tip I primer antikoru (1:100) damlatıldı ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Primer antikorun ardından 15.dk PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra sekonder antikor ile 30 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 15 dk. PBS ile yıkama yapıldı. Streptavidin ile 20 dk. muamele edildi. Ardından PBS ile 15 dk. yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından DAB kromojen ile yaklaşık 10 dk. muamele edildi, renk değişimi takip edildi. Daha sonra 15.dk PBS ile yıkama yapıldı. Karşıt boyama için hematoksin (1:2) ile 1 dk. muamele edilerek hücrelerin çekirdeğinin boyanması sağlandı. Ardından PBS ile boya kalıntıları

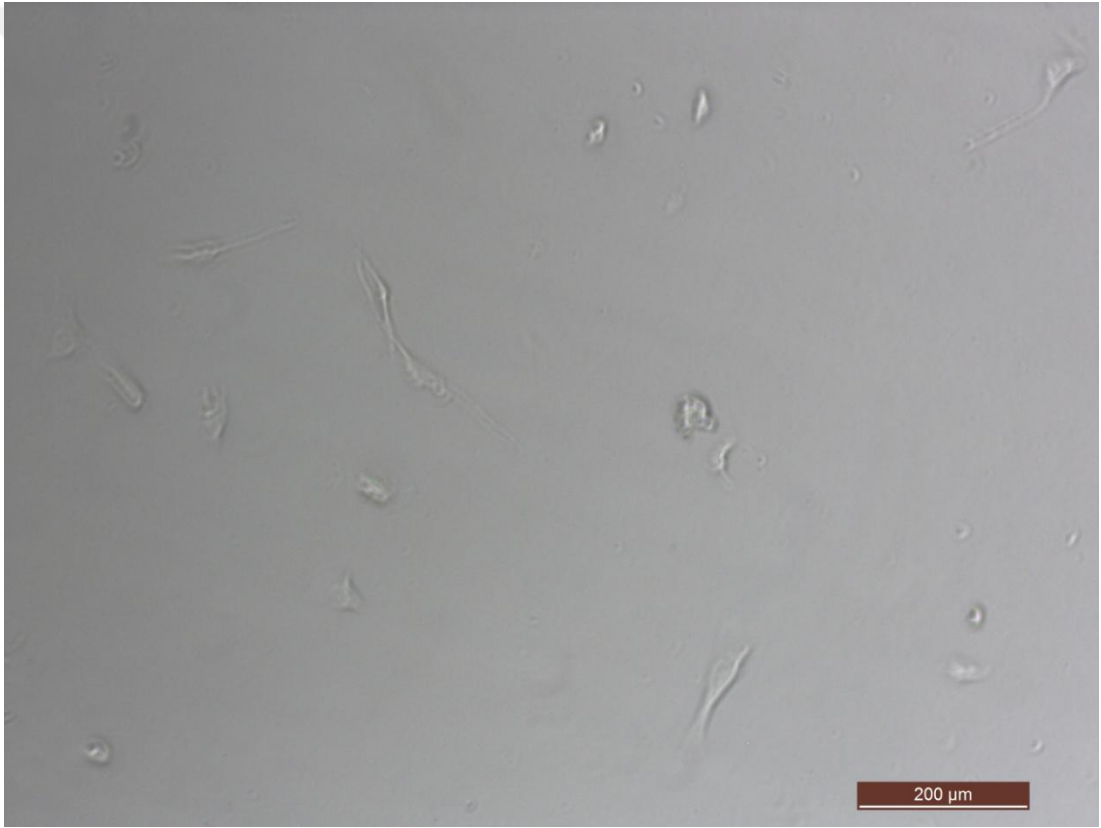
gidene kadar yıkandıktan sonra hücreler PBS içerisinde bırakılarak ışık mikroskopunda incelendi [65].



3. ARAŞTIRMA BULGULARI

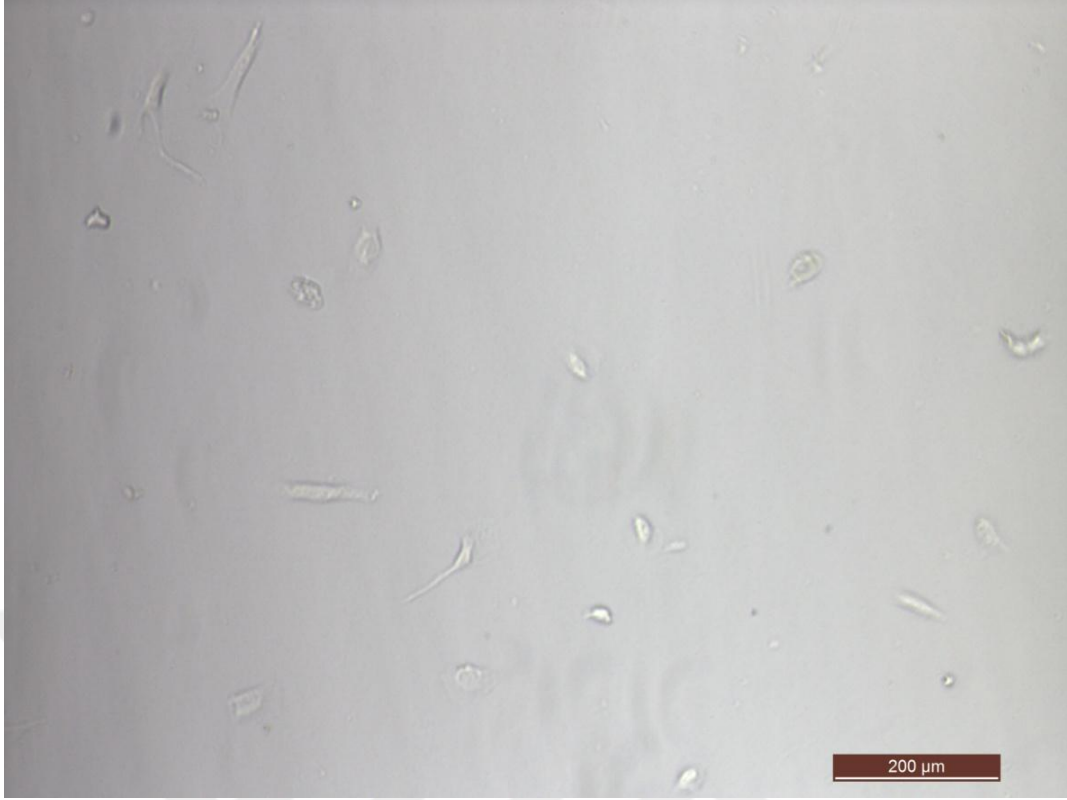
3.1. Hücreslerin Kùltùre Edilmesi

ATCC-PCS-201-012 insan dermal fibroblast hücresleri 48 kuyucuklu kùltür kabının tamamına ekilerek, 37°C %5 CO₂ içeren inkùbatörde kùltive edilmiştir. 24 saatin sonunda hücreslerin tutunduğu ve çoğalmaya baŐlandığı gözlemlenmiştir. Mikroskop hücres görüntüleri Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. İnsan dermal fibroblast hücreslerinin Invert mikroskoptaki 24. saat sonu kùltür görüntüsü (negatif kontrol kuyucukları)

(Bar=200μm-10X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

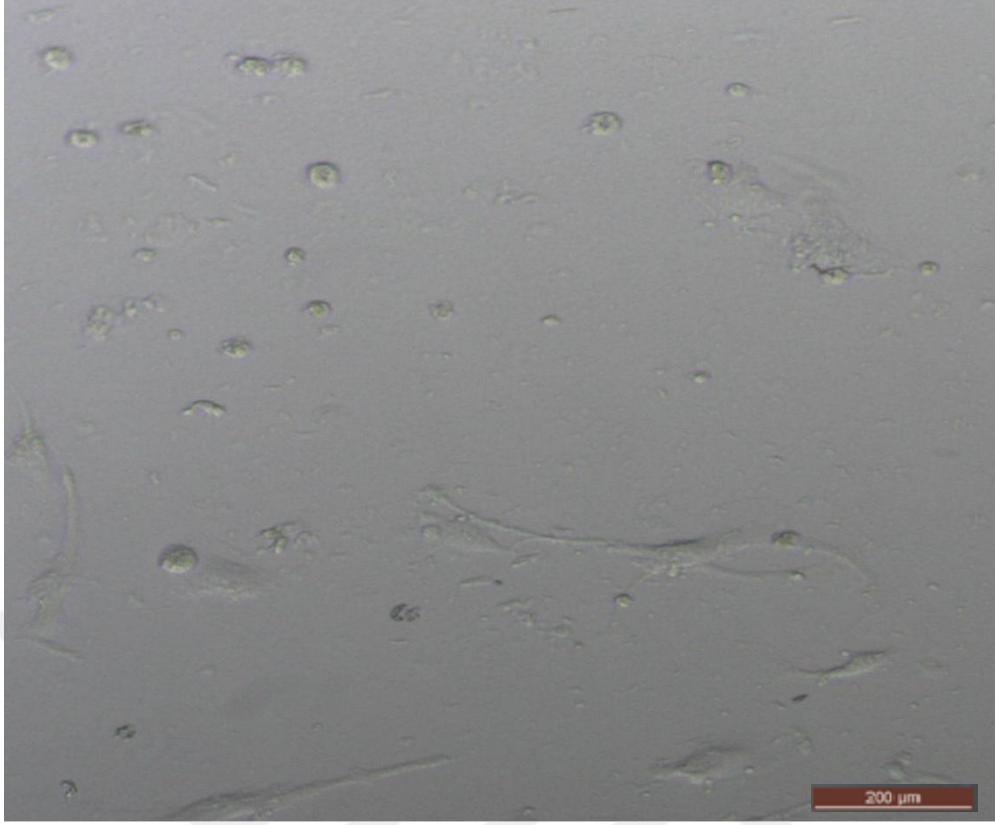


Şekil 3.2. İnsan dermal fibroblast hücrelerinin Invert mikroskoptaki 24. saat sonu kültür görüntüsü (negatif kontrol kuyucukları)

(Bar=200µm-10X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

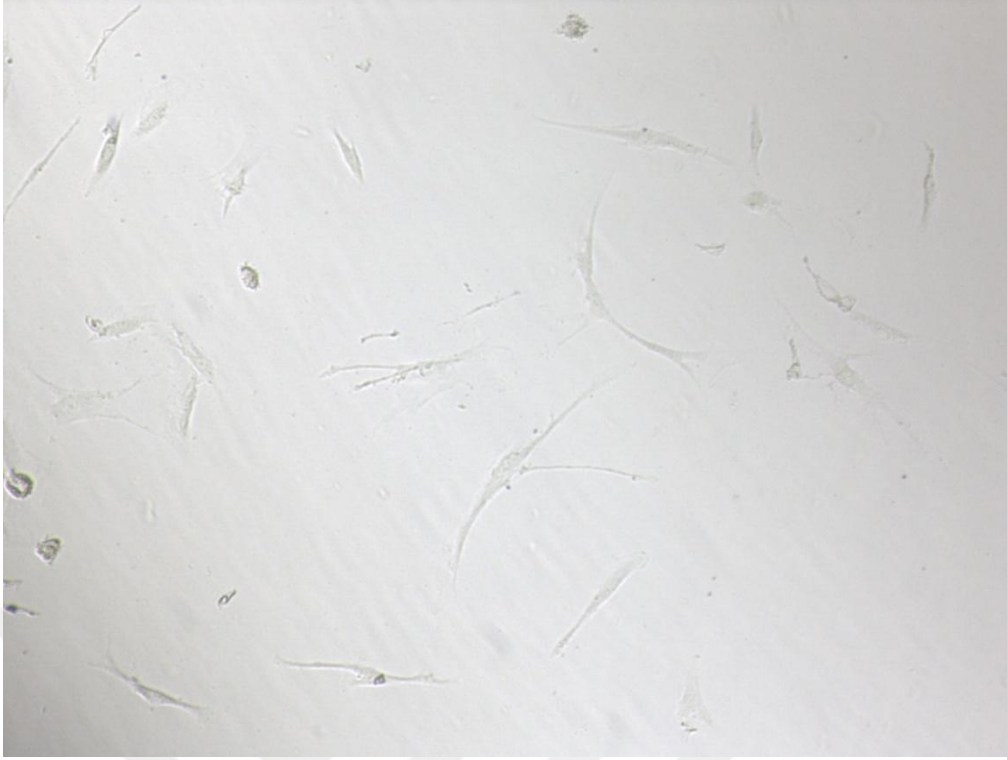
3.2. Büyüme Faktörleri ile Hücrelerin Muamele Edilmesi

48 kuyucuklu hücre kültür işaretlenerek 2 ayrı alana ayrıldı. Birinci alandaki hücreler üzerine, kültür vasatı içerisinde çözülmüş IGF-1'in; 20ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml konsantrasyonları 2 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara pipetlendi (Her bir kuyucuğa 200µl eklendi). İkinci alandaki hücreler üzerine, kültür vasatı içerisinde çözülmüş EGF'nin; 20ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml konsantrasyonları 2 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara pipetlendi (Her bir kuyucuğa 200µl eklendi). 24. saat ve 48. saat sonunda büyüme faktörleri eklenen kuyucuklardaki hücre görüntüleri Şekil 3.3-3.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 3.3. IGF-1 20ng/ml, 24.saat sonu (büyüme faktörü eklendikten sonra)
(Bar=200µm-10X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

20ng/ml IGF-1 ile muamele edilmiş kuyucuklardaki fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kültür petrisine yapıştıkları ve kontrol grubuna göre daha fazla çoğaldığı açıkça gözlemlenmektedir.



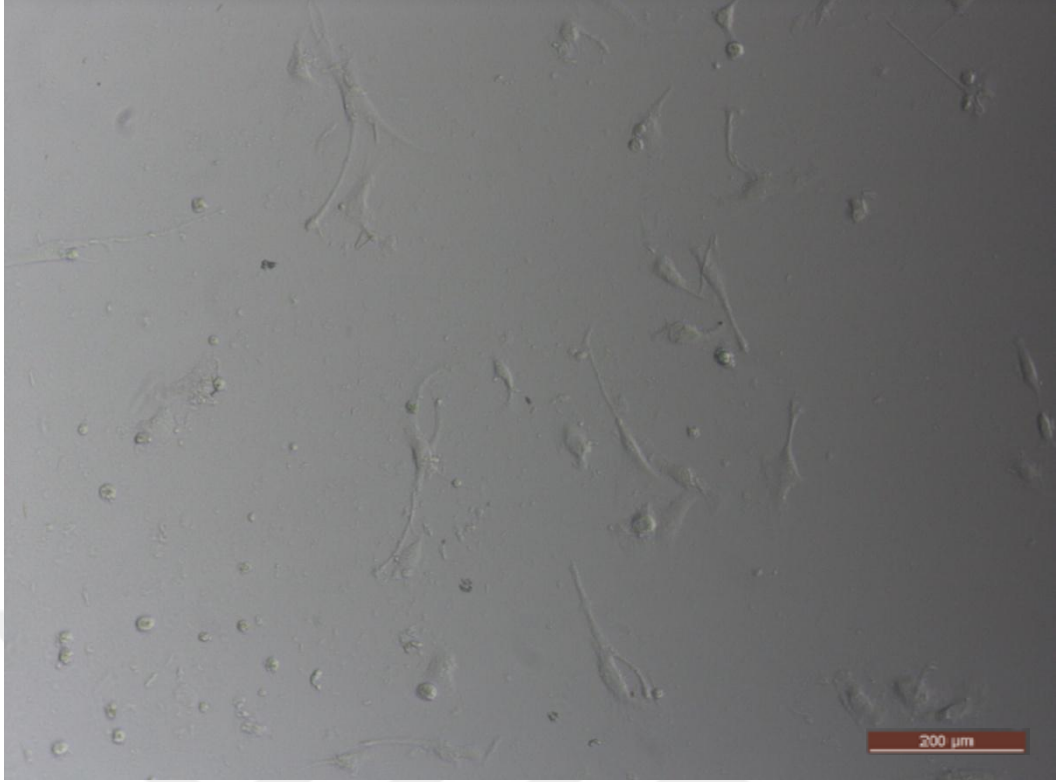
Şekil 3.4. EGF 20ng/ml, 24.saat sonu (büyüme faktörü eklendikten sonra)
(Bar=200µm-10X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

20ng/ml EGF ile muamele edilmiş kuyucuklardaki fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kültür petrisine yapışıkları gözlemlenmektedir. Ancak proliferatif etki belli olmamakla birlikte daha detaylı analizler neticesinde değerlendirilecektir.



Şekil 3.5. IGF-1 10ng/ml, 24.saat sonu (büyüme faktörü eklendikten sonra)
(Bar=200µm-10X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

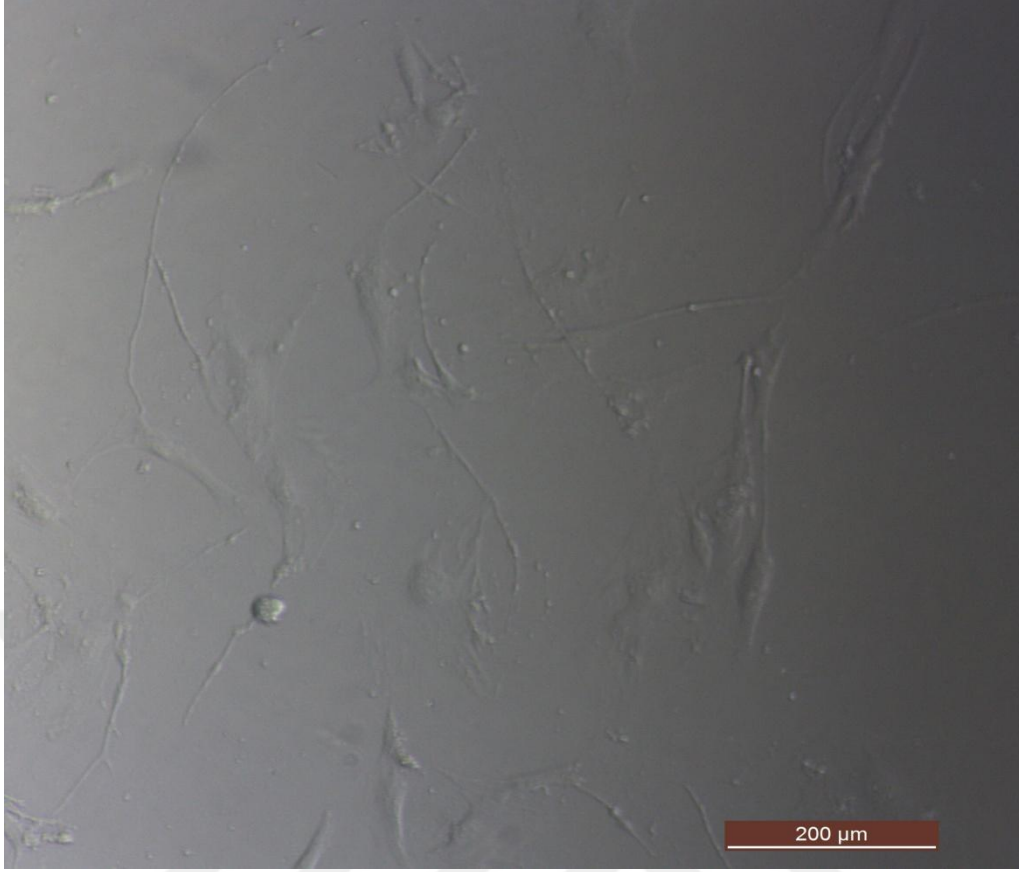
10ng/ml IGF-1 ile muamele edilmiş kuyucuklardaki fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kültür petrisine yapıştıkları ve kontrol grubuna ve 20ng/ml IGF-1 konsantrasyonu uygulanan hücelere göre daha fazla çoğalmış olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.6. EGF 10ng/ml, 24.saat sonu (büyüme faktörü eklendikten sonra)

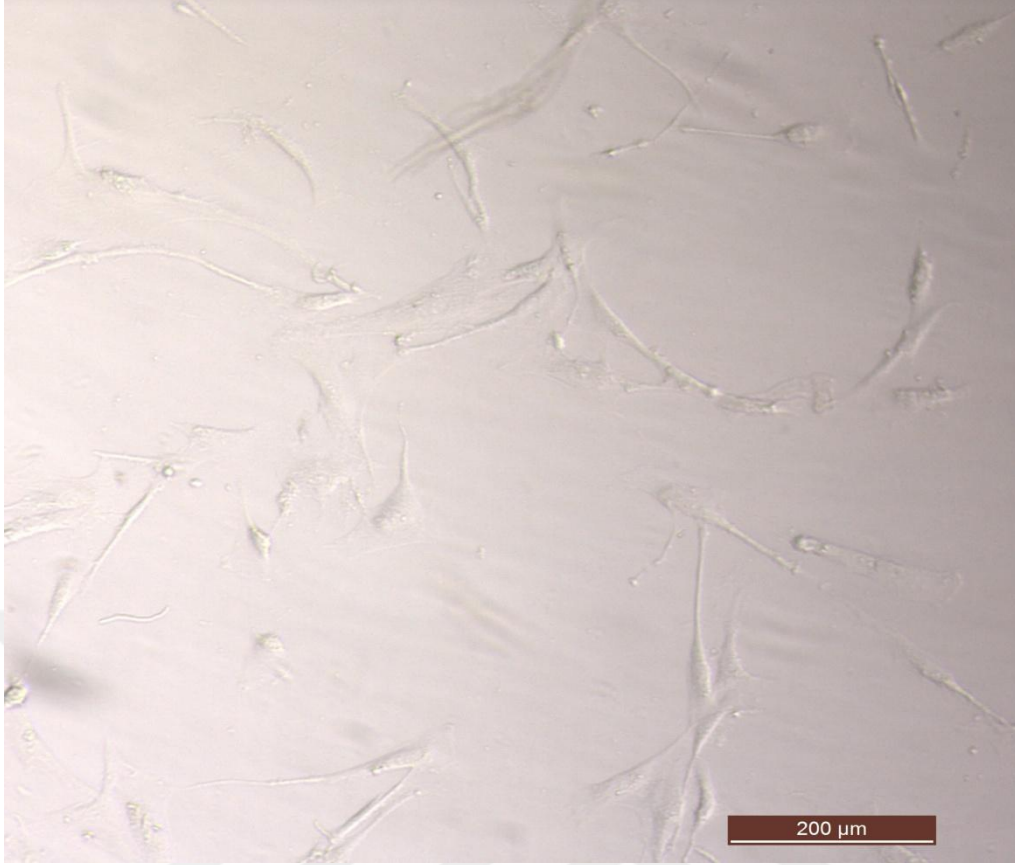
(Bar=200µm-10X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

10ng/ml EGF ile muamele edilmiş kuyucuklardaki fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kültür petrisine yapıştıkları, kontrol grubuna göre ve 20ng/ml konsantrasyona göre daha fazla çoğaldığı gözlemlenmektedir.



Şekil 3.7. IGF-1 5ng/ml, 24.saat sonu (büyüme faktörü eklendikten sonra)
(Bar=200μm-10X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

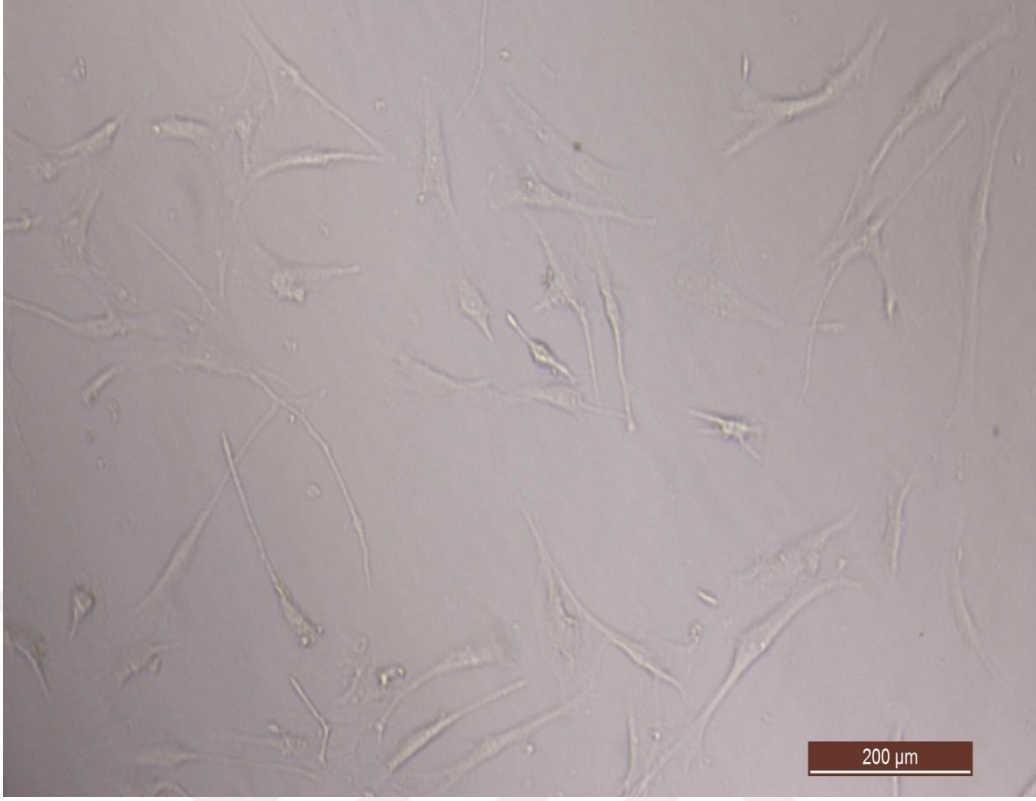
5ng/ml IGF-1 ile muamele edilmiş kuyucuklardaki fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kültür petrisine yapıştıkları ve kontrol grubuna göre daha fazla çoğaldığı açıkça gözlemlenmektedir. Elde edilen hücre görüntülerinde, IGF-1'in 3 ayrı konsantrasyonun da kontrol grubuna göre daha proliferatif etki yarattığı ve bu etkinin birbirine yakın olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada, detaylı analizler ile elde edilen istatistiki veriler neticesinde IGF-1'in hücreler üzerindeki proliferatif etkisi daha anlamlı değerlendirilmiştir.



Şekil 3.8. EGF 5ng/ml, 24.saat sonu (büyüme faktörü eklendikten sonra)

(Bar=200µm-10X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

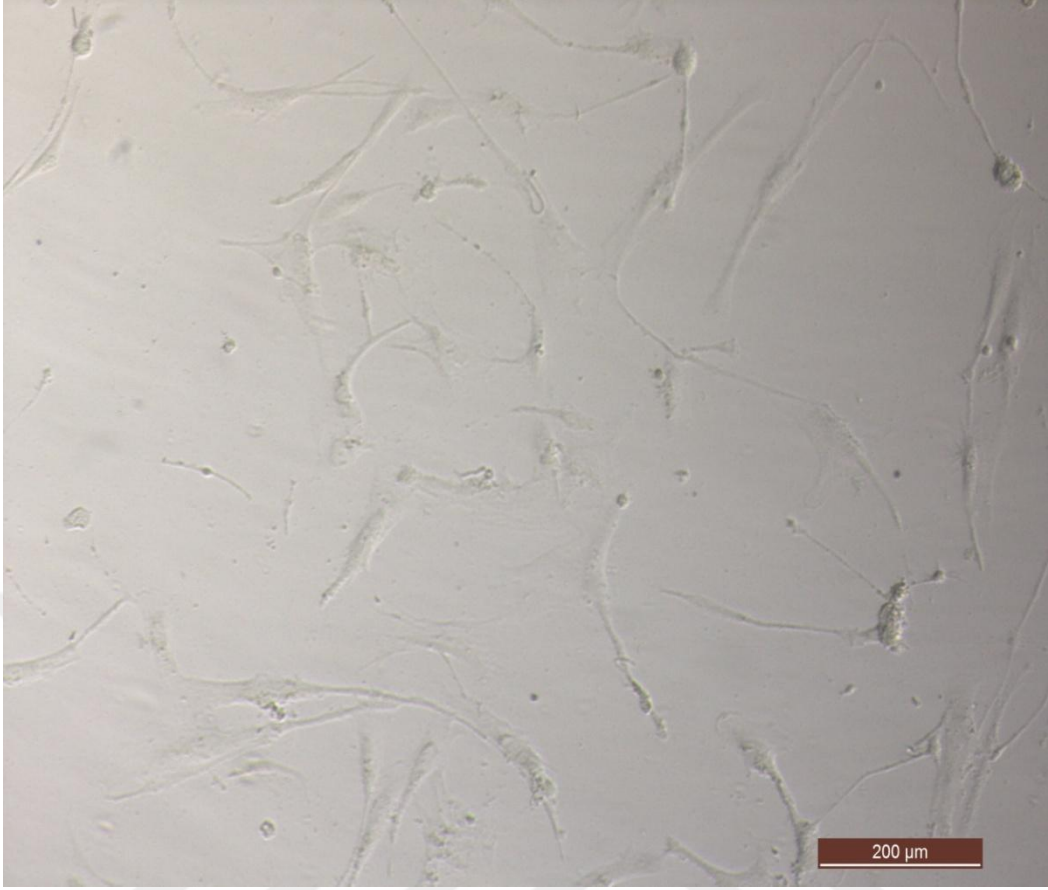
5ng/ml EGF ile muamele edilmiş kuyucuklardaki fibroblast hücrelerinin 24 saat sonunda kültür petrisine yapıştıkları, kontrol grubuna ve diğer uygulanan konsantrasyonlara göre daha fazla çoğaldığı açıkça gözlemlenmektedir. Elde edilen hücre görüntülerinde, EGF'nin 20ng/ml uygulanan konsantrasyon hariç olmak üzere diğer tümünde daha proliferatif etki yarattığı ve bu etkinin IGF-1 uygulanan kuyucuklardaki etkiye yakın olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada, detaylı analizler ile elde edilen istatistikî veriler neticesinde EGF'nin hücreler üzerindeki proliferatif etkisi daha anlamlı değerlendirilmiştir.



Şekil 3.9. IGF-1 5ng/ml, 48.saat sonu (büyüme faktörü eklendikten sonra)

(Bar=200μm-10X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

5ng/ml IGF-1 ile muamele edilmiş kuyucuklardaki fibroblast hücrelerinin 48 saat sonunda kontrol grubuna ve diğer uygulanan konsantrasyonlara göre daha fazla çoğaldığı gözlemlenmektedir. Elde edilen hücre görüntülerinde, EGF'nin 20ng/ml uygulanan konsantrasyon hariç olmak üzere diğer tümünde daha proliferatif etki yarattığı gözlemlenmiştir. Çalışmada, detaylı analizler ile elde edilen istatistiki veriler neticesinde IGF-1'in hücreler üzerindeki proliferatif etkisi daha anlamlı değerlendirilmiştir.



Şekil 3.10. EGF 5ng/ml, 48.saat sonu (büyüme faktörü eklendikten sonra)

(Bar=200μm-10X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

5ng/ml EGF ile muamele edilmiş kuyucuklardaki fibroblast hücrelerinin 48 saat kontrol grubuna ve diğer uygulanan konsantrasyonlara göre daha fazla çoğaldığı açıkça gözlemlenmektedir. Elde edilen hücre görüntülerinde, EGF'nin 20ng/ml uygulanan konsantrasyon hariç olmak üzere diğer tümünde daha proliferatif etki yarattığı ve bu etkinin IGF-1 uygulanan kuyucuklardaki etkiye de yakın olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada, detaylı analizler ile elde edilen istatistiki veriler neticesinde EGF'nin hücreler üzerindeki proliferatif etkisi daha anlamlı değerlendirilmiştir.

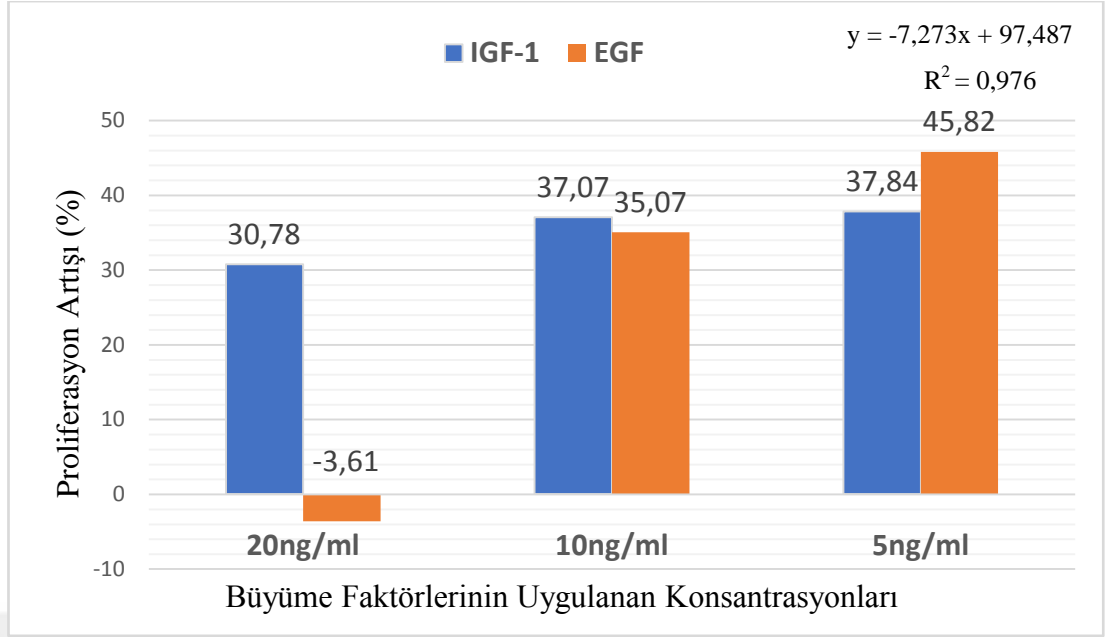
3.3. WST-1 Analizi ile Toksisitenin Belirlenmesi

WST-1 analizi ile yapılan sitotoksisite testinde, IGF-1 ve EGF büyüme faktörünün insan dermal fibroblast hücre kültürü üzerindeki sitotoksik etkisi Çizelge 3.1. ve Şekil 3.11.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Büyüme faktörleri uygulanmış insan dermal fibroblast hücrelerinin WST-1 analizi sonucundaki canlılık yüzdeleri (Absorbans=440nm)

Büyüme Faktörü	Uygulanan Miktar (ng/ml)	1. Kuyucuk	2. Kuyucuk	Ort.	Negatif Kontrol Ortalama	Canlılık ± Standart Sapma (%)
IGF-1	20ng/ml	0.504	0.348	0.426	0.326	+ 30.78 ± 0.11
IGF-1	10ng/ml	0.459	0.434	0.447		+ 37.07 ± 0.02
IGF-1	5ng/ml	0.420	0.478	0.449		+ 37.84 ± 0.04
EGF	20ng/ml	0.364	0.264	0.314		- 3.61 ± 0.07
EGF	10ng/ml	0.451	0.429	0.440		+ 35.07 ± 0.02
EGF	5ng/ml	0.482	0.468	0.475		+ 45.82 ± 0.10

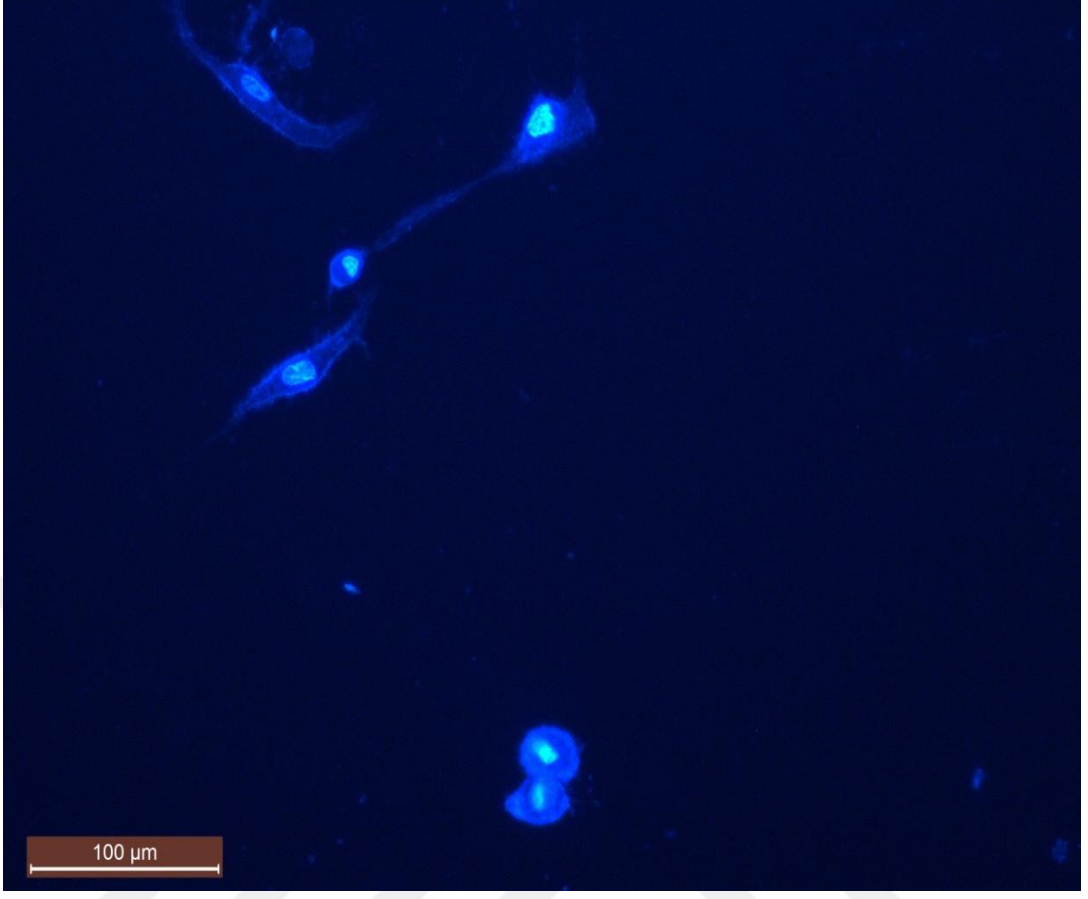
Çizelge 3.1.'de ifade edilen değerler doğrultusunda; hücre canlılığı açısından, IGF-1 ve EGF'nin azalan konsantrasyonlarının kontrol grubu ortalamasına göre daha olumlu bir etki yarattığı gözlemlenmiştir. Ancak; EGF'nin 20ng/ml konsantrasyonunun sitotoksik etki gösterdiği ve kontrol grubunun ortalamasına göre % 3.61 ± 0,07 oranında hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu bulgusu elde edilmiştir. EGF'nin 5ng/ml konsantrasyonu ise, kontrol grubu ortalamasına göre hücre canlılığında %45.82 ± 0,10 ile en yüksek artışı göstermiştir.



Şekil 3.11. Büyüme faktörü uygulanan hücrelerin kontrol (standart) grubuna göre proliferasyon artış grafiği

3.4. İkili Boyama (Double Staining) Metodu ile Apoptoz ve Nekroz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Apoptoz ve nekrozun belirlenmesi için ikili boyama metodu kullanılmıştır. İkili boyama solüsyonu içerisinde bulunan Hoechst (33342) floresan boyası DNA'ya afinite olarak mavi floresan ışık altında hücre çekirdeklerinin mavi renkte görünmesini sağlar. Apoptotik hücre çekirdekleri, parçalanmış, daha parlak, çekirdek sınırları bozulması vb. özelliklerinden dolayı diğer mavi boyanmış çekirdeklerden ayırt edilebilirler. DAPI ve FITCH (480 ve 520nm dalga boyu) filtrelerinde incelemeler gerçekleştirilmiştir. Büyüme faktörleri eklenen kuyucuklardaki apoptoz, nekroz görüntüleri Şekil 3.12. - 3.25.'te gösterilmiştir.



Şekil 3.12. Negatif kontrol apoptoz görüntüsü (büyüme faktörü eklenmemiş)

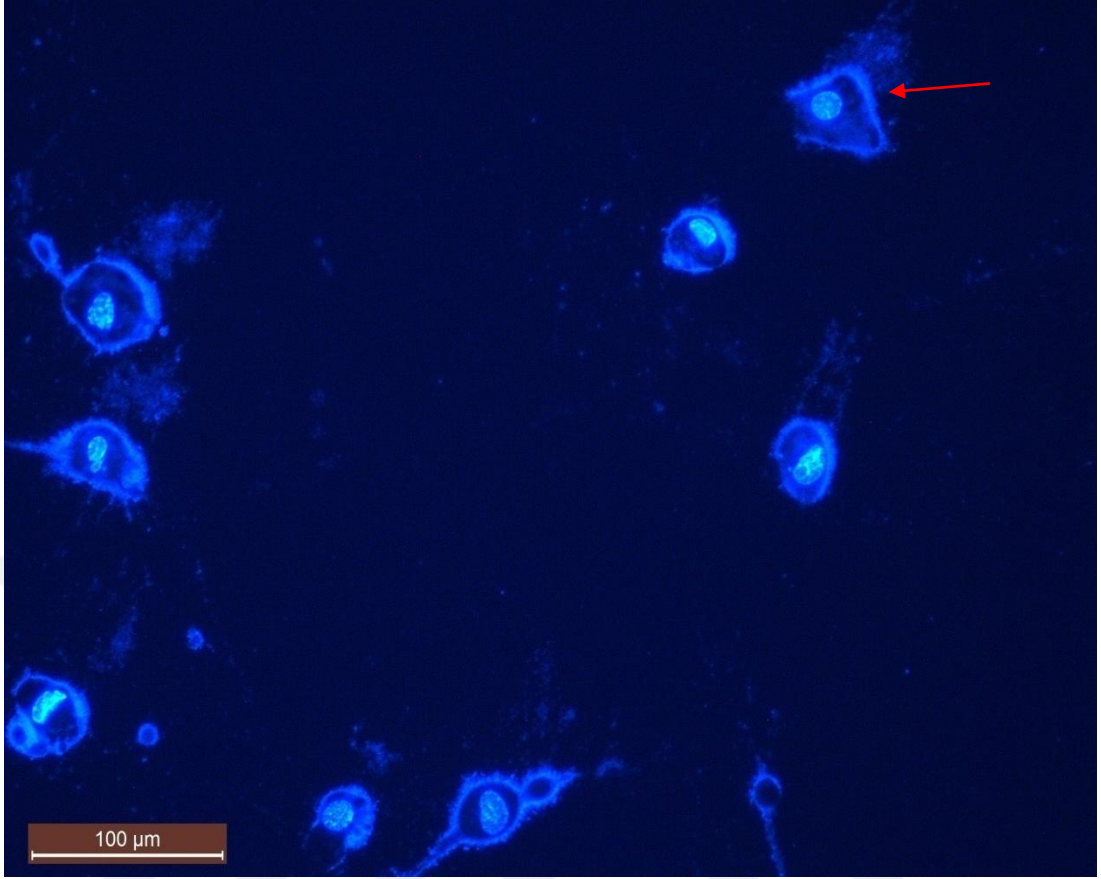
(Bar=100µm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)



Şekil 3.13. Negatif kontrol nekroz görüntüsü (büyüme faktörü eklenmemiş)

(Bar=100μm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

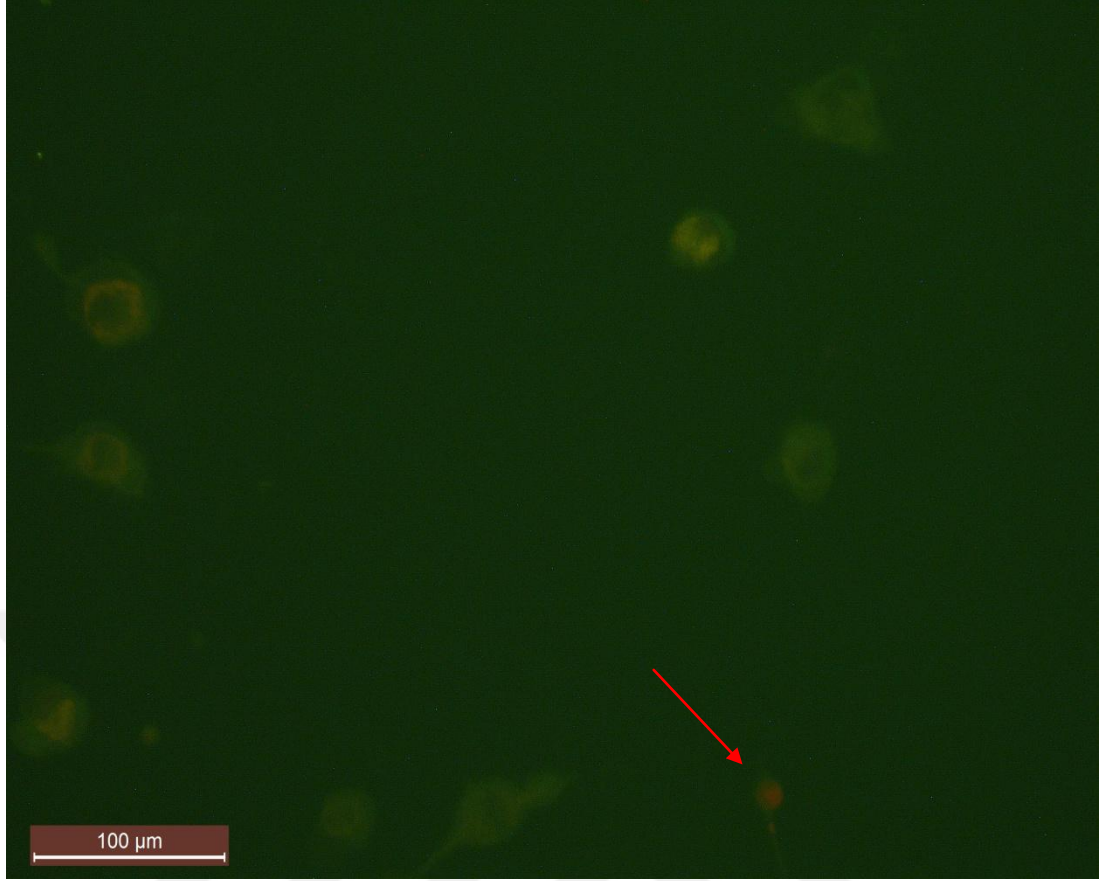
Negatif kontrol kuyucuklarında yer alan hücrelerde hücre kültür vasatının herhangi bir apoptatik ve nekrotik etki yaratmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.14. 20ng/ml IGF-1 apoptoz görüntüsü

(Bar=100µm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

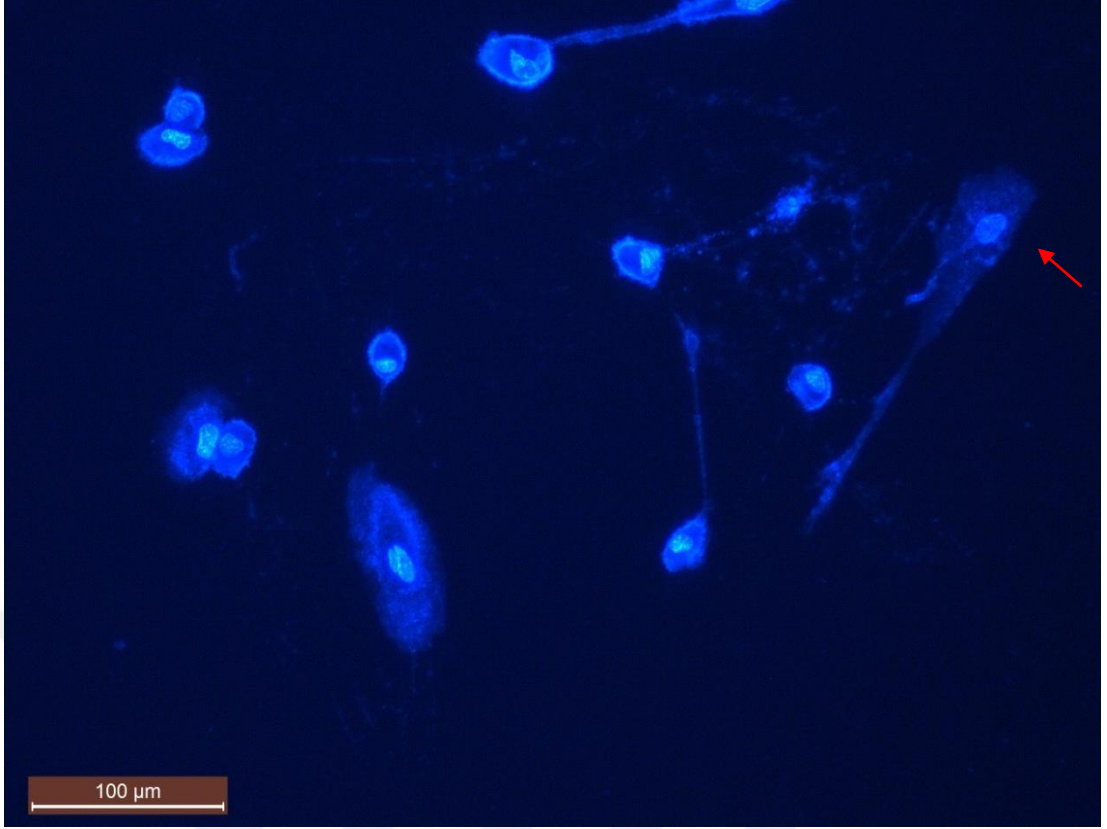
20ng/ml IGF-1 ile muamele edilmiş kuyucuklarda, istatistiki olarak $\%4.67\pm0.40$ düzeyinde apoptoza uğramış hücelere rastlanılmıştır. Ancak birim alana düşen hücre sayısı dikkate alındığında kontrol grubuna göre $\%30$ 'dan daha fazla artış olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3.15. 20ng/ml IGF-1 nekroz görüntüsü

(Bar=100μm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

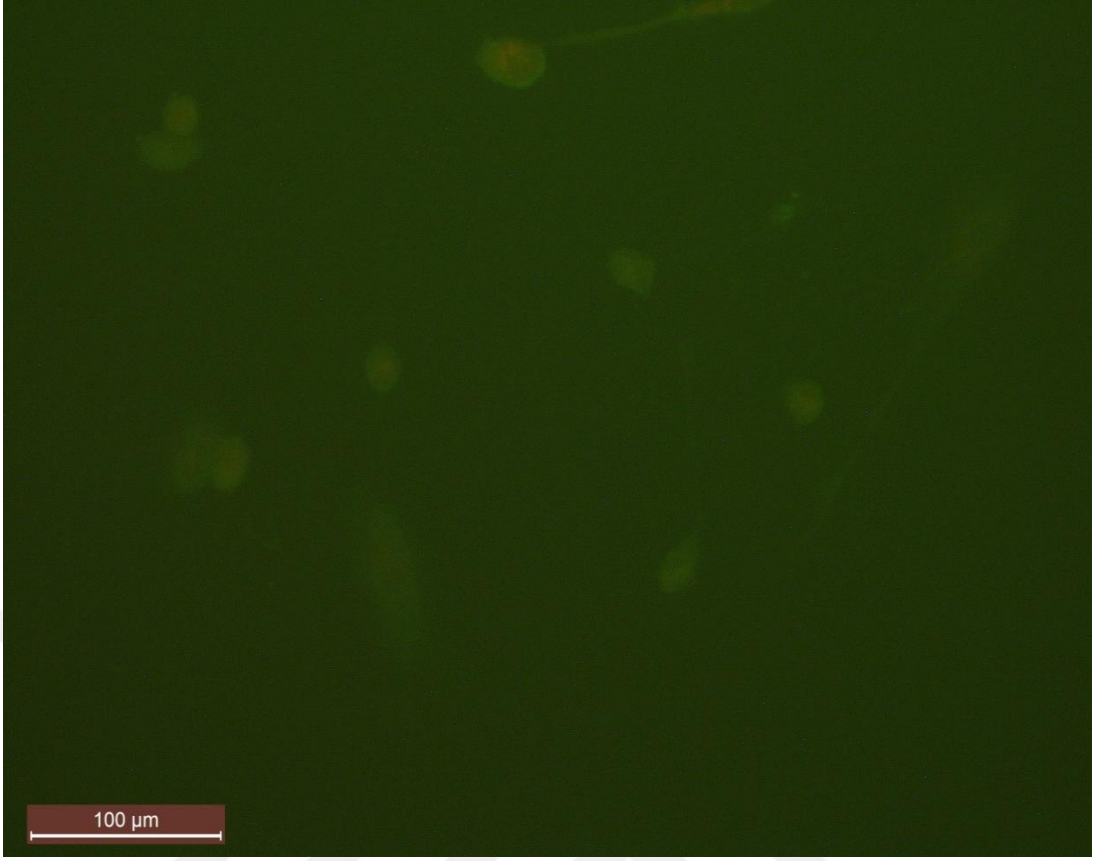
20ng/ml IGF-1 ile muamele edilmiş kuyucuklarda, istatistiki olarak % 2.54 ± 0.35 düzeyinde nekroza uğramış hücrelere rastlanılmıştır.



Şekil 3.16. 10ng/ml IGF-1 apoptoz görüntüsü.

(Bar=100µm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

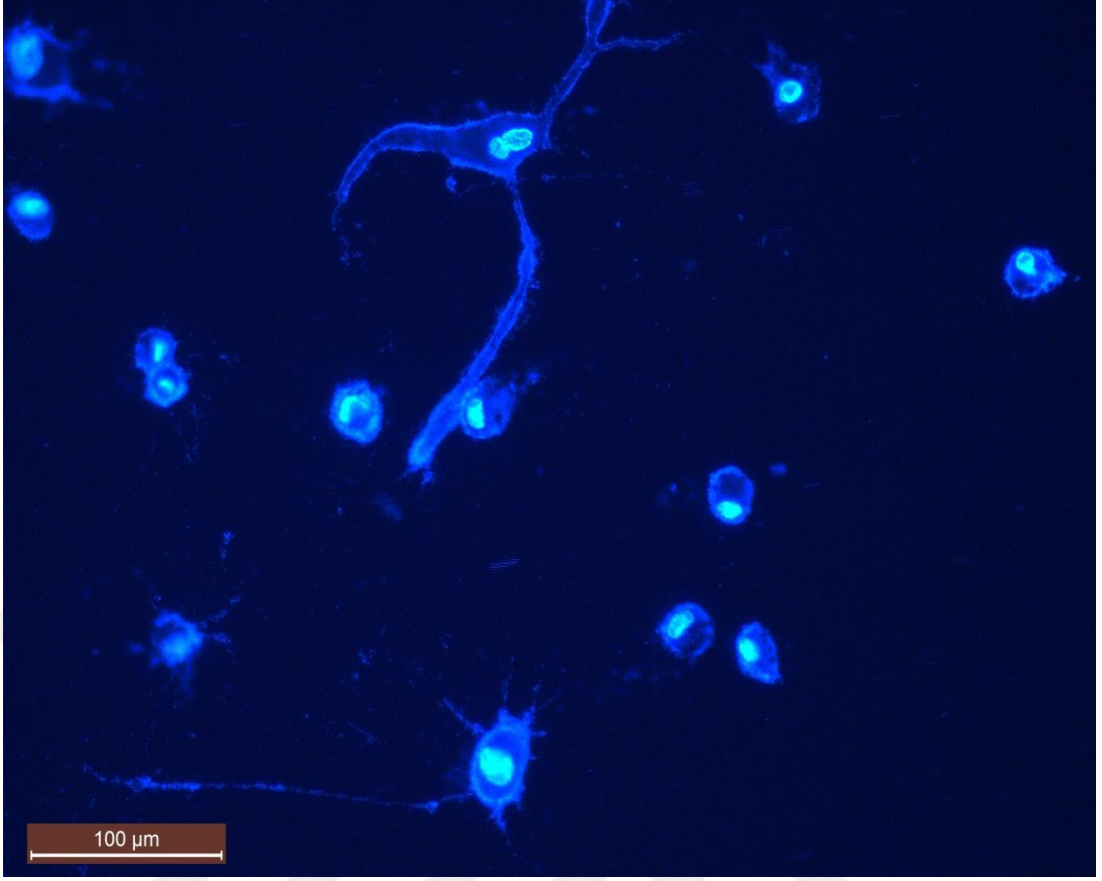
10ng/ml IGF-1 ile muamele edilmiş kuyucuklarda, istatistiki olarak % 4.18 ± 0.30 düzeyinde apoptoza uğramış hücelere rastlanılmıştır.



Şekil 3.17. 10ng/ml IGF-1 nekroz görüntüsü.

(Bar=100µm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

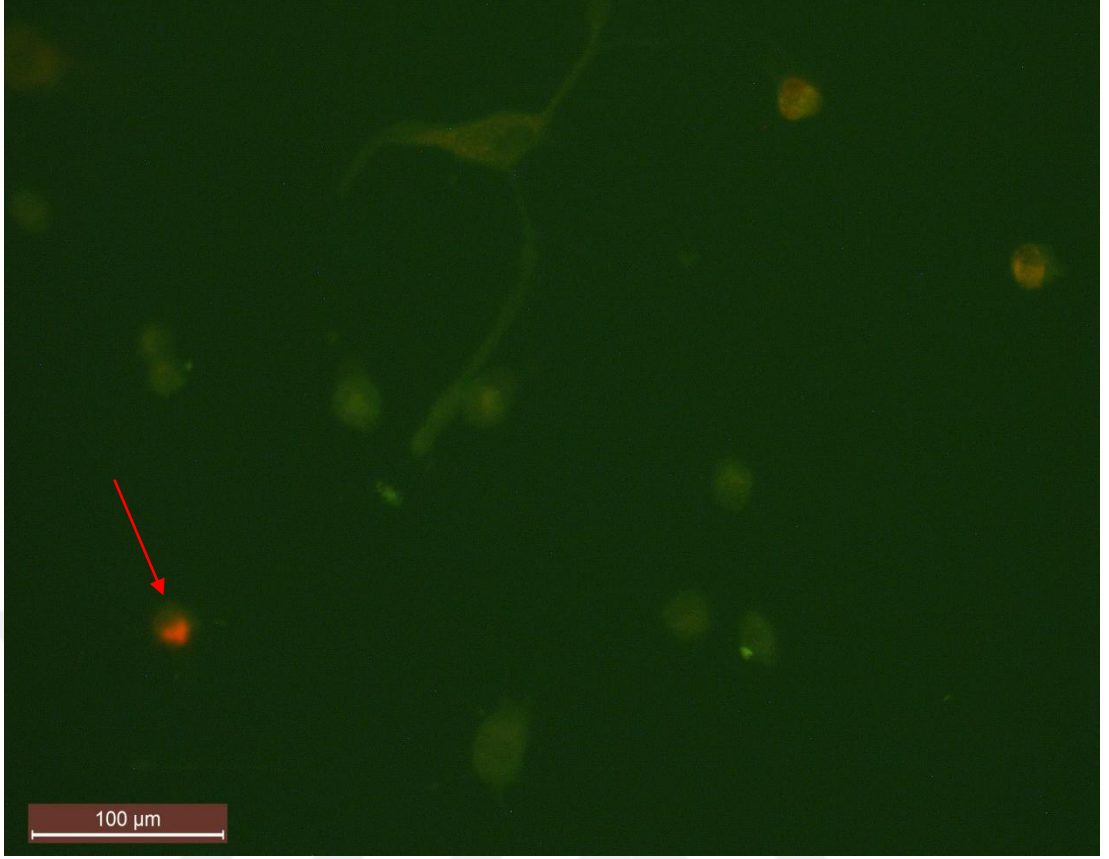
10ng/ml IGF-1 ile muamele edilmiş kuyucuklarda, istatistiki olarak % 1.54±0.25 düzeyinde nekroza uğramış hücrelere rastlanılmıştır.



Şekil 3.18. 5ng/ml IGF-1 apoptoz görüntüsü.

(Bar=100µm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

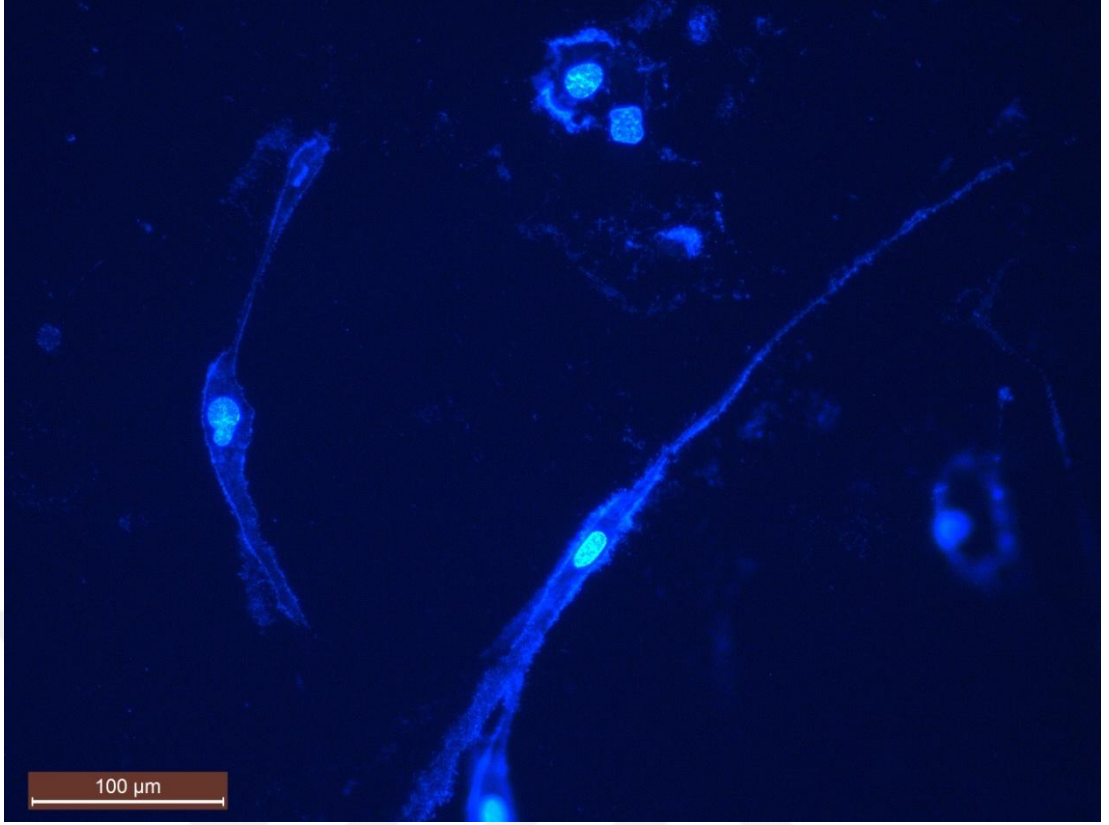
5ng/ml IGF-1 ile muamele edilmiş kuyucuklarda, istatistiki olarak % 2.33 ± 0.20 düzeyinde apoptoza uğramış hücelere rastlanılmıştır.



Şekil 3.19. 5ng/ml IGF-1 nekroz görüntüsü.

(Bar=100μm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

5ng/ml IGF-1 ile muamele edilmiş kuyucuklarda, istatistiki olarak % 1.32 ± 0.20 düzeyinde nekroza uğramış hücrelere rastlanılmıştır.



Şekil 3.20. 20ng/ml EGF apoptoz görüntüsü.

(Bar=100µm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

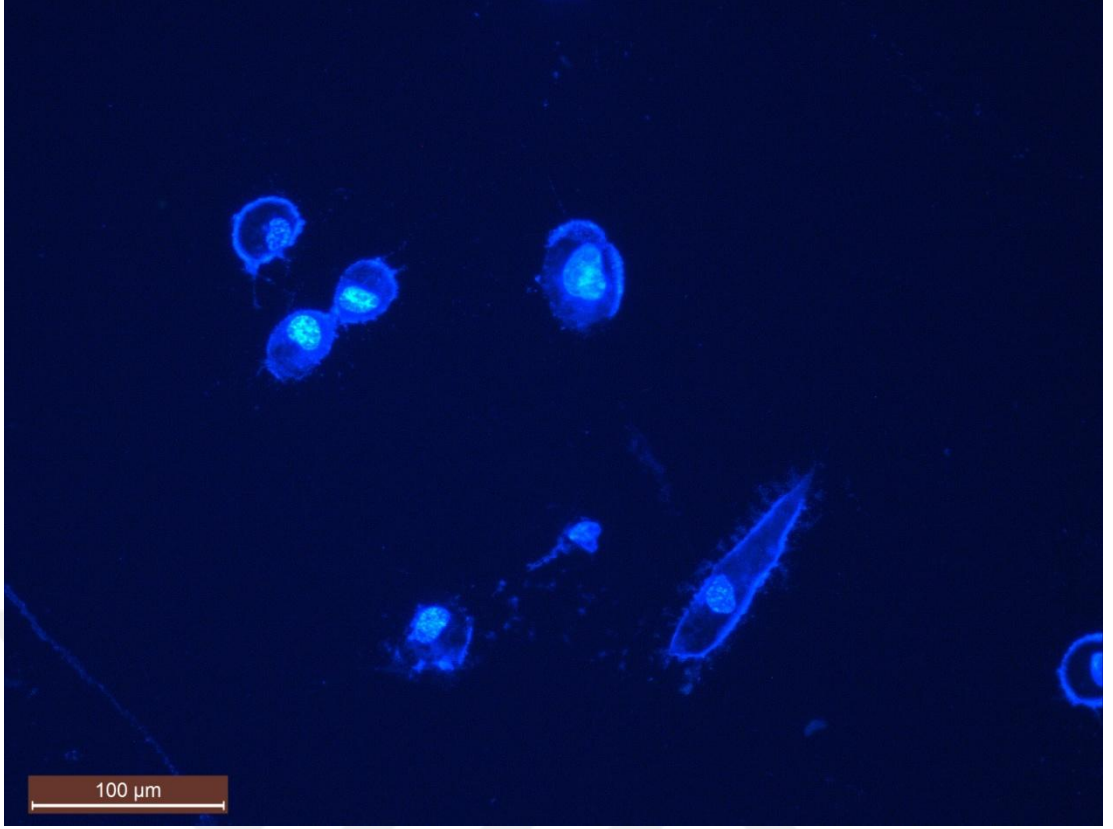
20ng/ml EGF ile muamele edilmiş kuyucuklarda, istatistiki olarak % 8.32 ± 0.70 düzeyinde apoptoza uğramış hücelere rastlanılmıştır. Birim alana düşen hücre sayısı dikkate alındığında ise kontrol grubuna göre %3.61 düşüş olduğu tespit edilmiştir. Bu durum nekrotik hücre görüntüsü ile beraber değerlendirilmiştir.



Şekil 3.21. 20ng/ml EGF nekroz görüntüsü.

(Bar=100μm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

20ng/ml EGF uygulanan kuyucuklarda, istatistiki olarak % 11.48±1.00 oranında nekroza uğramış hücelere rastlanılmıştır. WST-1 analiz sonuçlarında, hücre canlılığında %3.61'lik düşüşün olduğu ve fenotipik gözlemde hücre morfolojisinin de kısmen bozulduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.22. 10ng/ml EGF apoptoz görüntüsü.

(Bar=100μm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

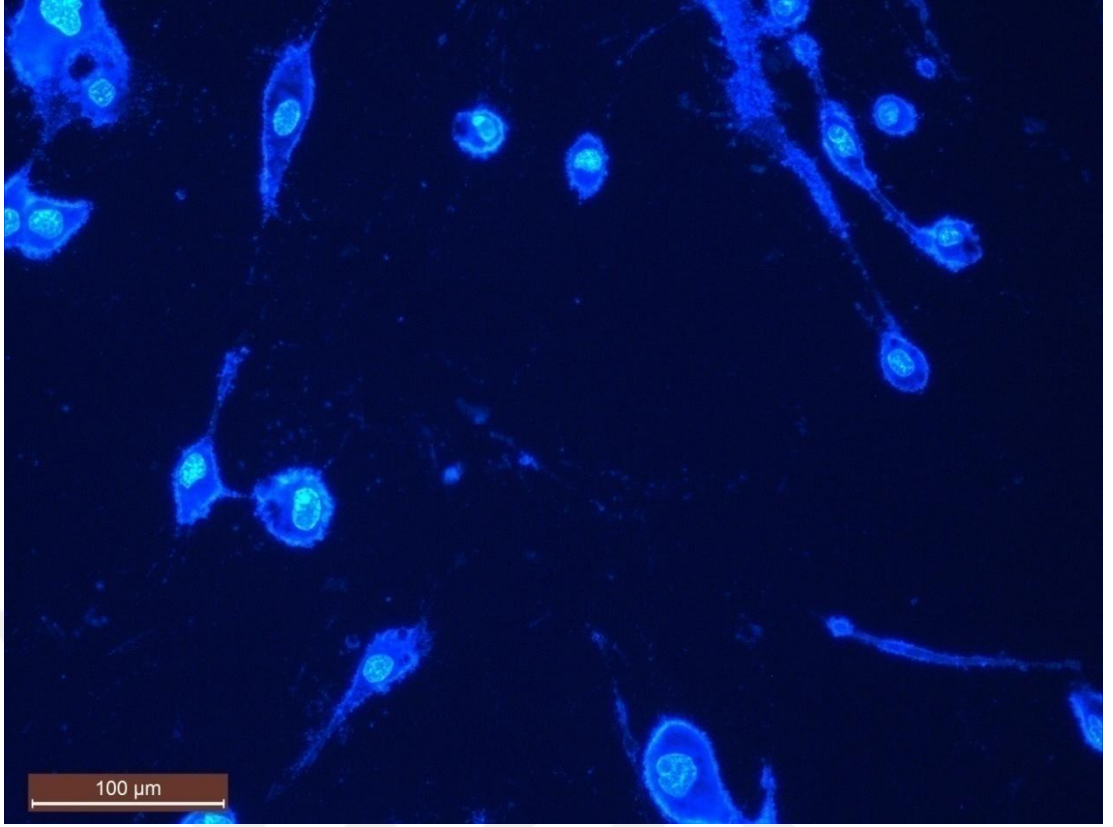
10ng/ml EGF ile muamele edilmiş kuyucuklarda, istatistiki olarak % 2.78 ± 0.40 düzeyinde apoptoza uğramış hücrelere rastlanılmıştır.



Şekil 3.23. 10ng/ml EGF nekroz görüntüsü.

(Bar=100μm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

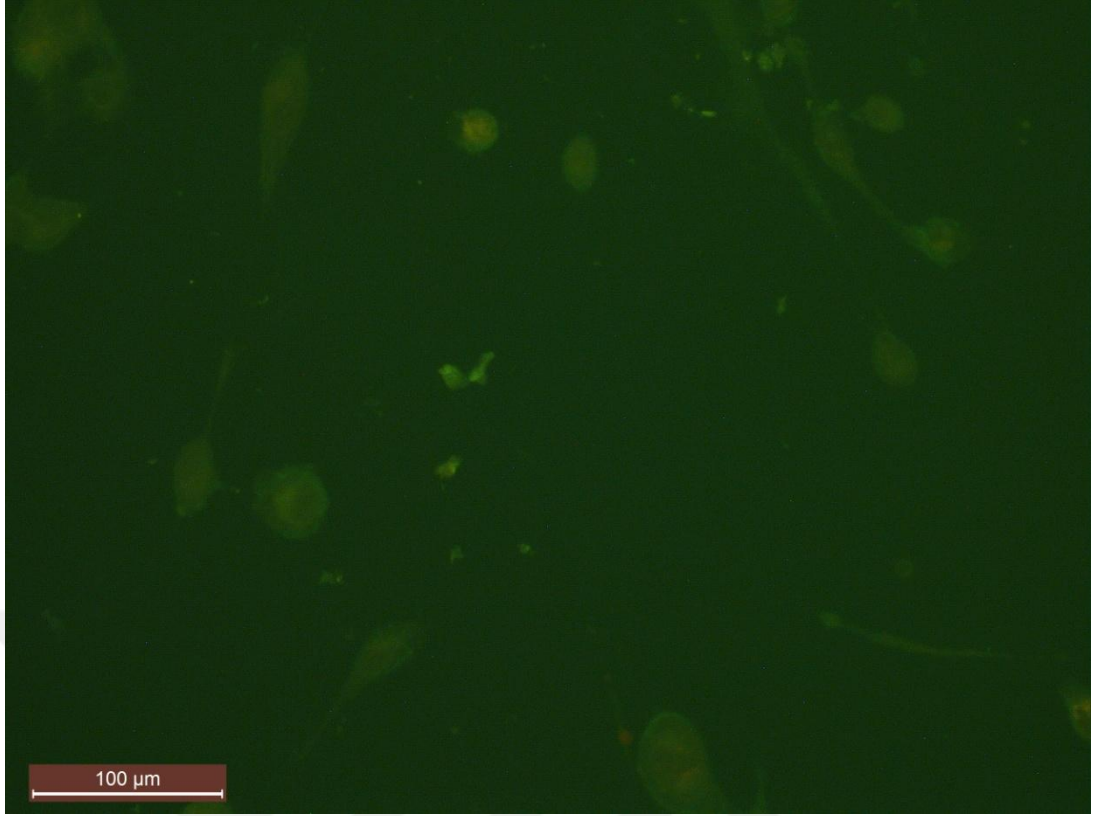
10ng/ml EGF ile muamele edilmiş kuyucuklarda, istatistiki olarak % 2.71±0.30 düzeyinde nekroza uğramış hücrelere rastlanılmıştır.



Şekil 3.24. 5ng/ml EGF apoptoz görüntüsü.

(Bar=100μm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

5ng/ml EGF ile muamele edilmiş kuyucuklarda, istatistiki olarak % 2.25±0.20 düzeyinde apoptoza uğramış hücelere rastlanılmıştır.



Şekil 3.25. 5ng/ml EGF nekroz görüntüsü.

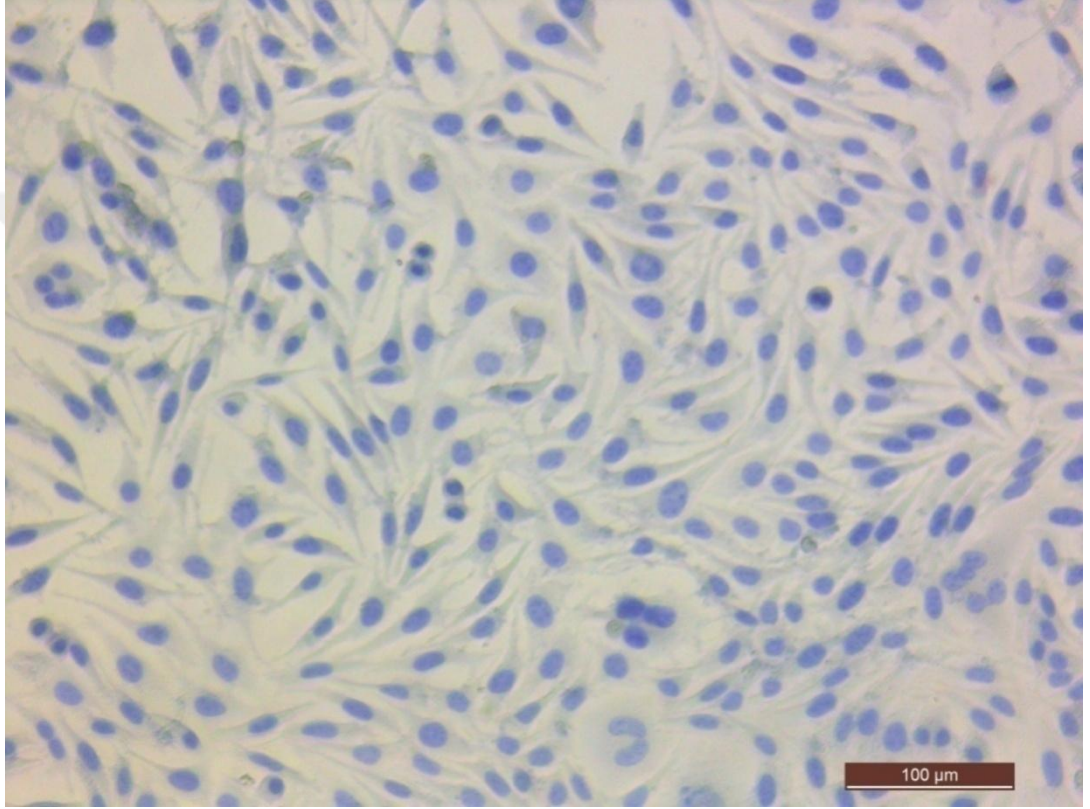
(Bar=100µm-20X büyütmede floresan ataçmanlı Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

5ng/ml EGF ile muamele edilmiş kuyucuklarda, istatistiki olarak % 1.89 ± 0.20 düzeyinde nekroza uğramış hücelere rastlanılmıştır.

İkili boyama metodu ile elde edilen apoptoz ve nekroz görüntüleri doğrultusunda; EGF'nin 20ng/ml konsantrasyonu uygulanan kuyucuk hariç olmak üzere ,diğer tüm kuyucuklarda önemsiz düzeyde nekrotik hücelere rastlanılmıştır. EGF'nin 20ng/ml konsantrasyon uygulanan kuyucukta yaklaşık % 11.48 ± 1.00 oranında nekrotik hücelere tespit edilmiştir. Elde edilen analiz sonuçları neticesinde yüksek dozdaki EGF konsantrasyonunun hücelerde nekroza sebebiyet vermesinin yanı sıra hücre canlılığında da azalmaya neden olmaktadır.

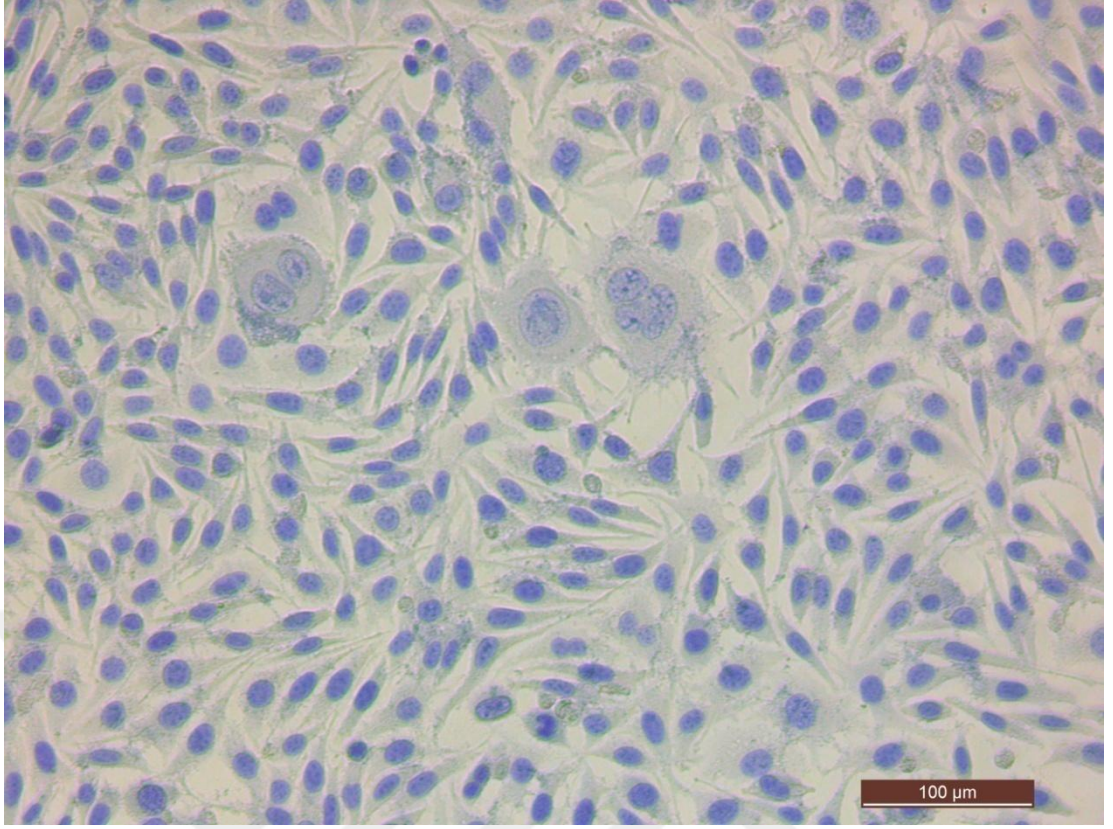
3.5. DAB Kromojen Boyama ile Kollajen Tip-1 Analizi

DAB kromojen boyama metodu ile büyüme faktörlerinin farklı konsantrasyonlarının uygulandığı insan dermal fibroblast hücrelerinin kollajen tip-1 protein sentezleri Şekil 3.26 – 3.37’de gösterilmiştir.



Şekil 3.26. Negatif kontrol kuyucuk görüntüsü

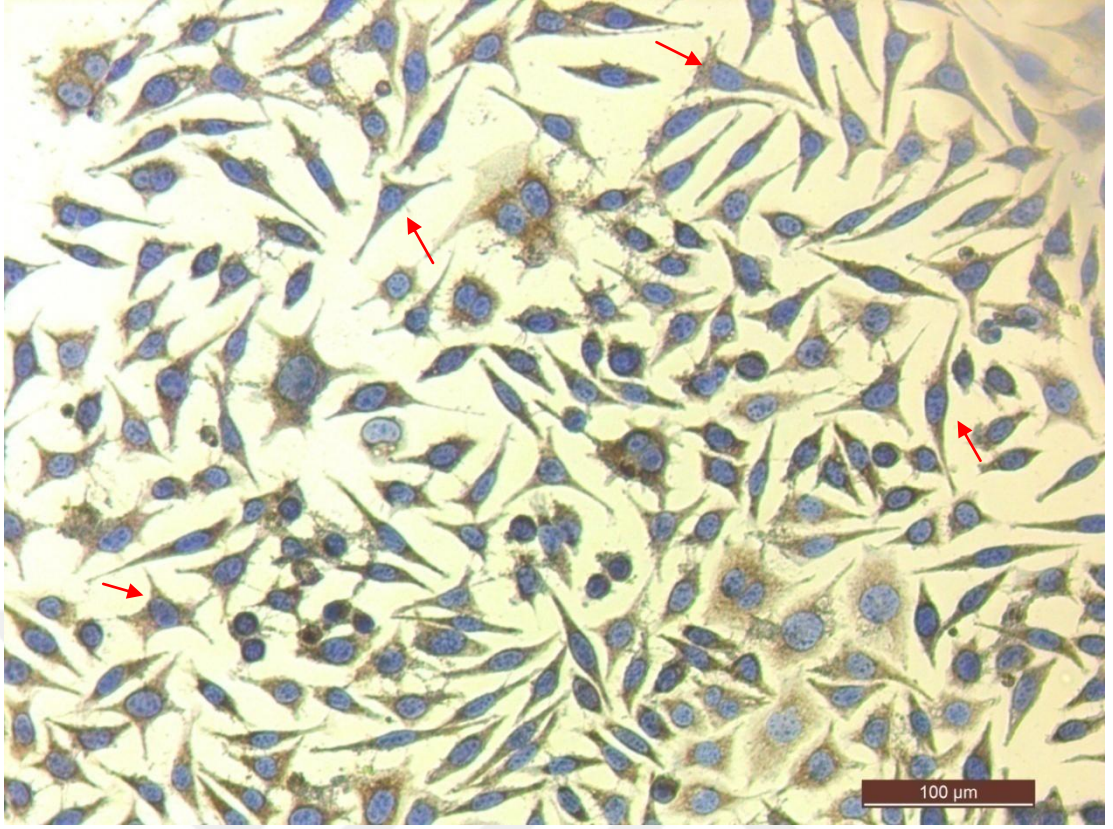
(Bar=100µm-20X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)



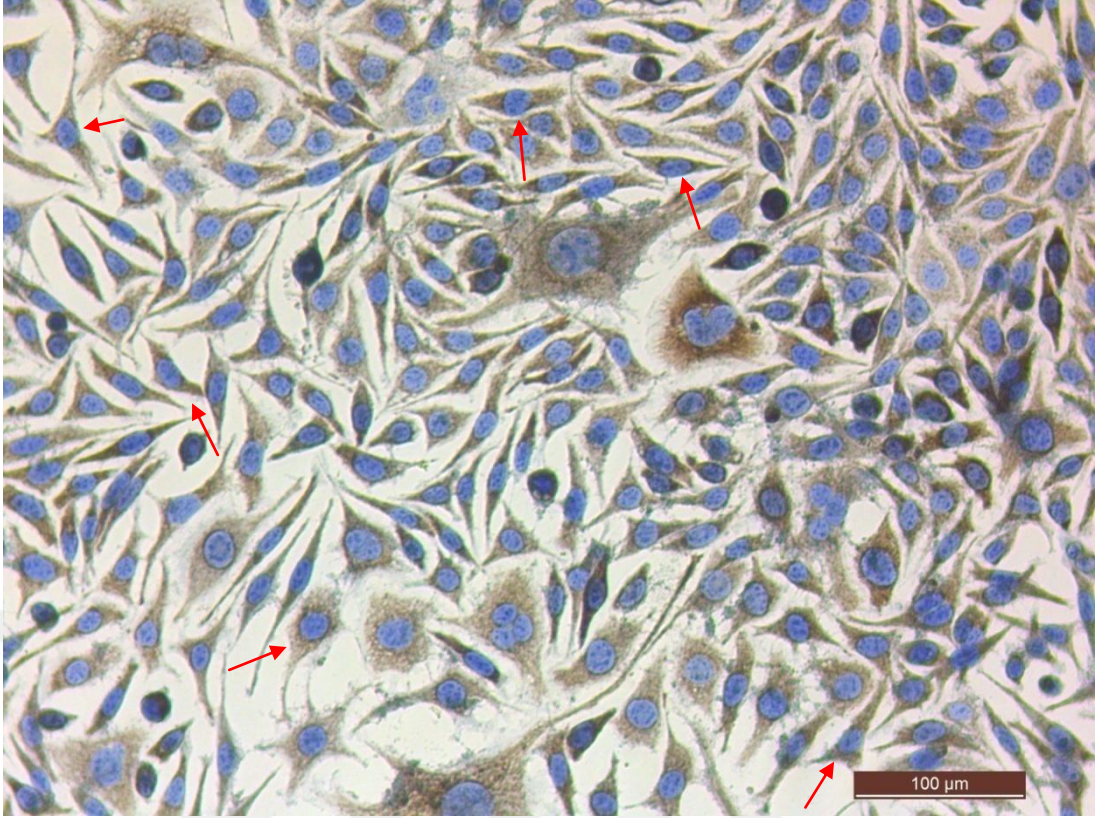
Şekil 3.27. Negatif kontrol kuyucuk görüntüsü (büyüme faktörü uygulanmış, antikor eklenmemiş)

(Bar=100μm-20X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

Negatif kontrol kuyucuklarında, hücrelerin sitoplazmaları içerisinde kahverengi olarak boyanmış kollajen tip-1 proteinlerinin görülmemesi beklenmiştir. Diğer bir ifadeyle; kuyucuklara kollajen tip-1 primer antikor eklenmediği için, hücrenin sitoplazması içerisinde var olduğu düşünülen kollajen tip-1 proteinlerine bağlanamamış ve herhangi bir protein varlığını işaret eden görüntüye de bu sebeple rastlanılmamıştır.

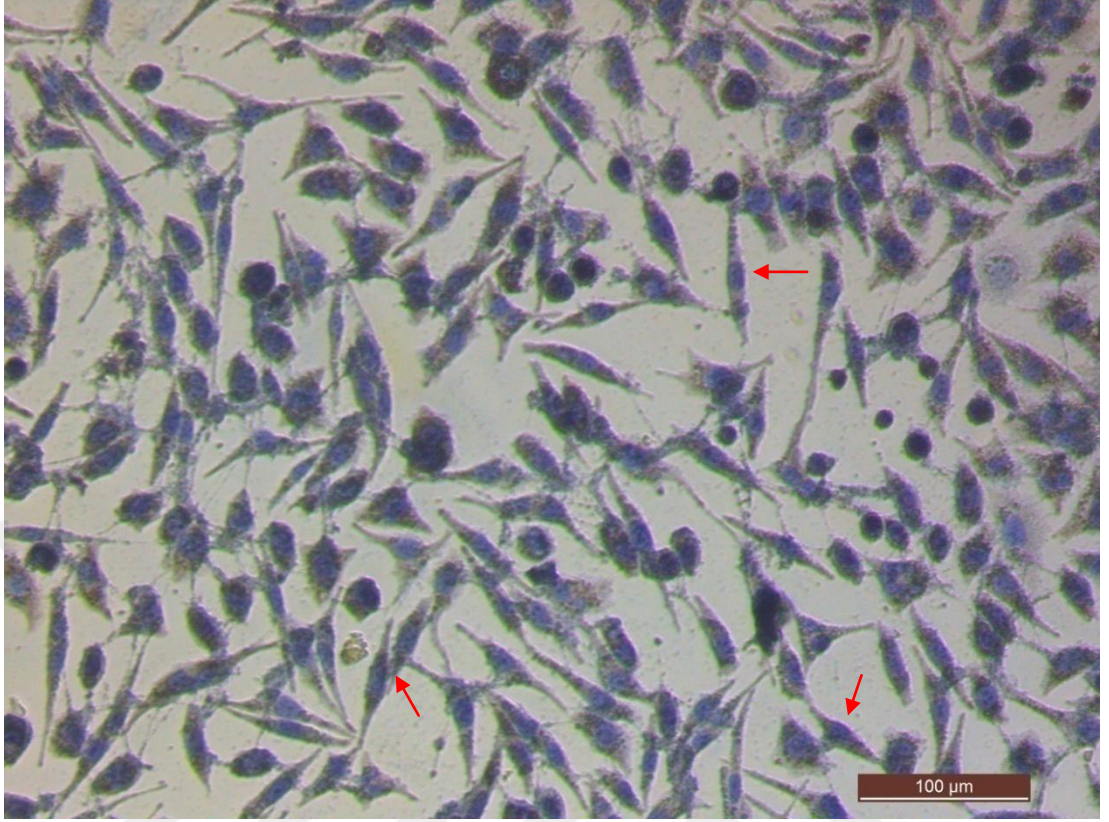


Şekil 3.28. Pozitif kontrol kuyucuk görüntüsü (büyüme faktörü uygulanmamış)
(Bar=100µm-20X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)



Şekil 3.29. Pozitif kontrol kuyucuk görüntüsü (büyüme faktörü uygulanmamış)
(Bar=100μm-20X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

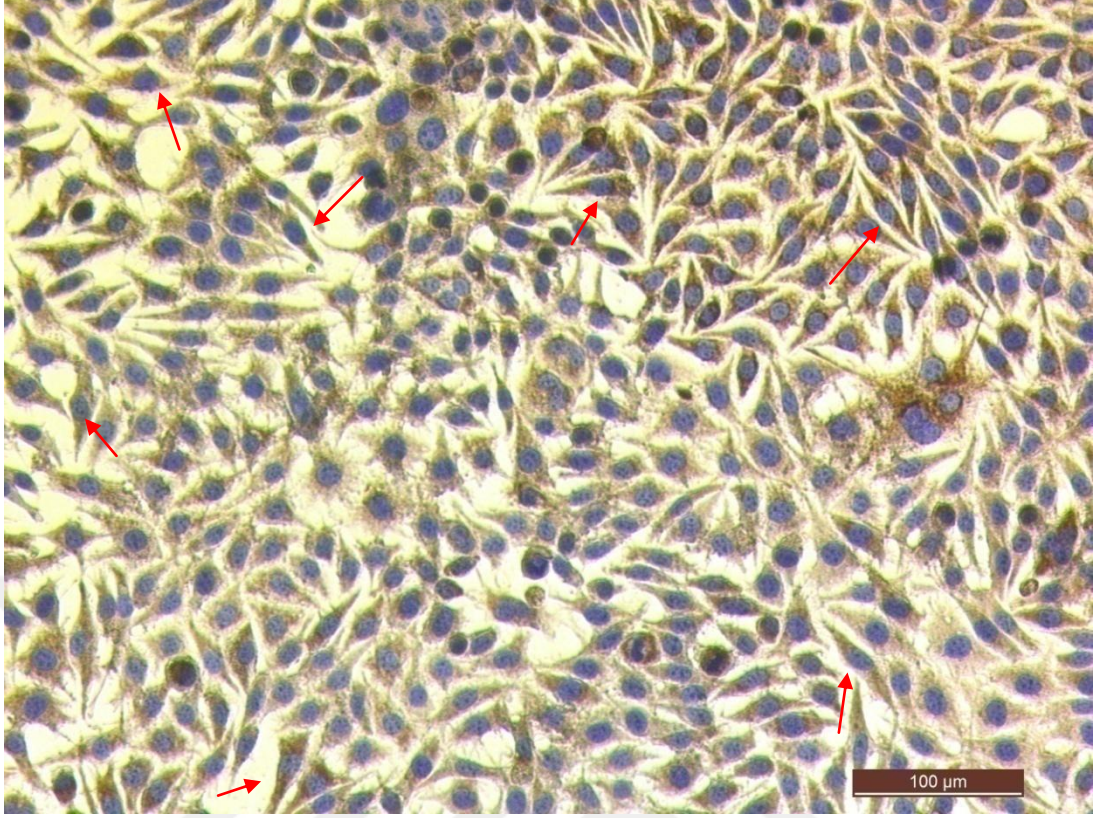
Pozitif kontrol kuyucuklarında, hücrelerin sitoplazmaları içerisinde kahverengi olarak boyanmış kollajen tip-1 proteinlerinin görülmesi beklenmiştir. Büyüme faktörü uygulanmamış olmasına rağmen hücrelerin bu dış faktörden bağımsız olarak kollajen tip-1 proteini üretimlerini gerçekleştirdiği görülmektedir.



Şekil 3.30. 20ng/ml IGF-1 uygulanmış kuyucuk görüntüsü

(Bar=100μm-20X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

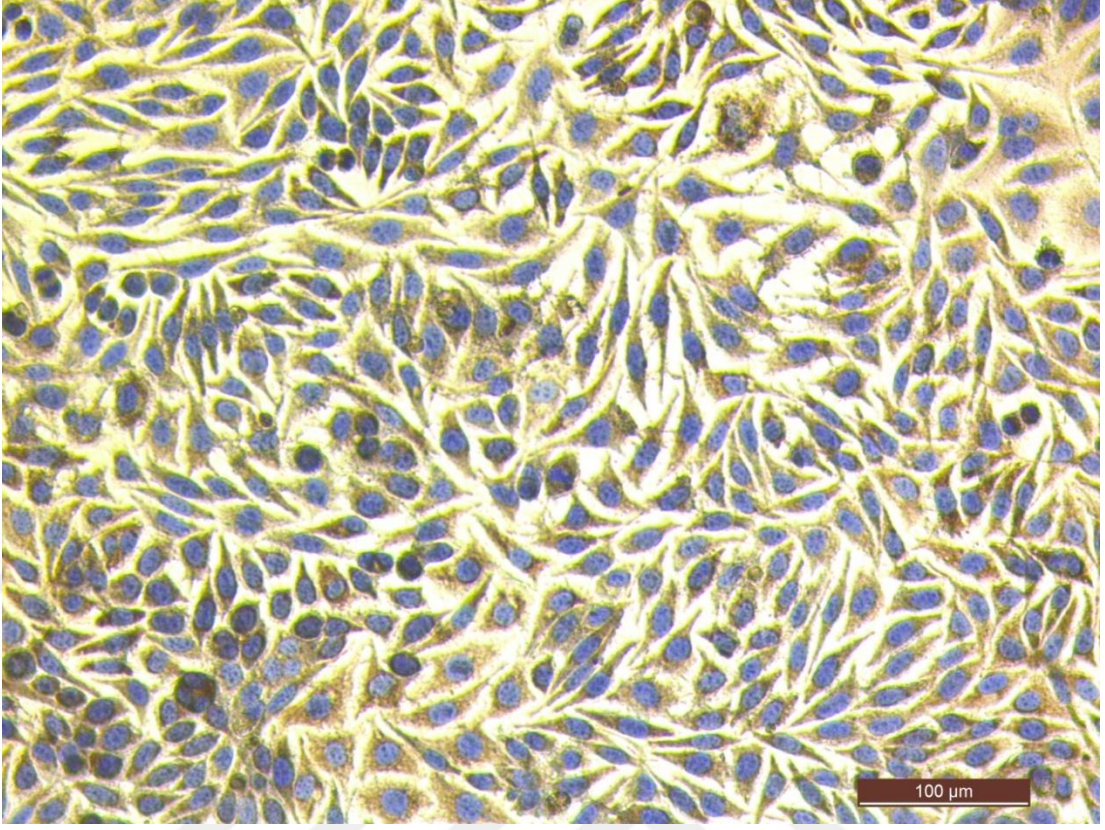
20ng/ml IGF-1 uygulanan kuyucuklarında, hücrelerin sitoplazmaları içerisinde kahverengi olarak boyanmış kollajen tip-1 proteinlerinin kontrol grubuna kıyasla daha az olduğu ve hücre morfolojisinin bozulmaya doğru gittiği görülmüştür.



Şekil 3.31. 10ng/ml IGF-1 uygulanmış kuyucuk görüntüsü

(Bar=100µm-20X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

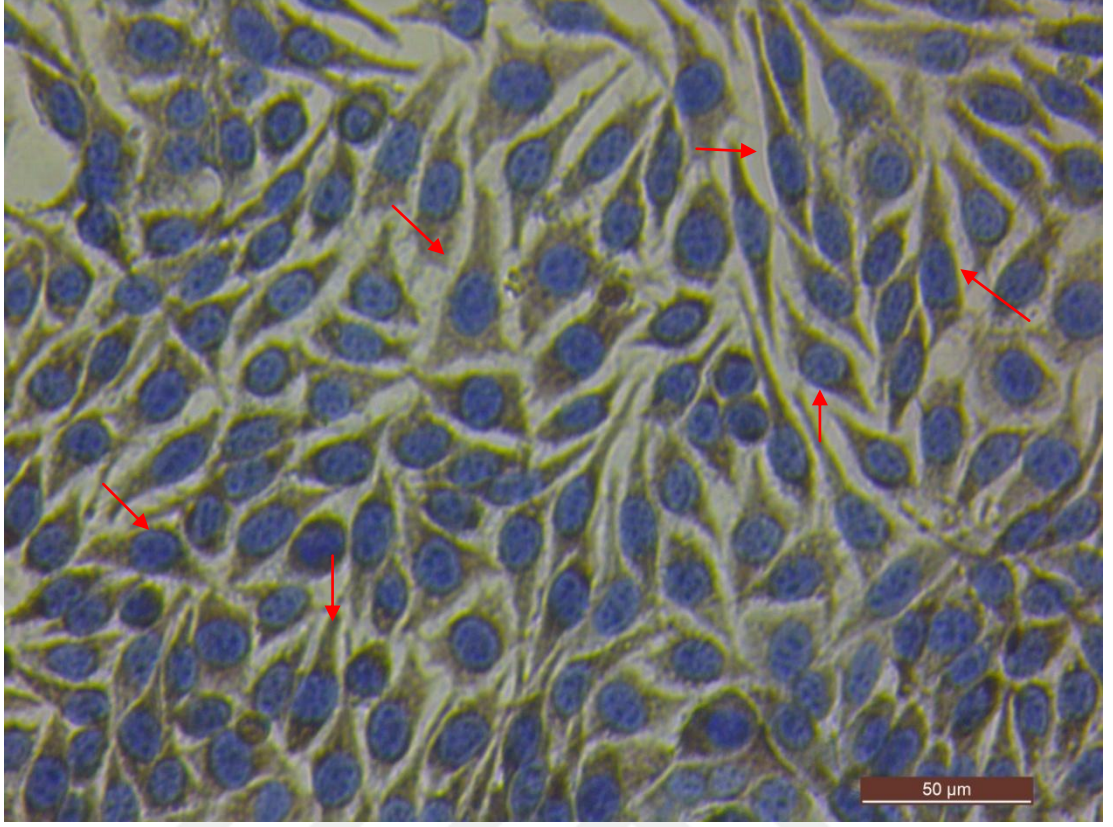
10ng/ml IGF-1 uygulanan kuyucuklarında, hücrelerin sitoplazmaları içerisinde kahverengi olarak boyanmış kollajen tip-1 proteinlerinin kontrol grubuna kıyasla daha yoğun olduğu görülmüştür.



Şekil 3.32. 5ng/ml IGF-1 uygulanmış kuyucuk görüntüsü

(Bar=100μm-20X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

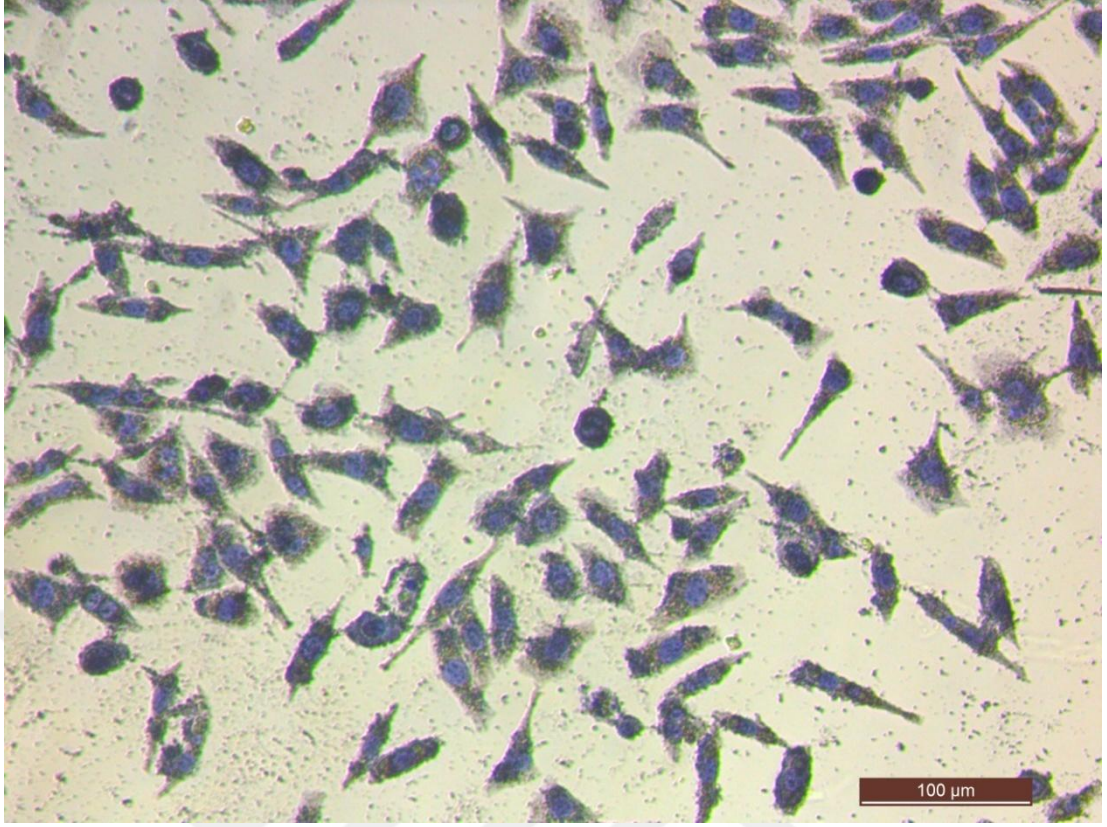
5ng/ml IGF-1 uygulanan kuyucuklarında, hücrelerin sitoplazmaları içerisinde kahverengi olarak boyanmış kollajen tip-1 proteinlerinin kontrol grubuna ve 20ng/ml IGF-1 konsantrasyonu uygulanan kuyucuktaki hücrelere kıyasla daha yoğun olduğu görülmüştür.



Şekil 3.33. 5ng/ml IGF-1 uygulanmış kuyucuk görüntüsü

(Bar=50μm-40X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

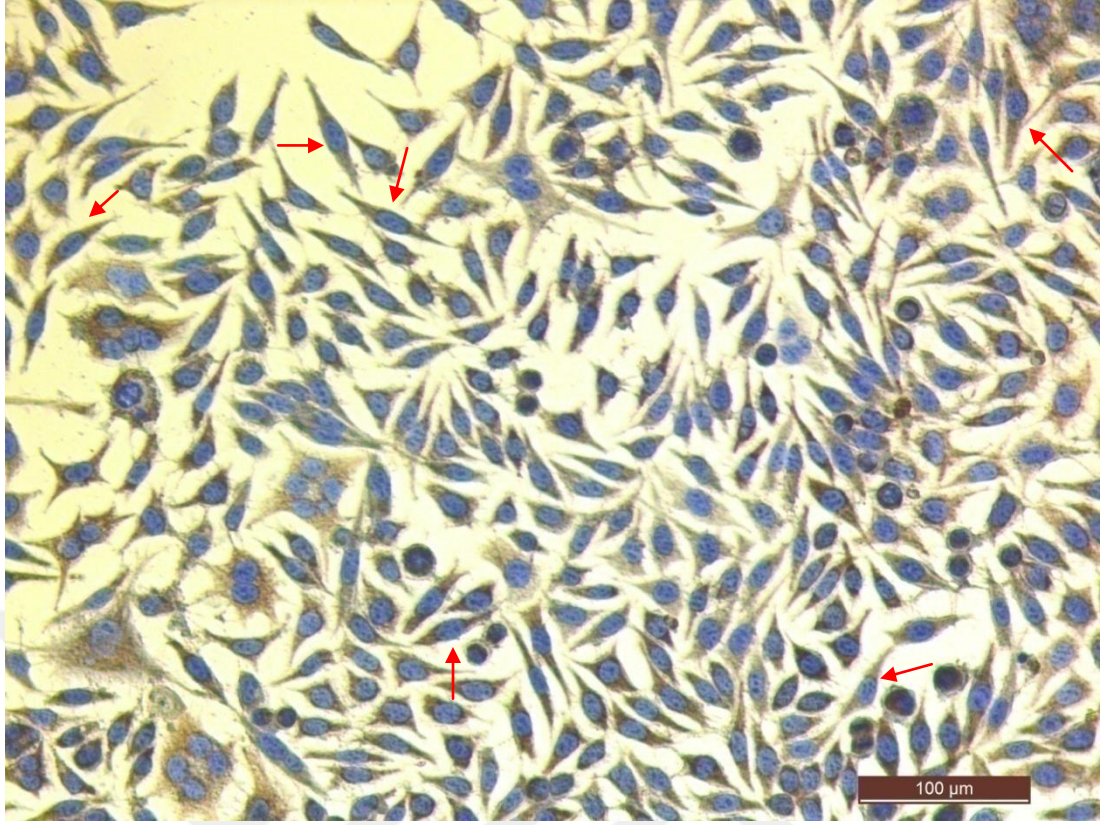
Elde edilen mikroskop görüntüleri karşılaştırıldığında, 5ng/ml IGF-1 konsantrasyonu uygulanan hücreler ile 10ng/ml IGF-1 konsantrasyonu uygulanan hücrelerin yakın düzeyde protein sentezi gerçekleştirdikleri düşünülmüştür.



Şekil 3.34. 20ng/ml EGF uygulanmış kuyucuk görüntüsü

(Bar=100µm-20X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

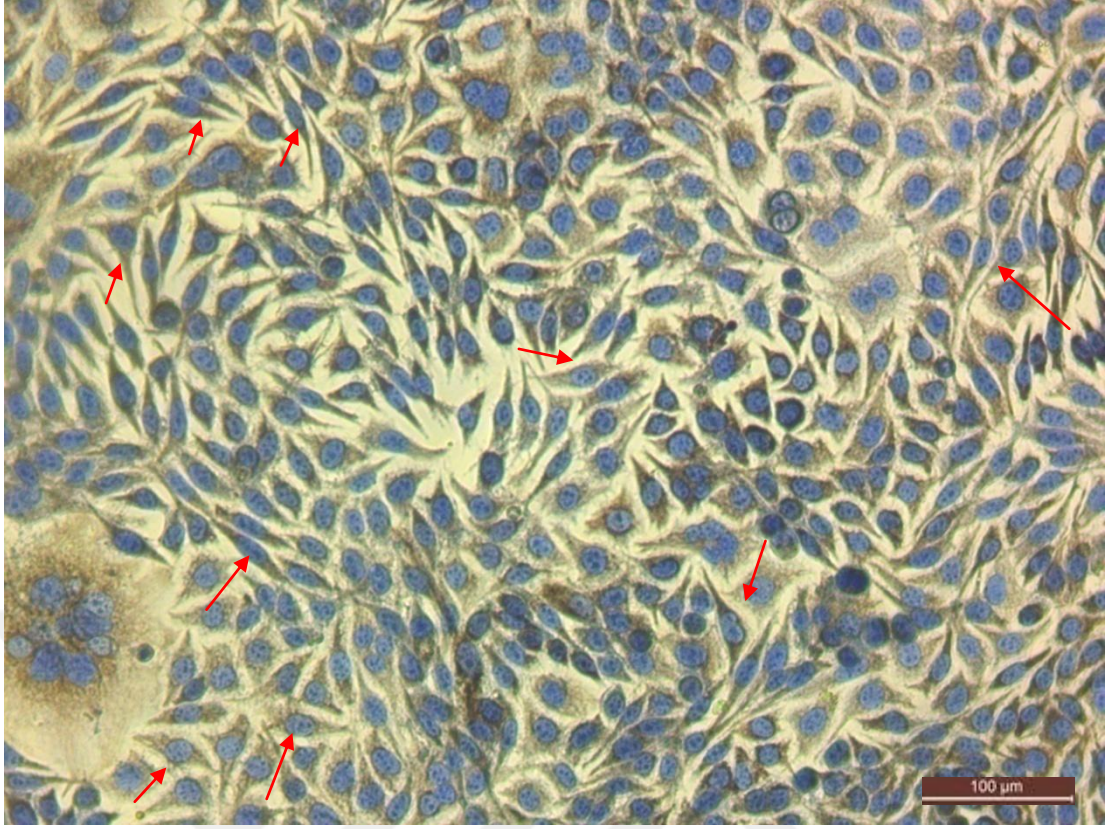
20ng/ml EGF uygulanan kuyucuklarında, hücrelerin sitoplazmaları içerisinde kahverengi olarak boyanmış kollajen tip-1 proteinlerinin neredeyse görülmediği, aynı zamanda hücre morfolojilerinin bozulmuş oldukları görülmüştür.



Şekil 3.35. 10ng/ml EGF uygulanmış kuyucuk görüntüsü

(Bar=100μm-20X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

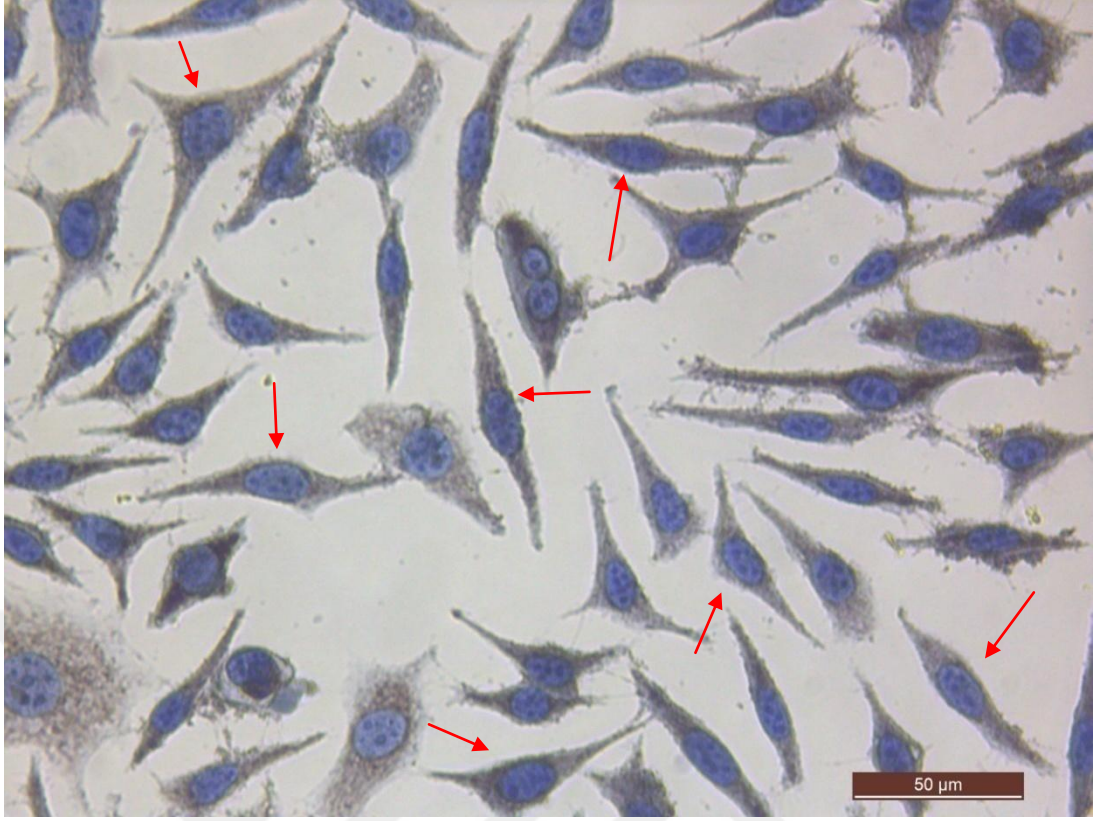
10ng/ml EGF uygulanan kuyucuklarında, hücrelerin sitoplazmaları içerisinde kahverengi olarak boyanmış kollajen tip-1 proteinlerinin kontrol grubuna ve 20ng/ml EGF konsantrasyonu uygulanan kuyucuktaki hücelere kıyasla daha yoğun olduğu görülmüştür.



Şekil 3.36. 5ng/ml EGF uygulanmış kuyucuk görüntüsü

(Bar=100μm-20X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir)

Elde edilen mikroskop görüntüleri karşılaştırıldığında, 5ng/ml EGF konsantrasyonu uygulanan hücreler ile 10ng/ml EGF konsantrasyonu uygulanan hücrelerin yakın düzeyde protein sentezi gerçekleştirdikleri düşünülmüştür. Ancak hücre proliferasyonunun 5ng/ml EGF konsantrasyonu uygulanan kuyucuklarda daha çok arttığı da görülmüştür.



Şekil 3.37. 5ng/ml EGF uygulanmış kuyucuk görüntüsü

(Bar=50μm-40X büyütmede Leica Inverted mikroskop ile görüntülenmiştir.)

40X büyütme ile elde edilen hücre görüntüsünde, 5ng/ml EGF konsantrasyonu uygulanan kuyucuklardaki hücrelerin protein sentezini yoğun bir şekilde gerçekleştirdiği ve çekirdek ve hücre yapılarının normal olduğu görülmüştür.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Literatürde, IGF-1'in ve EGF'nin kollajen sentezi üzerinde tetikleyici potansiyelinin yüksek olduğuna dair yayınlara rastlanmaktadır [8]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda EGF'nin yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir [9]. EGF'nin sistemik yoldan uygulanması ile ilgili yapılan çalışmalarda epitelizasyonu ve granülasyon dokusu oluşumunu ve de yeni damar oluşumunu uyarak yara iyileşmesini hızlandırdığını bildirilmiştir. Farklı yara modellerinde EGF'lerin etkilerini araştıran birçok çalışma yapılmıştır [16]. EGF, her gün topikal uygulandığında, tavşan kulağı yara modeli, split-thickness epidermal yaralar ve parsiyel kalınlıktaki yanıkların epitelizasyonunu arttırmıştır. Kobaylarda, EGF ile desteklenen yaralarda, desteklenmeyenlere oranla, daha fazla kollajen ve glikozaminoglikan toplandığı, ayrıca selülaritenin arttığı gösterilmiştir [21]. Diyabetik kobaylarda, EGF desteği, kollajen birikimini hızlandırmıştır. EGF, sistemik uygulanan metilprednizolon'un yara iyileşmesini geciktirici etkisini geri döndürebilmiştir [22, 25, 27]. Yapılan bir diğer çalışmada, EGF uygulamasının 7. gününde intussepsis anjiyogenesisin belirgin düzeyde arttığı tespit edilmiştir [28].

IGF-1 de çeşitli hayvan modellerinde incelenmiş; kobay kulağındaki yaraya topikal uygulanımı sonrası epitelizasyonu hızlandırdığı gösterilmiştir. Kobaylara yapılan subkütan enjeksiyon ile hücre sayısı ve kollajen içeriği artmıştır [35]. IGF-1; farelerde enfeksiyon ve diyabetin neden olabileceği yara iyileşmesi sorunlarına olumlu etki göstermiştir. Tavşan kulağı modelinde epitelizasyon hızını arttırdığı saptanmıştır. Farelere yerleştirilen subkütan süngerlere her gün IGF-1 enjekte edilmiş ve enjeksiyon yapılmayanlara oranla, yapılanlarda, tedavinin 7. gününde hücre miktarında ve kollajen içeriğinde artma saptanmıştır. Farelerdeki insizyonel yaralanmalara kollajen vehikül içinde IGF-1 uygulandığında, 7 hafta sonunda, kontrollere oranla, yara iyileşmesi daha belirgin olarak saptanmıştır [21, 38]. Radyasyon uygulanmış kobaylardaki insizyonel yaralar, kollajen vehikül içinde IGF-1 ile desteklendiğinde, 7 ve 12. günlerde, yaranın sağlamlığında belirgin artma olduğu gösterilmiştir [39].

Diyabetik farelerde eksizyonel yaralar, IGF-1'in topikal uygulanımı ile desteklendiğinde daha hızlı kapanmıştır [42].

Yapılan bu çalışmada, doku rejenerasyonu sağladığı gösterilmiş büyüme faktörlerinin (EGF, IGF-1) insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksitesisi, proliferasyon hızına etkisi ve özellikle kollajen tip-1 sentezi üzerindeki etkisi araştırıldı. Sitotoksitenin ve hücre proliferasyonunun belirlenmesi için WST-1 ve İkili boyama metodları uygulandı. Elde edilen sonuçlara göre, EGF'nin 20ng/ml konsantrasyonunun insan dermal fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği ve bunun sonucu olarak, 48 saat sonunda kontrol grubuna göre, hücre canlılığı üzerinde % $3,61 \pm 0,30$ azalmaya sebep olmuştur. Ayrıca elde edilen 2 ayrı analiz neticesinde proliferasyon hızını % $45,82 \pm 0,40$ oranında en çok artıran ve bununla beraber en az nekrotik hücre oluşumunu sağlayan büyüme faktörünün; EGF'nin 5ng/ml konsantrasyonu olduğu tespit edilmiştir.

IGF-1 uygulanmış hücreler üzerinde yapılan gerek WST-1 gerekse ikili boyama analizlerinde elde edilen sonuçlar neticesinde, en yüksek hücre canlılığının 5ng/ml konsantrasyonunda olduğu bulgusuna ulaşılmıştır. IGF-1'in 5ng/ml konsantrasyonunun, kontrol grubuna kıyasla % $37,84 \pm 0,30$ daha fazla hücre proliferasyonunu artırdığı gözlemlenmiştir.

DAB kromojen boyama metodu ile yapılan immünotokimya analizinde; büyüme faktörü uygulanan hücrelerde, pozitif kontrol grubuna kıyasla kollajen tip-1 sentezinin daha fazla olduğu gözlemlendi. Büyüme faktörü uygulanmış hücreler arasında; en fazla proliferasyon artışını ve kollajen tip-1 sentezini EGF'nin 5ng/ml konsantrasyonunun gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır.

Yapılan diğer çalışmalara paralel olarak bu araştırmada da büyüme faktörlerinin kollajen sentezinde ve hücre proliferasyonunda etkin olduğu gösterilmiştir. Kollajen sentezi yönünden incelendiklerinde en yüksek etkiyi EGF'nin gösterdiği izlenirken, IGF-1'in de aynı konsantrasyonlarında benzer etki gösterdiği gösterilmiştir. Deri rejenerasyonunda kullanılan büyüme faktörü konsantrasyonlarının doğru ayarlanmadığı takdirde toksik etki yaratarak hücre

ölümlerine sebep olacağı da EGF'nin uygulanan yüksek konsantrasyonlarında tespit edilerek gösterilmiştir.



KAYNAKLAR

- [1] Teli, A., Regulation of cellular functions by extracellular matrix. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2 (10): 83–87, 1992.
- [2] Rhee, S., Grinnell, F., Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (13): 1299-1305, 2007.
- [3] Mays, P.K., et al., Age-related changes in the proportion of types I and III collagen. *Mech. Ageing Dev.* 45 (3): 203–212, 1988.
- [4] Mehta, R.C., Fitzpatrick, R.E., Endogenous growth factors as cosmeceuticals. *Dermatol. Ther.* 20 (5): 350–359, 2007.
- [5] Nigel, P.B., Inherited diseases of collagen, elastin and keratin. *Medicine.* 33 (1): 83–86, 2005.
- [6] Cutroneo, K.R., How is Type I procollagen synthesis regulated at the gene level during tissue fibrosis. *J. Cell. Biochem.* 90 (1): 1–5, 2003.
- [7] Orgel, J.P., et al., Molecular and structural mapping of collagen fibril interactions. *Connect. Tissue Res.* 52 (1): 2–17, 2011.
- [8] Baserga, R., et al., The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1332 (3): 105–126, 1997.
- [9] Türsen, Ü., Deri yaşlanmasının topikal ajanlarla önlenmesi. *Dermatose.* 5 (4): 267-283, 2006.
- [10] Nimni, M.E., The molecular organization of collagen and its role in determining the biophysical properties of the connective tissues. *Biology.* 17, 51-82, 1980.

- [11] Teli, A., Regulation of cellular functions by extracellular matrix. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2 (10): 83–87, 1992.
- [12] Myllyharju, J., Kivirikko, K.I., Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 20, 33-43, 2004.
- [13] Koch, M., et al., $\alpha 1$ (XX) collagen, a new member of the collagen subfamily, fibril-associated collagens with interrupted triple helices. *J. Biol. Chem.* 276, 23120-6, 2001.
- [14] Amcto, R.S., et al., Repair and regeneration in andersons pathology. St. Louis Mosby, Missouri. 10, 160-175, 1996.
- [15] Ganong, W.F., Rewiev of medical physiology. Prentice-Hall International Inc., San Fransisco, 44-56, 1995.
- [16] Cohen, S., The epidermal growth factor (EGF). *Cancer.* 51, 1787-1791, 1983.
- [17] Cohen, S., The stimulation of epidermal proliferaton by a spesific protein. *Dev. Biol.* 12, 394-407, 1965.
- [18] Dibiasse, M.D. Rhodes, C.T., The design of analytical methods for use in topical epidermal growth factor product development. *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 553-558, 1991.
- [19] Erbaş, D., Epidermal growth factor. *Gazi Üniv. Tıp Fak. Der.* 1, 30-34, 1990.
- [20] Carpenter, G., Epidermal growth factor. *Handbook Ex. Pharmac.* 57, 89-123, 1981.
- [21] Erbaş, D., et al., Submandibuler bez Ekstresinin yara iyileşmesine olan etkisi. *Gazi Üni. Diş. Hek. Fak. Der.* 5 (2): 139-147, 1988.

- [22] Bhora, F.Y., et al., Effect of growth factors on cell proliferation and epithelization in human skin. *J. Res. Surg.* 59 (2): 236-244, 1995.
- [23] Dijke, P., Iwata, K.K., Growth factors for wound healing. *Biotechnology.* 7, 793-798, 1989.
- [24] Ekmekçi, A., Erbaş, D., Kanserin moleküler mekanizması. Onkojenler ve Büyüme Faktörleri. T.D.F.D. Ankara, 1991.
- [25] Babül, A., et al., EGF accelerates mice skin wound healing. *Pharm. Technol. Symp. IPTS-96*, Ankara, 1996.
- [26] Cellini, M., et al., Epidermal growth factor in the topical treatment of herpetic corneal ulcers. *Ophthalmological.* 208, 37-40, 1994.
- [27] Çelebi, N., et al., Effects of epidermal growth factor dosage forms on dermal wound strength in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 386-387, 1994.
- [28] Kılıçaslan, S.M.S., Coşkun, C.Ş., et al., Ultrastructural changes in blood vessels in epidermal growth factor treated experimental cutaneous wound model. *Pathology-Research and Practise*, 209 (11): 710-715, 2013.
- [29] Nugent, M.N., Iozzo, R.V., Fibroblast growth factor-2. *I.J.B.C.B.*, 32, 115-120, 2000.
- [30] Vemuri, S., et al., The stability of bFGF against thermal denaturation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 481-486, 1994.
- [31] Wang, Y.J., et al., Characterization stability and formulations of basic fibroblast growth factor. 141-180. *Formulation and Characterization and Stability of Protein Drugs*. New York, 1996.

- [32] Gospodarowicz, D., Isolation and characterization of acidic and basic fibroblast growth factor. *Methods Enzymol.*, 147, 106-119, 1987.
- [33] Vermynen, J., et al., Roles of platelet activation and fibrin formation in thrombogenesis. *J.A.C.C.*, 8: 2B-9B, 1986.
- [34] Bowen-Pope, et al., Platelet-derived growth factor in vivo. Levels Activity and Rate of Clearance Blood. 64, 458-469, 1984.
- [35] Falanga V., Growth factors and wound healing, *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 19, 711-714, 1993.
- [36] Uutela, M., et al., Chromosomal location, exon structure and vascular expression patterns of the human PDGF-C and PDGF-D genes. *Circula.* 103, 2242-7 , 2001.
- [37] Heldin, C.H., Westermark, B., Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Phs. Rev.*, 79, 1283-1316, 1999.
- [38] Bhora, F.Y., et al., Effect of growth factors on cell proliferation and epithelization in human Skin. *J. Res. Surg.* 59 (2): 236-244, 1995.
- [39] Dijke, P., Iwata, K.K., Growth factors for wound healing. *Biotechnology.* 7, 793-798, 1989.
- [40] Bhora, F.Y., et al., Effect of growth factors on cell proliferation and epithelization in human skin. *J. Res. Surg.* 59 (2): 236-244, 1995.
- [41] Aral, İ.L., et al., Epidermal büyüme faktörü (EGF)'nin deri allogrefleri üzerine olan etkilerinin histopatolojik olarak araştırılması. *Gazi Üniv. Diş Hek. Fak. Der.* 12 (1): 47-53, 1995.

- [42] Lawrence, W.T., Diegelmann, R.F., Growth factors in wound healing. *Clinics In Dermatology*. 12, 157-169, 1994.
- [43] Laato, M., et al., Epidermal growth factor prevents methylprednisolone induced inhibition of wound healing. *J. Surg. Res.* 17, 354-359, 1989.
- [44] Brown, G.I., et al., Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N. Engl. J. Med.* 321, 76-79, 1989.
- [45] Brown, G.L., et al., Stimulation of healing of chronic wounds by epidermal growth factor. *Plast. Reconst. Surg.* 88, 18-196, 1991.
- [46] McGee, G.S., et al., Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J. Surg. Res.* 45, 145-153, 1988.
- [47] Robson, M.C., et al., The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores. *Ann. Surg.* 216, 401-406, 1992.
- [48] Ulubayram, K., et al., EGF containing gelatin-based wound dressings. *Biomaterials*. 22, 1345-1356, 2001.
- [49] Heldin, C.H., Westermark, B., Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Phs. Rev.*, 79, 1283-1316, 1999.
- [50] Falanga V., Growth factors and wound healing, *J Dermatol Surg. Oncol.*, 19, 711-714, 1993.
- [51] Nimni, M.E., Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials*. 18, 1201, 1997.

- [52] Kaltalıoğlu K., Coşkun C.Ş., PDGF supplementation alters oxidative events in wound healing process: a time course study. *Arch. Dermatol.* 305 (5): 415-422, 2013.
- [53] Laato, M., et al., Epidermal growth factor prevents methylprednisolone induced inhibition of wound healing. *J. Surg. Res.* 17, 354-359, 1989.
- [54] Bellamy C.O.C. et al., Cell death in health and disease. The Biology and Regulation of Apoptosis. *Seminar In Cancer Biol.* 6, 3-16, 1995.
- [55] Ellis, R.E. et al., Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 663-698, 1991.
- [56] Vaux D.L., Korsmeyer S.J., Cell death in development. *Cell.* 96, 245-254; 1999.
- [57] Hughes F.M., Gorospe W.C., Biochemical identification of apoptosis in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology.* 129 (5): 2415- 2422, 1991.
- [58] Kannan K., Jain S.K., Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology.* 7 (27): 153-163, 2000.
- [60] Smaili S.H., et al., Mitochondria in Ca⁺² signaling and apoptosis. *J. Bioener and Biomem.* 32 (1): 35-46, 2000.
- [61] Chazotte, B., Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harb.* 10, 11-21, 2011.
- [62] Freshney, R.I., The culture of animal cells. 158-161. *A Manual Of Basic Technique*, 4th ed., New York, 2000.

- [63] Berridge, M.V., et al., Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. 11, 127-152, 2005.
- [64] Wang, S. et al., Micro-a-fluidics ELISA for rapid CD4 cell count at the point-of-care. *Sci. Rep.* 4, 3796, 2014.

