



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**FARKLI HÜCRE HATLARINDA
TIBBİ SÜLÜK SALGI EKSTRAKTININ
İN VİTRO ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

NIHAN TIRIK

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2022



**FARKLI HÜCRE HATLARINDA TIBBİ SÜLÜK SALGI EKSTRAKTININ
İN VİTRO ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nihan TIRIK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nihan TIRIK

01.07.2022

FARKLI HÜCRE HATLARINDA TIBBİ SÜLÜK SALGI EKSTRAKTININ İN VİTRO ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Nihan TIRIK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2022

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda tıbbi sülük salgısının hücre canlılığı, yara iyileşmesi, apoptoz ve bu etkilerden sorumlu gen ekspresyonlarını incelemek amaçlandı. **Yöntem:** Çalışmamızda *Hirudo verbana* cinsi steril tıbbi sülüklerden sağım yöntemi ile sülük salgısı elde edildi. Bu salgıdan total protein konsantrasyonu tayin edilerek, seri dilüsyon ile doz miktarları (400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml ve 50 µg/ml) ayarlandı. Bu çalışmada insan göbek kordon veni endotel hücresi (HUVEC-CRL-1730), meme fibroblast (HTB-125) ve mezenkimal kök hücre (PCS-500-012) hattı kullanıldı. Hücre kültürü ile üretilen hücreler üzerine belirlenen dozlarda sülük salgısı uygulandı. Hücre canlılığı ve proliferasyonun değerlendirilmesi için MTT testi yapıldı. Sülük salgısının yara iyileşmesi üzerine etkisi in vitro yara modeli ile değerlendirildi. Farklı dozlarda sülük salgısı uygulanan hücrelerdeki VEGF, EGF ve FGF gen ekspresyon tayininde RT-PCR yöntemi kullanıldı. Sülük salgısının apoptozis üzerine olası etkisi flow sitometri ile araştırıldı. **Bulgular:** Hücre proliferasyonu açısından, sülük salgısının farklı dozları uygulanan meme fibroblast hücre hattındaki hücre canlılığı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,001$). İn vitro yara modeli uygulamasında tüm hatlarda 50 µg/ml dozunun 24. veya 48. saatte tüm alanları hücreler ile kapattığı gözlemlendi. RT-PCR analizinde, 200 µg/ml'lik sülük salgısı uygulanan HUVEC ve meme fibroblast hücre hatlarında EGF ve VEGF gen ekspresyon düzeylerinin kontrol ve diğer dozdaki gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,001$). Flow sitometri analizinde HUVEC ve meme fibroblast hücre hattında %100'e yakın hücre canlılık oranları gözlemlenirken mezenkimal kök hücre hattında ise nekroz olduğu tespit edildi. **Sonuç:** Farklı dozlardaki sülük salgısı uyguladığımız sağlıklı hücre hatlarında hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, yara iyileşmesi ve anjiyogenez için gen ekspresyonu üzerine önemli etkileri olduğu bulundu.

Bilim Kodu : 1090
Anahtar Kelimeler : Sülük salgı ekstraktı, Yara iyileşmesi, Anjiyogenez, Apoptoz, Proliferasyon
Sayfa Adedi : 83
Danışman : Doç. Dr. Kübranur ÜNAL

INVESTIGATION OF IN VITRO EFFECT OF MEDICAL LEECH SALIVA EXTRACT ON VARIOUS CELL LINES

(M. Sc. Thesis)

Nihan TIRIK

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

July 2022

ABSTRACT

Objective: In our study, it was aimed to examine the cell viability, wound healing, apoptosis and possible gene expressions responsible for these effects of medicinal leech secretion. **Method:** In our study, leech saliva was obtained from sterile medicinal leeches of *Hirudo verbana* genus by milking method. By determining the total protein concentration from this secretion, dose amounts (400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml and 50 µg/ml) were adjusted by serial dilution. In this study, human umbilical cord vein endothelial cell (HUVEC-CRL-1730), Breast fibroblast (HTB-125) and esenchymal stem cell (PCS-500-012) lines were used. The certain doses of leech secretion have been applied on cells produced in cell culture. MTT test was used to evaluate cell viability and cell proliferation. The effect of leech saliva extract on wound healing was evaluated with the in vitro wound model. RT-PCR method was used for VEGF, EGF and FGF gene expression determination in cells treated with leech saliva at different doses. The possible effect of leech saliva on apoptosis was investigated by flow cytometry. **Results:** In terms of cell proliferation, cell viability in Breast fibroblast cell lines applied with different doses of leech saliva was found to be significantly higher than in the control group ($p<0.001$). In in vitro wound model assay, it was observed that 50 µg/ml dose covered all areas with cells at 24 or 48 hours in all cell lines. In RT-PCR analysis, EGF and VEGF gene expression levels were found to be significantly higher in HUVEC and Breast fibroblast cell lines treated with 200 µg/ml leech secretion compared to control and other dose groups ($p<0.001$). In the flow cytometry analysis, cell viability rates close to 100% were observed in HUVEC and Breast fibroblast cell lines, while necrosis was detected in the Mesenchymal stem cell line. **Conclusion:** In this study, it was found that leech saliva applied at different doses had significant effects on cell viability, cell proliferation, wound healing and gene expression for angiogenesis.

Science Code : 1090
Key Words : Leech saliva extract, Wound healing, Angiogenesis, Apoptosis, Proliferation
Page Number : 83
Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Kübranur ÜNAL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince benden bilgi ve desteklerini esirgemeyen, tez danışmanım Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda görev yapan Doç. Dr. Kübranur ÜNAL'a şükran ve saygılarımı sunarım.

Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü AR-GE Laboratuvarlarında tez çalışmalarımı yapmam için izin veren ve desteklerini esirgemeyen AR-GE Merkez Başkanı Prof.Dr. Ali ALBAY, Kök Hücre Araştırma Birimi sorumlusu Prof. Dr. Mehmet ÖZLER ve Moleküler Araştırma Birimi sorumlusu Dr Öğretim üyesi Tuğrul HOŞBUL'a şükran ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, deneysel aşamalarda özverileri ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli Biyolog arkadaşlarım Mualla Pınar ELÇİ, Tuğba FATSA ve Sema ÖREN'e çok teşekkür ederim. Çalışmamın analiz aşamasında desteğini esirgemeyen Moleküler Biyolog Ömer Faruk KIRLANGIÇ'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın sülük salgı temini kısmında yardımlarını bizden esirgemeyen Dr Öğretim üyesi Hüseyin AYHAN' a teşekkür ederim. Tezimin yazım aşamasında desteğinden ötürü Biyolog Mehmet Emre EROL' a teşekkür ederim.

Görev yapmakta olduğum Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doku Tipleme Laboratuvar sorumlusu Dr. Sait YEŞİLLİK, Dr. Fevzi DEMİREL ve mesai arkadaşım Mustafa KOCAMAN'a desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde desteğini esirgemeyen annem Fatma ABDİK'e sonsuz sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince desteğini her zaman hissettiğim eşim Ömer TIRIK, oğullarım Alper ve Türker'e, sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

TYL-2021-7342 no.lu proje ile tezimi destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tıbbi Sülüklerin Tarihçesi.....	3
2.2. Tıbbi Sülüklerin Genel Özellikleri.....	4
2.2.1. <i>Hirudo verbana</i> 'nın genel özellikleri.....	5
2.3. Tıbbi Sülüklerin Etki Mekanizmaları.....	6
2.4. Tıbbi Sülük Salgısında Bulunan Biyoaktif Maddeler	7
2.5. Tıbbi Sülüklerin Medikal Kullanım Alanları	10
2.6. Tıbbi Sülüklerin Kullanımındaki Komplikasyonlar.....	11
2.7. Yara İyileşmesi.....	12
2.8. Anjiyogenez	12
2.8.1. Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması.....	14
2.8.2. Endotel hücrelerin migrasyonu	14
2.8.3. Endotel hücrelerin proliferasyonu.....	15
2.8.4. Kapiller oluşumu ve endotel hücrelerin olgunlaşması	15
2.9. Bazı Anjiyogenik Faktörlerin Özellikleri.....	16
2.9.1. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)	16

	Sayfa
2.9.2. Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor, EGF)	17
2.9.3. Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor, FGF)	18
2.10. Apoptotik ve Nekrotik Etki	18
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
3.1. Kullanılan Cihazlar	19
3.2. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler	20
3.3. Tıbbi Sülüklerin Temini ve İnceleme	20
3.3.1. Tıbbi sülük salgısının elde edilmesi	21
3.3.2. Tıbbi sülük salgı ekstraktında protein tayini	22
3.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları	24
3.5. Çalışmanın Aşamaları	27
3.5.1. Hücrelerin çözülmesi	27
3.5.2. Hücre kültürünün hazırlanması	27
3.5.3. Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması	28
3.5.4. Hücre sayımı	28
3.5.5. Hücrelerin dondurulup saklanması	29
3.6. Hücre Kültüründe MTT Testi ile Hücre Canlılığı ve Proliferasyonunun Değerlendirilmesi	30
3.6.1. MTT testi	30
3.7. Yara İyileşme Modeli	32
3.8. Real Time PCR(RT-PCR) ile Hücrelerin Farklı Gen Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi:	34
3.8.1. RT-PCR öncesi hücre kültürü	34
3.8.2. mRNA izolasyon prosedürü	35
3.8.3. cDNA sentezi	36
3.8.4. RT-PCR	36
3.8.5. RT-PCR’da kullanılan primerler	37

	Sayfa
3.9. Flow Sitometri ile Apoptoz Testi (Annexin V/ Propidium İyodür Boyaması)...	37
3.10. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	41
4.1. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	41
4.1.1. Tıbbi sülük salgı ekstraktının HUVEC hücre hattı üzerine 24 -48 saat etkisinin MTT testi ile belirlenmesi	41
4.1.2. Tıbbi sülük salgı ekstraktının meme fibroblast hücre hattı üzerine 24-48 saat etkisinin MTT testi ile belirlenmesi.....	42
4.1.3. Tıbbi sülük salgı ekstraktının mezenkimal kök hücre hattı üzerine 24-48 saat etkisinin MTT testi ile belirlenmesi.....	44
4.2. Yara Modelinde Proliferasyonun Belirlenmesi.....	45
4.2.1. Tıbbi sülük salgı ekstraktının HUVEC hücre hattı yara modeli bulguları	46
4.2.2. Tıbbi sülük salgı ekstraktının meme fibroblast hücre hattı yara modeli bulguları	47
4.2.3. Tıbbi sülük salgı ekstraktının mezenkimal kök hücre hattı yara modeli bulguları	49
4.3. RT-PCR Gen Ekspresyonu Bulguları	50
4.3.1. HUVEC hücre hattı RT-PCR sonuçları	50
4.3.2. Meme fibroblast hücre hattı RT-PCR sonuçları	51
4.3.3. Mezenkimal kök hücre hattı RT-PCR sonuçları	53
4.4. Apoptotik Etkinin Belirlenmesi	54
4.4.1. HUVEC hücre hattında flow sitometri sonuçları.....	55
4.4.2. Meme fibroblast hücre hattında flow sitometri sonuçları	56
4.4.3. Mezenkimal kök hücre hattında flow sitometri sonuçları.....	57
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
6.1. Sonuçlar.....	72
KAYNAKLAR	75

Sayfa

ÖZGEÇMİŞ	83
----------------	----

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Sülük salgısında bulunan bazı biyoaktif maddeler ve etkileri.....	7
Çizelge 2.2. Anjiyogenik faktörler, Anjiyogenezi önleyen faktörler	16
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal ve cihazların listesi.....	19
Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler listesi ve marka-modeli.....	20
Çizelge 3.3. Huvec hücre hattına ait bilgiler	24
Çizelge 3.4. Meme fibroblast hücre hattına ait bilgiler	25
Çizelge 3.5. Mezenkimal kök hücre hattına ait bilgiler.....	26
Çizelge 3.6. RT-PCR uygulamasında kullanılan primerler dizisi	37
Çizelge 3.7. Anneksin V / Propidium İyodür saptanma sonuçları	39
Çizelge 4.1. HUVEC hücre hattına ait MTT absorbands sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması	42
Çizelge 4.2. Meme fibroblast hücre hattına ait MTT absorbands sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması	43
Çizelge 4.3. Mezenkimal kök hücre hattına ait MTT absorbands sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması	45
Çizelge 4.4. HUVEC hücre hattında RT-PCR gen ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması	51
Çizelge 4.5. Meme fibroblast hücre hattında RT-PCR gen ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması	52
Çizelge 4.6. Mezenkimal kök hücre hattında RT-PCR gen ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması	53
Çizelge 4.7. HUVEC hücre hattına ait flow sitometri sonuçlarının yüzde ifadeleri	55
Çizelge 4.8. Meme fibroblast hücre hattına ait flow sitometri sonuçlarının yüzde ifadeleri.....	56
Çizelge 4.9. Mezenkimal kök hücre hattına ait flow sitometri sonuçlarının yüzde ifadeleri.....	57

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bazı tıbbi sülük türleri.....	5
Şekil 2.2. <i>Hirudo verbana</i> 'nın görünüşü	6
Şekil 2.3. Anjiyogenez oluşum basamakları	13
Şekil 3.1. Sülüklerin beslenmesi.....	22
Şekil 3.2. Sülük salgı protein standart grafiği	24
Şekil 3.3. HUVEC hücre hattı görüntüsü	25
Şekil 3.4. Meme fibroblast hücre hattı görüntüsü	26
Şekil 3.5. Mezenkimal kök hücre hattı görüntüsü	27
Şekil 3.6. İnvert mikroskop ve Thoma lamı görüntüsü	29
Şekil 3.7. MTT'nin kimyasal yapısı	30
Şekil 3.8. MTT testinin yapılaş şeması	32
Şekil 3.9. Yara iyileşme testinin prosedürü ve testin temel adımları	33
Şekil 3.10. Yara kapanmasının % hesaplaması	34
Şekil 3.11. Canlı hücrelerin ve apoptotik hücre popülasyonlarının belirlenmesi.....	38
Şekil 4.1. HUVEC hücre hattına ait 24. ve 48. saatine ait MTT sonuçlarının absorbans grafiği	42
Şekil 4.2. Meme fibroblast hücre hattına ait 24. ve 48. saatine ait MTT sonuçlarının absorbans grafiği	44
Şekil 4.3. Mezenkimal kök hücre hattına ait 24. ve 48. saatine ait MTT sonuçlarının absorbans grafiği	45
Şekil 4.4. İnvert mikroskop ile HUVEC hücre hattında elde edilen yara modeli görüntüleri	46
Şekil 4.5. HUVEC hücre hattında gruplara ait yara iyileşmesi grafiği	47
Şekil 4.6. İnvert mikroskop ile meme fibroblast hücre hattında elde edilen yara modeli görüntüleri.	48
Şekil 4.7. Meme fibroblast hücre hattında gruplara ait yara iyileşmesi grafiği.....	48

Şekil	Sayfa
Şekil 4.8. İnvert mikroskop ile mezenkimal kök hücre hattında elde edilen yara modeli görüntüleri.	49
Şekil 4.9. Mezenkimal kök hücre hattında gruplara ait yara iyileşmesi grafiği	50
Şekil 4.10. HUVEC hücre hattına mRNA gen ekspresyon grafikleri	51
Şekil 4.11. Meme fibroblast hücre hattına ait mRNA gen ekspresyon grafikleri	52
Şekil 4.12. Mezenkimal kök hücre hattına ait mRNA gen ekspresyon grafikleri	54
Şekil 4.13. HUVEC hücre hattına ait flow sitometri sonuçları	55
Şekil 4.14. Meme fibroblast hücre hattına ait flow sitometri sonuçları	56
Şekil 4.15. Mezenkimal kök hücre hattına ait flow sitometri sonuçları	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine serum albümin
CRL-1730-HUVEC	İnsan göbek kordon veni endotel hücresi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
HTB-125	Meme Fibroblast Hücre Hattı
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
PBS	Fosfat Buffered Saline
PCS-500-012	Mezenkimal Kök Hücre Hattı
RT-PCR	Real Time-PCR
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Son zamanlarda tıbbi sülük salgısı, tıp alanındaki geniş kullanım olanakları nedeniyle bilim alanında dikkatleri çekmiştir. Tıbbi sülüklerin tükürük salgısı 100'den fazla biyoaktif madde içermektedir. Salgının içeriğinde; vazodilatörler, bakteriyostatikler, analjezikler, anti-inflamatuvar ve antikoagulant maddeler bulunmakta olup mikrosirkülasyon bozukluklarında, organ ve dokuların hasarlı vasküler permeabilitesinde, hipoksiyi düzeltmede, kan basıncını düzenlemede, immunitiyi arttırmada ve ağrı olaylarını gidermede görev alabilirler [1].

Bu maddeler arasında; hirudin, destabilaz, calin, hirustasin, bdellin, eglin, hyaluronidaz, triptaz inhibitörü, faktör Xa inhibitörü, kollajenaz, asetilkolin, kompleman inhibitörleri, karboksipeptidaz A inhibitörleri, histamin benzeri maddeler ve anestezik maddeler yer almaktadır [2, 3]. Bu maddeler sayesinde tıbbi sülük salgısı canlıların dokularında çeşitli etkiler göstermektedir. Bu olumlu etkiler şu şekilde sıralanabilir: tükürük bezinden salgılanan hirudin; kanın pıhtılaşmasını önlemektedir. Destabilaz; damarlarda trombolitik aktivite göstererek pıhtılaşmayı önler ve kan damarlarında kan akışının rahat bir şekilde devam etmesini sağlar. Calin; trombosit agregasyonunu inhibe etmekten sorumludur. Hirustasin; triptin ve kimotriptin gibi maddelerin inhibe edilmesini sağlamaktadır [4]. Bdekin ve eglin; anti-inflamatuvar etki göstererek iltihap oluşumunu engellenmesinden sorumludurlar. Hyaluronidaz; antibiyotik benzeri bir etki göstermektedir. Triptaz inhibitörü; mast hücrelerinin sahip olduğu proteolitik enzimlerin inhibe edilmesini sağlamaktadır. Faktör Xa inhibitörleri; moleküller olarak yoğunlukları aynı olan komplekslerin oluşmasını sağlayarak pıhtılaşma faktörü Xa'nın inhibe edilmesine neden olmaktadır. Eglin C; potansiyel bir terapötiktir. Kollajenaz; kollajen sentezinin azaltılmasına neden olmaktadır. Asetilkolin; kan damarlarının genişlemesini sağlayarak kan akışının normal şekilde devam etmesini sağlamaktadır. Kompleman inhibitörleri; doğal komplemanların yardımcı ve tamamlayıcı inhibitörlerdir. Karboksipeptidaz A inhibitörleri ve histamin benzeri maddeler; sülüklerin ısırıkları bölgede kan akışının daha fazla olmasına yol açmaktadır. Anestezik maddeler ise; sülüklerin ısırıkları bölgede acı hissinin azaltılmasını sağlamaktadır [3, 5]

Günümüzde sülüklerin kendisi veya salgılarıyla çok çeşitli bilimsel çalışmalar yürütülmekte olup bunlardan bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar elde edilmektedir [1]. Rusya'da sülüklerden elde edilen ve antitrombotik özellikteki Piyavit'in kullanımına

1993'te izin verilmiştir [6, 7]. Bunun yanı sıra Hirudin (Transgeen-Fransa), Eglin (CIBA/Geigy-İsviçre), Gelin (EuroBioPharm-Hollanda), Ghilanten (Merrel Dow Research Inst.- USA) ve Orgelase (Biopharm-İngiltere) gibi ilaçlar da firmalar tarafından üretilmektedir [8].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tıbbi Sülüklerin Tarihçesi

Sülükler, Annelida'nın Hirudinea sınıfında yer alan, predatör olarak beslenen ve yaklaşık 650'den fazla türü bulunan canlı grubudur. Moleküler tekniklerin gelişmesiyle her geçen gün yeni sülük türleri bulunmakta hatta isimlerinde değişiklikler olmaktadır [9]. Sülüklerin çok eski zamanlardan beri hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Bu tedavi şekline hirudoterapi denilmektedir[10]. Mısır, Pers, Avrupa, Çin ve Anadolu'nun en eski yazıtlarında hirudoterapiye rastlanmış, Galen ve Avrupalılar tarafından Avicenna olarak adlandırılan İbn-i Sînâ'nın tedavi protokollerinde yer almıştır [10]. İbn-i Sînâ (980-1037), El Kanun Fi't Tıb (Tıbbın Kanunu) isimli eserinde gangren, lepra, yılan zehirlenmelerinde ve mantar hastalıkları gibi birçok hastalığın tedavisinde sülüğün kullanılabileceğini yazmış ve sülükler hakkında çok detaylı bilgiler paylaşmıştır [11].

Sülük kullanımı, Galen (130-201 M.S.)' in Hipokrat'tın (460-370 M.S.) da belirttiği gibi vücuttaki sıvıların dengesizliğinden kaynaklı hastalıkların ortaya çıktığı hipotezine dayandırılmıştır. Suriyeli Dr Laodice ise kanın sülükler aracılığı ile uzaklaştırılmasının hastalıklara neden olan şeytani ruhların vücuttan çıktığına inanmıştır [12].

Tıbbi sülük tedavisi; tamamlayıcı ve bütünleştirici bir tedavi yöntemi olup, insanda hastalıkları tedavi etmede omurgasızların kullanıldığına örnektir. Sülüklerin doğada 600'den fazla türü saptanmış olup sadece 15'i tıbbi sülük olarak sınıflandırılmıştır. On sekizinci yüzyılda, insanlarda terapotik kullanım amacıyla yabani sülüklerin toplanması o kadar yoğundu ki *Hirudo medicinalis*'in orta Avrupa popülasyonları neredeyse yok oldu [13].Sülük tedavisinin durgunluk döneminden sonra, 20. yüzyılın ortalarında, cerrahi ve rekonstrüktif prosedürler, vasküler hastalıklar, artrit ve migren gibi birçok alanda ilk kez kullanılması ile yeniden popüler hale gelmiştir. Uygulanan yeni tedavi sahaları, sülük salgısındaki maddelerin izole edilerek, özelliklerinin araştırılması için merak uyandırmıştır [14].

Sağlık Bakanlığı tarafından 2014 yılında yayımlanan Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği'nde [15]; Türkiye'deki kliniklerde, üretim yerinden veya

işletmelerden temin edilmek şartıyla steril tıbbi sülüklerin (*H. medicinalis* ve *H. verbana*) yasal olarak tedavide kullanımına izin verilmiştir.

Ülkemizde tıbbi sülüklerin ticareti yapılmakta olup, yurt dışına da ihraç edilmektedir. Günümüzde dünyada sülük ihracında Türkiye en önemli paya sahiptir [1]. Yıllık kota, Tarım ve Orman Bakanlığı verilerine göre 2022 yılı için 1500 kg sülük ile sınırlandırılmıştır. Neslinin tükenme tehlikesiyle karşı karşıya kalan tıbbi sülük türlerinden *Hirudo medicinalis* CITES Sözleşmesiyle koruma altına alınmıştır. Ülkemiz tatlı sularında sülük avlanma yasağı, 15 Nisan-15 Haziran tarihleri arasında uygulanırken, bu yasak 1 Mart – 1 Temmuz olarak değiştirilip 2 aydan 4 aya uzatılmıştır [16].

Tıbbi sülük uygulamaları kas-iskelet hastalıklarında, jinekolojik hastalıklarda, kronik cilt hastalıklarında, tromboembolik hastalıklar, variköz venler, KBB hastalıklarında kullanılması önerilir ve uzun yıllardan beri başarıyla uygulanır. Yunan öğretilerine göre sülük tedavisinin etkinliği sülük salgısının çözücü ve aneljezik özelliğine bağlıdır. Bu antienflamatuar, anestejik ve aneljezik etkideki sülük salgısı, kan emerken sülük tarafından vücuda aktarılır [17].

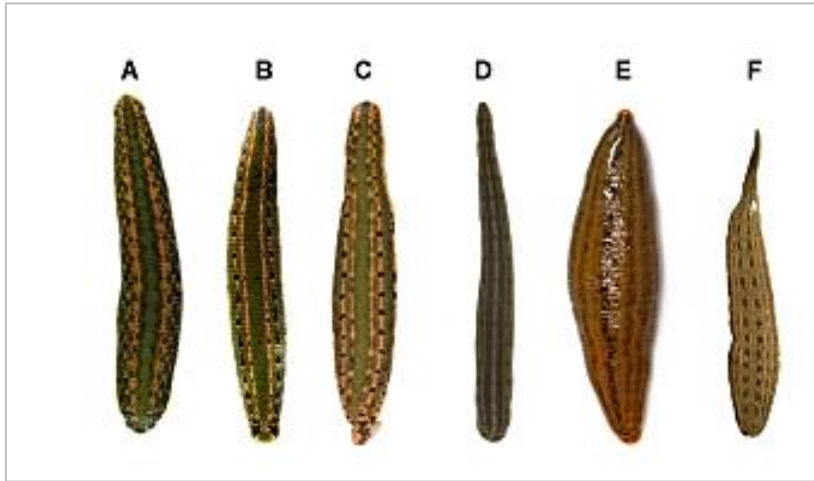
Günümüzde de tam kontrollü laboratuvarlarda steril şartlar altında üretilen sülükler modern tıpta kullanılmaktadır. Modern tıpta sülük ya olduğu gibi canlı olarak veya bunlardan elde edilen ilaçlardan yararlanılarak kullanılmaktadır.

2.2. Tıbbi Sülüklerin Genel Özellikleri

Tıbbi sülükler, Annelida filumu, Clitellata sınıfı ve Hirudinea alt sınıfında yer almaktadır. Dünya üzerindeki 800'ün üzerinde Hirudinea sınıfı üyeleri içinde tıbbi olarak kullanılan yaklaşık 15 tür bulunmaktadır. Ülkemizde doğal habitatlarda bulunan tıbbi sülükler; *Hirudo medicinalis* Linnaeus 1758, *Hirudo verbana* Carena 1820 ve *Hirudo sulukii* n. sp. türleridir [5]. Bazı tıbbi sülük türleri Şekil 2.1'de verilmiştir.

Sülüklerde vücut dorso-ventral olarak yassılaşmıştır. Segmentler anterior ve posteriorde çekmen biçimindedir. Vücutları daima sabit sayıda 34 segmentten oluşur [16]. Ağızlarında her birinde 100 diş bulunan üç çenede toplamda 300 diş bulunmaktadır. Sülüklerde 9., 10. ve 11. segmentler klitellar bölge olup bir erkek bir de dişi üreme organı bulunmaktadır.

Sülükler poikloterm canlılar olup 0 °C ile 30 °C sıcaklık aralığında yaşamlarını sürdürürler. Ani sıcaklık değişimleri bu canlıların ölmesine sebep olmaktadır. Ortam şartlarının uygun olduğu koşullarda erişkin sülük 18-27 yıl kadar yaşayabilir [18]. Sülükler, suda çözünmüş haldeki oksijeni veya atmosferik oksijeni vücut yüzeyinden alarak kullanmaktadırlar. Yaşam ortamlarında bulunan sudaki klor seviyesinin yüksek olması sülüklerin ölümüne neden olmaktadır [5]. Sülükler beslendikten sonra 30-50 gün kadar tok kalabilirler. Sindirim sistemi içinde kan endoenzimler tarafından korunur. Beslenme sonrası kanın sindiriminde ve kokuşmasını önlemede, *Aeromonas hydrophilave* ve *Pseudomonas hirudinia* gibi endosimbiyotik bakteriler görev alır. Ayrıca bu bakterilerden *Aeromonas*, kan ile beslenen hayvanlarda oluşan vitamin B eksikliğini de önlemeye yardımcı olur [19]. Boşaltım sistemi böbreklere benzeyen, nefrit olarak adlandırılan 17 çift organdan meydana gelir. İdrar atılımı Nefridioporlar aracılığı ile sağlanır. Özel bir solunum sistemleri yoktur ve epidermisten solunum yaparlar. Sinir sistemleri bir çift serebroid gangliyon, segmental sinirler, duyu papillaları, 5 çift göz ve birçok termoreseptör ve kemoreseptörden meydana gelmektedir. Sülükler, sudaki titreşimlere, dokunma, ısı, ışık, kuruluk, ses ve kimyasallara karşı duyarlı özelliğe sahiptirler.



Şekil 2.1. Bazı tıbbi sülük türleri [20].(A: *Hirudo verbana* B: *Hirudo medicinalis*, C: *Hirudo orientalis* D: *Hirudo nipponica* E: *Whitmania pigra* F: *Whitmania acranulata*)

2.2.1. *Hirudo verbana*'nın genel özellikleri

Türkiye'deki tıbbi sülük türlerinden olan *Hirudo verbana* 'ya; Balık gölü, Tatlı göl, Bozalan Gölü (İzmir), Poyrazlar, Çernek, Lâdik, Uzun Göl ve Karamuk bataklığında rastlanmıştır.

Ayrıca Kızılırmak ve Yeşilirmak Deltaları, Işıklı Gölü, Karamuk Gölü, Eğirdir Gölü gibi sulak alanlarımızda da bu türe rastlamak mümkündür [21].

Hirudo verbana, kırmızı, sarı, siyah ve parlak yeşil renkler taşır. Dorsal kısımda dar şeritler, turuncu kırmızısı renktedir. Dorsalin orta kısmında geniş, koyu yeşil-kahverengi tek renkte bir bant yer alır. Lateralde daha açık renkli iki adet sarımsı şerit bulunur ve bunlar bir çift yeşilimsi oval benek tarafından kesilir. Ventral kısımda sarımsı yeşil zemin üzerinde laterale yakın iki koyu bant yer alır. Bu iki koyu bandın arasında kalan ve lekeler içermeyen açık renkli bir bölge bulunmaktadır [22]. *Hirudo verbana*’nın dorsal ve ventral görünüşü Şekil 2. 2.’de verilmiştir [9].



Şekil 2.2. *Hirudo verbana*’nın görünüşü a) Dorsal, b) Ventral

2.3. Tıbbi Sülüklerin Etki Mekanizmaları

Sülüklerin tedavi edici etki mekanizmaları ilk zamanlardan günümüze kadar çok sayıda yorumlanmıştır. Sülük tedavisi, bir başlangıç ısırığını ve sülüğün 5 ila 15 ml kan emdiği, 20 ila 45 dakika süren bir bağlanma periyodunu içerir. Bu bilgiler ile başlıca terapötik faydaları, ısırma sırasında çıkan kandan değil (başlangıçta bir rahatlama sağlamasına rağmen), sülük tükürüğünde bulunan biyoaktif maddeler tarafından olduğu kabul edilmektedir [3].

Sülükler vücudunun baş ve kuyruk bölgesinde bulunan vantuzları ile avına tutunur. Ağızın etrafında bulunan vantuz tarafından bağlanma bölgesinde “Y” şeklinde yara izi oluşturulur. Sülük beslenmeye başladığında damarları genişleten, kanın akışkanlığını artıran ve ağrıyı

durduran kimyasalları salgılar. Sülük ısırıldıktan sonra bir emme yolu oluşturur (hücre dışı matris yıkımı), adhezyon, agregasyon ve koagülasyonu inhibe eder (trombosit fonksiyonunun inhibisyonu ve antikoagülan etki), kan akışını artırır, kendini korur (antimikrobiyal aktivite) ve tespit edilmekten sakınır (analjezik ve antienflamatuar etkiler) [23]. Yaklaşık 10-30 dakika tutunarak kan emen sülük tamamen doyduğunda kendiliğinden bırakır [12].

2.4. Tıbbi Sülük Salgısında Bulunan Biyoaktif Maddeler

Sülük salgılarında farklı moleküler kütlelere sahip 100'den fazla sayıda protein gözlemlenmesine rağmen, önemli aktif rolü olan sadece birkaç tanesi tanımlanmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Sülük salgısında bulunan bazı biyoaktif maddeler ve etkileri [24]

Biyoaktif Madde	İşlevleri
Hirudin	Trombine bağlanarak kan koagülasyonunu inhibe eder.
Calin	Von Willebrand faktörünün kolajene bağlanmasını bloke ederek kan koagülasyonunu inhibe eder, kollajen aracılı trombosit agregasyonunu inhibe eder.
Destabilaz	Monomerik aktivite ile fibrini eritir, trombolitik etki gösterir
Hirustatin	Kallikrein, triptin, kimotriptin ve nörofolik cathepsin G'yi inhibe eder
Bdellinler	Anti-inflamatuvardır. Plazmin, tristin ve akrosin'i inhibe eder
Hyaluronidase	İnterstisyel viskoziteyi artırır ve antibiyotik etkisi gösterir.
Tryptase inhibitör	Mast hücrelerinin proteolitik enzimlerini inhibe eder
Eglinler	Anti-inflamatuvardır. α -Kimotripsin, kimaz, subtilisin, elastaz ve katepsin G'nin etkinliğini inhibe eder.
Faktör Xa inhibitörü	Moleküler yoğunlukları aynı kompleksler oluşturarak pıhtılaşma faktörü Xa'nın aktivitesini inhibe eder
Karboksipeptidaz A	Isırık bölgesinde kan akışını artırır
Asetilkolin	Vazodilatördür
Histamin Benzeri Maddeler	Vazodilatör olup, Isırık bölgesinde kan akışını artırır

Sülük tükürüğünde bulunan biyoaktif bileşiklerden en ünlü olanı “hirudin” olarak adlandırılmıştır. Hirudin, ilk olarak 1884 yılında Haycraft tarafından izole edilmiş olup 1957 yılında da Fritz Markwardt tarafından saf kristal yapıda elde edilmiştir. Hirudine olan büyük talep nedeniyle biyolojik olarak aktif hirudin elde etmek için bakteri, maya ve daha yüksek ökaryotların kullanılarak çeşitli rekombinant sistemler geliştirilmiştir [25].

- Hirudin, 9000 molekül ağırlığında bir polipeptittir. Trombin ile enzim inhibe edici kompleks oluşturarak fibrinojenin fibrine dönüşümünü engeller. Heparinin aksine hirudin aktivitesi için antitrombin III gerekmez ve koagülasyon esnasında salgılanan trombosit faktör-4 (heparini nötralize eder) tarafından da inaktive edilmez. Pıhtılaşma faktörlerinin biyosentezi ile etkileşmez. Lipoprotein lipaz gibi kandaki diğer enzim sistemlerini etkilemez.
- Hiyaluronidaz, sülüklerden elde edilen hiyaluronidaz, hiyaluronik asidin tanımlanmasında kullanılan en spesifik enzimdir. Enzim, viskoziteyi azaltır ve dokuları enjekte edilen sıvılara daha geçirgen hale getirerek sıvıların emilim hızını artırır. Bu etki dokulardaki fazla sıvıların ve damar dışına çıkmış kanın resorbsiyonunu sağlayarak lokal anesteziklerin etkinliğini artırır. Hiyaluronidaz sayesinde tüm tükrük sekresyonlarının yayılımının artması sağlanır [26]. Hiyaluronidaz şu an insan derisi yoluyla ilaç dağılımı çalışmalarında kullanılarak incelenmektedir. Ayrıca kemoterapötik ilaçların antikanser etkisinin artırılması amacıyla çeşitli çalışmalarda incelenmektedir [27].
- Calin, trombosit agregasyonunda rol oynayan inhibitördür. Von Willebrand faktörünün kollajene bağlanmasını engelleyerek kanın pıhtılaşmasını inhibe etmede görev alır. Bunun yanı sıra doku geçirgenliğini artırır [26].
- Hirustatin, *Hirudo medicinalis*'ten izole edilmiştir. Kallikrein, tripsin, kimotripsin ve katepsin G'yi inhibe eder ve reperfüzyonu hızlandırır [28].
- Ghilanten, *Haementeria ghilianii*'den izole edilmiştir. Antistatine benzer bir proteindir. Factor Xa'nın spesifik güçlü inhibitörleridir [26].
- Destabilaz, glikozidaz aktivitesine sahiptir. Destabilaz, kombine enzimatik ve enzimatik olmayan antibakteriyel etki gösteren; ayrıca kan pıhtılarını da eritebilen ilk omurgasız lizozim enzimidir [29].
- Apiraz, (adenosin 5'-difosfat difosfohidrolaz); adenosin 5 'difosfat, araşidonik asit, trombosit aktive edici faktör (PAF) ve epinefrin üzerindeki etkisi ile trombosit agregasyonunu inhibe eden bir moleküldür [26].
- Eglinler, Alfa-kimotripsin kimaz, subtilisin, elastaz ve katepsin G'ye inhibitör etki yaratır. Ayrıca antienflamatuar etkiye de sahiptir.
- Bdekins, tripsin, plazmin ve akrosini inhibe ederek kanama zamanını uzatmada ve antienflamatuar etki göstermede rol alır. Ayrıca Bdekins proteinaz inhibitörü olarak da görev yapar. Bu etkilerinin yanı sıra duyu nöronlarını uyarıcı etkisi de vardır.

- Gelin, eglise benzeyen güçlü bir trombin inhibitörü olup *Hirudinaria manillensis* tükürüğünden izole edilir. Gelin, eglin gibi elastaz, katepsin G ve kimotripsini inhibe eder. Fakat plazmin, trombin, pepsin veya tripsin üzerinde daha az aktiviteye sahiptir [30].
- Antistasin, protrombini trombine çeviren faktör Xa 'ya bağlanarak görevini yapmasını engeller. ayrıca protrombinaz inhibitörü görevine de sahiptir.
- Asetilkolin, Vasküler dilatasyon oluştururlar. Bu etki ile uygulandığı bölgede kan akımını arttırarak, dolaşımın devamlılığını sağlar.
- Kollegenaz, Kollajeni yıkmakla görevlidir.
- Kloromisin, potansiyel antibiyotik rolü oynamaktadır [31].
- Histamin Benzeri Madde, Vazodilatör bir etkiye sahiptir. Sülük uygulanan bölgedeki kan akımını arttırmada rol alır [32].
- Hementerin, fibrinojeni fibrinden daha hızlı parçalayan, kan pıhtılaşmasını önleyen ve *in vitro* olarak fibrin pıhtılarını yok eden, plazminojenden bağımsız bir fibrinolitik metalloproteinazdır [33].
- Bufridin, *H. manillensis*'ten izole edilmiştir. Hirudine benzer bir trombin inhibitörü olup, yapısal ve immunolojik farklılıklar göstermektedir [26].
- Decorsin, Amerikan tıbbi sülüğü olarak bilinen *Macrobdella decora*'dan izole edilmiştir. Trombosit agregasyonunun güçlü bir inhibitörüdür [34].
- Guamerin, bir insan lökosit elastaz inhibitörü olup anti-enflamatuar etki göstermektedir. *H. nipponia*'dan elde edilerek saflaştırılmıştır [35].
- Piguamerin, *H. nipponia*'dan elde edilmiş olup, plazma kallikreinin serin proteaz inhibitörüdür. Ayrıca plazma ve doku kallikreini ve tripsinini kuvvetli bir şekilde inhibe etme görevi de vardır [36].
- Gama-glutamil transpeptidaz, *H. medicinalis*'ten izole edilmiş olup sığır gama-glutamil transpeptidaz enzimi ile benzer özelliktedir. Hücre içi glutatyon sentezi için öncül aminoasitleri temin etmekte görevli bir enzimdir [30].
- Karboksipeptidaz A, ısırık etrafındaki kan akışını arttırmada görevlidir.
- Trombosit Aktive edici faktör antagonisti (PAFA), liyofilize sülük tükürüğünden elde edilmiş bir fosfogliserittir. Tromboembolik bozuklukların ve enflamasyonun tedavisinde kullanılan bir fosfogliserit olarak tanımlanmaktadır. Bunun yanı sıra tromboembolik bozuklukların ve enflamasyonun tedavisinde önemli bir yere sahiptir [30].

2.5. Tıbbi Sülüklerin Medikal Kullanım Alanları

Geçmişte sülükler çeşitli uygulamalar için kullanılıyordu; bu tedavinin arkasındaki etki mekanizmaları belirsizdi ve önemli olan tek şey sorunu iyileştirmek ya da rahatlatmaktı. Günümüzde ise sülüklerdeki etken maddelerle ilgili araştırma çalışmaları bize tedavinin nasıl işlediğini daha iyi anlamamızı sağlamış ve etkili olmuştur. Bunun sonucunda terapötik kullanımları artmıştır [3].

Günümüzde dünyanın birçok ülkesinde (Rusya ve bu coğrafyadaki diğer ilişkili devletler, ABD, Kanada, Avustralya, Fransa, Almanya, Hollanda vb.) çeşitli klinik durumlarda tıbbi sülük tedavisinin aktif olarak kullanımı artmaktadır[26]. Hirudoterapi veya tıbbi sülük tedavisi, hastalarda çeşitli terapötik etkiler oluşturmada çok etkili olup sonuçta asıl olarak konak homeostazına fayda sağlar. Tıbbi sülük tedavisi veya hirudoterapi sülüklerin hasta vücudunda mukoza ya da deriye yapıştırılması şeklinde uygulanan geleneksel ve tamamlayıcı tıp tedavi yöntemlerinden biridir.

Bu tedavi ile üç ayrı fayda elde edilir;

- Sülüğün yüzeyel damarlardan kan emmesi ile hacamat etkisi,
- Sorunlu bölgelerde akupunktur noktalarına uygulanması ile akupunktur etkisi,
- Hirudoterapinin asıl amacı olan sülüklerin kan emerken dokuya salgıladığı sülük salyasının terapötik faydalarını elde edilmesidir.

Tıbbi sülük uygulamasının günümüzde sıklıkla uygulandığı hastalıklar; [5, 37].

- İnflamatuvar hastalıklar
- Üveit, glokom, katarakt, sarı nokta, diyabetik retinopati gibi göz hastalıkları
- Romatoid artrit ve romatizmal hastalıklar
- Migren gibi baş ağrıları
- Baş dönmesi ve kulak çınlaması
- Fibromiyalji ve huzursuz bacak sendromu
- Omurganın ağrılı sendromları
- Dejeneratif sinir sistemi hastalıkları (MS, ALS, Parkinson hastalığı ve felçler)
- Dermatit, psöriasis ve kronik gibi cilt hastalıkları

- İnfertilite
- Gingivit ve paradontit gibi diş hastalıkları
- İmmun sistemini desteklemede
- Depresyon
- İşitme kayıpları
- Endometriosis ve mastit

2.6. Tıbbi Sülüklerin Kullanımındaki Komplikasyonlar

Tıbbi sülük uygulamalarında farklı komplikasyonlarla karşılaşılabilir. Sülük uygulaması sonrasında enfeksiyon meydana gelmesi %2-36 oranında sık rastlanan bir durumdur. En sık olarak kanamalar, alerjik reaksiyonlar ve bakteriyel enfeksiyonlar görülmektedir. Sülük sindirim kanalındaki bakteriler pnömoni, sepsisemi veya gastroenteritise sebep olabilir. Antibiyotik tedavisi uygulanmadan sülük kullanımının %20 oranında bakteriyel enfeksiyon yapabileceği bildirilmiştir. Enfekte olan veya kullanılmış sülüklerin farklı kişilere tekrar kullanımının kan aracılığı ile bir enfeksiyon etkenini (HIV ve hepatit virüsleri) bulaştırması mümkündür [10]. Sülük uygulaması yapılacak kişilerde özellikle immün sistemde yetersizlik varsa mutlaka antibiyotik kullanılması gerekmektedir.

Sülük salgısındaki toksinlere bağlı olarak kaşıntı, bül oluşumu, ülseratif nekroz ve lokal doku ölümü (flep kaybı) gibi lokal hipersensitivite reaksiyonları ortaya çıktığı bildirilmiştir [38]. Sülük tedavisi ile ortaya çıkan komplikasyonlar arasında; lokal cilt lezyonları, kanama, anemi, yara izi, alerjiler ve enfeksiyonlar da yer almaktadır. En sık bildirilen komplikasyonların başında kanamalar gelmektedir. Literatürdeki yayınlar incelendiğinde sülük tedavisine bağlı olarak ortaya çıkan kanamanın ciddi ve aşırı düzeyde olabileceği bildirilmiştir. Bu duruma sülük tükürüğünde bulunan trombini inhibe eden hirudin ve kılcal damarların kapanmasını önleyerek sürekli kanamaya neden olan histamin benzeri maddelerin etkili olduğu düşünülmektedir [39].

Tıbbi sülük tedavisi her bireye uygulanmamalıdır. Antikoagülan ilaç tedavisi uygulanan hastalar, hemorajik hastalığa sahip olanlar, özellikle hemofili hastaları, aktif bir kanama odağı olan hastalar, ciddi anemisi olan kişiler ($Hb < 10$), cerrahi girişim uygulanacak olan hastalar, aktif tüberkülozu olan hastalar, hipotansiyonu olan hastalar, edinsel immün yetmezliği olan veya immün sistemi baskılayıcı tedavi gören hastalar, ileri derecede kronik

hastalığı olan hastalar, yara iyileşmesi geç olan hastalar, diyabet hastaları, arterial yetersizliği olan hastalar ve mental hastalıkların akut döneminde olan hastalardır. Tıbbi sülük uygulamasının hamile ve emziren kadınlarda kullanımı ile ilgili bir veri bulunmadığından, bu kişilere de uygulama yapılmamalıdır [40].

2.7. Yara İyileşmesi

Dokuların bütünlüğünün ve işleyişlerinin bozulması durumuna yara adı verilir. İşleyişin yeniden kazanılarak doku bütünlüğünün sağlanmasına ise yara iyileşmesi denir [41]. Yara iyileşmesinde epitelyal, endotelyal, enflamatuvar hücreler, trombositler ve fibroblastlar bir arada belli bir sıra ve düzen içerisinde fonksiyonlarını yerine getirmektedirler [42]. Yara iyileşmesi; hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ve yeniden modellenme fazlarını içeren hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal bir dizi olayın bütünleşmesi sonucu gerçekleşmektedir.

- Hemostaz Fazı; İyileşmenin başlaması için hemostaz sağlanması şarttır. Yaranın aşırı kanamadan, dehidratasyondan ve enfeksiyondan korunması gerekir.
- İnflamasyon Fazı; Yaranın oluşmasından dört ile altı güne kadar sürdüğü aşama olup iki basamakta incelenebilir;
 - a) Erken inflamatuvar faz: Başlıca nötrofillerin işlevlerinin baskın olduğu erken dönemi içerir.
 - b) Geç inflamatuvar faz: Makrofaj işlevlerinin baskın olduğu geç dönemdir.
- Proliferasyon fazı; Dördüncü günden sonra yaklaşık iki haftaya kadar süren ve granülasyon dokusu gelişimi ile epitelizeasyonun tamamlandığı aşamadır. Sitokinler ve büyüme faktörleri bu evrede önemlidir.
- Olgunlaşma ve yeniden şekillenme fazı; Bir yıla kadar devam eder. Çoğunlukla iç içe geçmiş fazları içerir ve net bir ayrım yapılamaz [43, 44].

2.8. Anjiyogenez

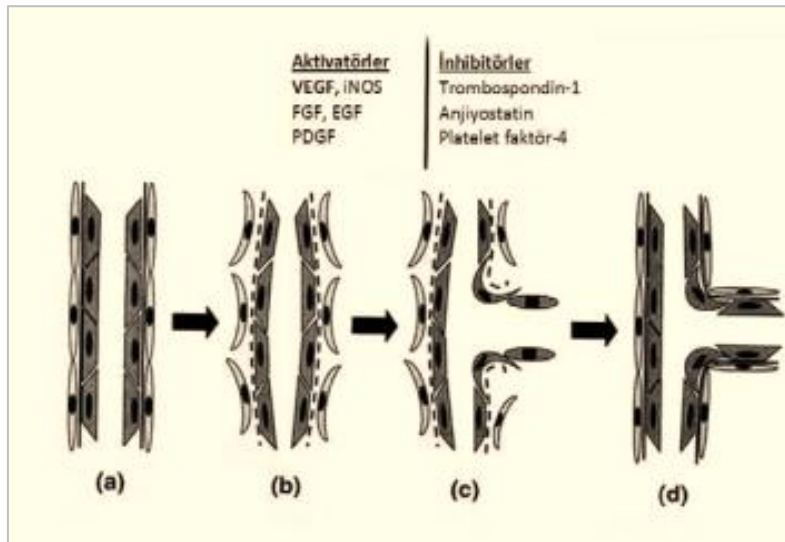
Vücutta doğal olarak meydana gelen anjiyogenez, mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi anlamına gelmektedir. Bu durum bazen patolojik de olabilir. Fizyolojik anjiyogenez; embriyogenez aşamasında, yara iyileşmesinde ve kadınların menstrüasyon dönemlerinde gözlenir [45]. Anjiyogenez oldukça karışık bir mekanizmaya sahiptir. Ekstraselüler matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme

faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyogeneze en önemli rolü üstlenir [46]. Damar endotelini oluşturan endotel hücreleri, anjiyogeneze sürecinde yer alan temel hücrelerdendir. Erişkin insanlardaki vasküler endotelial hücreler düşük turnover hızında olmalarına rağmen, yaşamları boyunca yeni kan damarları oluşturacak çoğalma özelliğindedirler.

Endotelial hücrelerin yaşam siklusu (yenilenme süresi) 1000 günden fazladır. Kadın üreme sistemi ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik durumlar dışında anjiyogeneze, organizmada oldukça sınırlıdır [47]. Anjiyogenik uyarıların artması ve anjiyogeneze inhibitörlerinin azalması anjiyogenezi başlatmaktadır. Anjiyogeneze oluşum basamakları Şekil 2.3'de verilmiştir.

Yeni damar oluşumunda gerçekleşen olaylar aşağıdaki şekilde sıralanır:

- Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması
- Endotel hücrelerin migrasyonu
- Endotel hücrelerin proliferasyonu
- Kapiler oluşumu ve endotel hücrelerin olgunlaşması



(a) Endotelial hücre (koyu gri), bazal lamina (siyah çizgi) ve perisit (açık gri) birlikteliğindeki normal damar yapısı. (b) bazal membran yıkımını takiben perisit ayrılması. (c) anjiyogenik uyarana doğru endotelial hücrelerin göçü. (d) bazal membranın konumlanması, perisit tutunması ve lümen oluşumu.

Şekil 2.3. Anjiyogeneze oluşum basamakları [48]

2.8.1. Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması

Anjiyogenez damar endotelini döşeyen kollajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparan sülfat gibi proteoglikanlardan oluşan bazal membranın proteolitik yıkımı ile başlar [47]. Endotel hücreleri göç etmek ve çoğalmak üzere uyarıldığı anda membran ve hücreler arasında bir bölünme gerçekleşir. Endotel hücreleri yayılma etkisine sahip olmayan tek bir tabaka meydana getirirler. Ancak anjiyogenez sırasında çoğalıp yayılma özelliğine sahiptirler. Normal, hasta ya da hasarlı dokularda üretilip salgılanan anjiyogenik büyüme faktörleri difüzyon yolu ile diğer dokulara geçer. Anjiyogenik büyüme faktörleri yakınındaki kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere bağlanırlar. Büyüme faktörleri tarafından aktif hale getirilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin yıkımında görev alır. ECM'nin enzimatik yıkımından sonra endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiler filizlenme gerçekleşir [49]. Endotel hücrelerinin invazyon ve göç süreçleri, plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metaloproteinaz (MMP) sisteminin iş birliği içinde aktive olmasını gerektirir. Ürokinaz-tip (uPA) ve doku-tip (tPA) plazminojen aktivatörleri plazminojeni plazmine çeviren serin proteazları grubundadırlar. ECM bileşenlerinin yıkılması ve MMP-1, MMP-3, MMP-9, elastaz gibi matriks metaloproteinazlarının aktivasyonu da plazminin görevleri arasındadır [50].

2.8.2. Endotel hücrelerin migrasyonu

Anjiyogenik uyarı, proteolitik yıkım ile endotel hücrelerini aktive eder. Endotel hücreleri ekstraselüler matrikse doğru göç eder ve çoğalırlar. En etkili anjiyogenik faktör vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)'dür[50]. Tümör hücreleri, fibroblastlar ve bağışıklık hücreleri tarafından üretilen vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörleri bazal membran tarafından salınırlar. Endotel hücrelerin reseptörlerine anjiyogenik faktörlerin bağlanması ile endotel hücreleri aktive olurlar. Böylece endotel hücrelerinin ekstrasellüler matriks içine migrasyonu gerçekleşmiş olur.

2.8.3. Endotel hücrelerin proliferasyonu

VEGF gibi büyüme faktörlerinin etkisiyle migrasyon sonrası endotel hücreleri artış gösterirler. Bu olay, ara maddenin oluşumuna ve yeni bir olgun vasküler bazal membran oluşumuna neden olur. Vasküler endotel hücreleri perisitler ile birlikte, vasküler bazal membranın yeni bir kan damarı oluşumuna yardımcı olur. Bu işlem süresince parçalanmış vasküler bazal membran, anjiyogenezin düzenlenmesinde çok önemli bir rol üstlenir [47].

2.8.4. Kapiller oluşumu ve endotel hücrelerin olgunlaşması

Endotel hücre çoğalmasından sonra ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstraselüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmesi gerekir. Kapiller filizlenme oluşuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM’de yıkılma meydana gelir ve bu sayede daha ileri yayılımı gerçekleşir. Bazal membranın yıkılması ile endotel hücre göçüne ve filiz oluşumu sağlanmış olur. Endotelin yol alması ve uzaması sırasında hücre içi ve hücreler arası boşlukta, damarların olduğu lümenler meydana gelir. Böylece, ekstraselüler matriks proteolizinin birbirini izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonrasında kapillerler oluşur. Proteolitik yıkılma ve endotel hücresi göçünden sonra yeni oluşan kapillerler, yeni bazal membran oluşumunda görev alırlar. Bu nedenle, endotel hücrelerinin yeni kapiller yapılar oluşturabilmeleri için birbirlerine ve ECM’ye tutunma ihtiyaçları vardır. Damar olgunlaştıktan ve uygun anjiyogenez ortaya çıktıktan sonra anjiyogenik faktörlerde azalma olurken, anjiyogenez inhibitörlerinde artış meydana gelir. Böylece endotel hücreleri sessiz bir hale bürünür ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olur [50].

Özetleyecek olursak; FGF, EGF ve VEGF gibi büyüme faktörlerinin aktivasyonu, hücrelerin çoğalmasını ve ECM içine göç etmesini uyarır. Aynı zamanda, büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ECM bileşenlerinin yıkılmasına neden olur. Mitojenik endotel hücreleri kapiller filizlerini meydana getirir. İntegrinler gibi membran proteinleri de bu süreç içinde görev alır ve endotel hücrelerinin birbirine ve ECM’ye tutunmalarına destek olurlar. Böylece yeni kapillerler meydana gelir.

Fizyolojik bir süreç olan anjiyogenez, son yıllarda moleküler patolojideki gelişmeler sayesinde birçok anjiyogenik ve antianjiyogenik faktör arasındaki bir denge ile düzenlendiği ortaya konmuştur. Dengenin anjiyogenik faktörler lehine bozulması sonucunda patolojik anjiyogenez gelişir. Anjiyogenez sürecinde büyümeyi başlatan ve büyümeyi önleyen faktörler arasındaki denge çok önemlidir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Anjiyogenik faktörler, Anjiyogenezi önleyen faktörler

Anjiyogenik Faktörler	Anjiyogenezi Önleyen Faktörler
VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktör)	Trombospondin- 1
PGF (Plasental büyüme faktör)	Anjiostatin
FGF (Asidik, bazik fibroblast büyüme faktör)	Endostatin
FGF-3 (Fibroblast büyüme faktör-3)	Vazostatin
FGF-4 (Fibroblast büyüme faktör-4)	Vasküler endotelial büyüme faktörü inhibitörü
TGF- α (Transforme edici büyüme faktör- α)	Trombosit faktör-4 fragmanı
TGF- β (Transforme edici büyüme faktör- β)	Prolaktin derivativesi
EGF (Epidermal büyüme faktör)	Restin
HGF (Hepatosit büyüme faktör)	Proliferinle ilgili protein
TNF- α (Tümör nekroz faktör- α)	İnterferon- α - β
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktör)	Anjiopoetin-2
GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)	Antitrombin-3 fragmanı
IL- 8 (İnterlökin-8)	İnterferon ile indüklenebilen protein- 10
Anjiogenin	
Proliferin	

2.9. Bazı Anjiyogenik Faktörlerin Özellikleri

2.9.1. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri süper ailesinden olan Vasküler Endotel Büyüme Faktörü, endotel hücrelerine özgül olup anjiyogenezin ana düzenleyicilerinden biridir ve önemli etkileri vardır. İlk bulunduğu vasküler endotelial permeabilite faktörü (VEPF) olarak isimlendirilirken günümüzde VEGF olarak adlandırılmaktadır. VEGF, 46 kDa ağırlığında, homodimerik, heparine bağlı glikoprotein yapısında bir moleküldür. VEGF ailesi, glikoprotein yapısında olan 7 üyeden oluşmuştur. Memelilerde bulunan VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, plasental büyüme faktörü (PlGF), parapox virüslerinde bulunan VEGF-E, yılan zehrinde bulunan ve svVEGF olarak da adlandırılan VEGF-F bunlar

arasında sayılabilir [51]. Vücutta hem fizyolojik olaylar da hem de tümör büyümesi ve yayılmasını da içeren patolojik birçok hastalığın etiyolojisinde yer alır. Bu sebeple 1980'lerden günümüze kadar gittikçe artan bir ilgiyle araştırılmaktadır.

VEGF; ovaryum follikülleri, korpus luteum, akciğer alveolar hücreleri, renal glomerül visseral epitel hücreleri, böbrek proksimal tübül hücreleri, adrenal korteksin tüm hücreleri, Leydig hücreleri, aktive makrofajlar, arterioller çevreleyen fibroblastlar, bronşiyal ve koroid pleksus epitel hücreleri, hepatositler gibi vücutta birçok farklı hücrede sentezlenir.

VEGF; postnatal damarlanma, yara iyileşmesi, kanser, romatoid artrit, retinada yeni damarlanma ve kalp damar hastalıkları olmak üzere çok sayıdaki patofizyolojik durumlarda önemli görev almaktadır. VEGF, erken vasküler gelişimden tüp formasyonu oluşumuna kadar etkili bir maddedir. VEGF anjiyogeneze;

1. Nitrik oksit (NO) salınımını indükleyerek damar permeabilitesini artırır,
2. Bazal membran ve matriks yıkımını artırır,
3. Anjiyopöietinler sayesinde endotel hücrelerin farklılaşmasında ve maturasyonunda rol oynar [52].

2.9.2. Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor, EGF)

Epidermal büyüme faktörü (EGF) birçok memeli türünün doku ve vücut sıvılarında bulunan, 6 kDa ağırlığında polipeptit yapılı, 53 aminoasitten oluşmuş mitojenik bir polipeptittir. EGF ilk kez 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından erkek fare submandibuler tükürük bezinden izole edilmiştir [53]. EGF, biyolojik etkilerini bir transmembran protein olan EGF reseptörü (EGFR) aracılığı ile göstermektedir. EGF'nin akciğer, mide, duodenum, pankreas, böbrek, hipofiz bezi, tiroid bezi, meme bezi, yumurtalık, uterus ve plasenta epitel hücreleri ile endotel, mezodermal, fibroblast, düz kas hücrelerinde, korneada, lenste, ince bağırsak epitelinde, astrositlerde ve gliya hücrelerinde reseptörleri bulunmaktadır [54]. EGF'nin etkileri hakkında yapılan çalışmaların çoğu, mutant fareler ile gerçekleştirilmiştir. EGFR eksik farelerde deri, akciğer, mide-bağırsak kanalı epitelinde defekt, çoklu organ yetmezliği ve nörodejenerasyon geliştiği gözlemlenmiştir. Bu farelerin doğumdan sonraki ilk bir ay içinde ise öldüğü bildirilmiştir [55, 56]. EGF'nin, antienflamatuar, antiapoptotik, nörotrofik ve nöroprotektif etkileri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile desteklenmiştir [57]. Yara

iyileşmesini hızlandırmak için potansiyel olarak incelenen büyüme faktörlerinden biridir. Aynı zamanda bir sitokin olan EGF, embriyogenezis, yeni kan damarlarının oluşması ile doku ve vasküler sistemin tamirinde önemli fonksiyonlara sahiptir [58].

2.9.3. Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor, FGF)

Fibroblast Büyüme Faktörü 28 üyeden oluşan büyük bir ailedir. İzoelektrik noktalarının farklı olması nedeniyle asidik(aFGF) ve bazik(bFGF) olmak üzere iki tip FGF tanımlanmıştır. Mezenkimal hücreler için mitojen özelliktedir. Endotel proliferasyonu ve motiliteyi arttırarak neovaskülarizasyonu hızlandırmasıyla anjiyogenezde rol oynar. FGF yaralanma ardından ilk üç günde anjiyogenezden sorumludur. Ayrıca heparinin etkilerini güçlendirmek, kollajen sentezini uyarmak, yaranın kontraksiyonunu ve epitelizasyonu sağlamak ve fibronektin ve proteoglikan sentezini uyarak adhezyonu kolaylaştırmak gibi önemli görevleri vardır [59]. Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda FGF' in bazal membranla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hücre kültürlerinde yapılmış bir dizi yaralanma modellerinde FGF'nin serbest bırakılabildiği gösterilmiştir [60].

2.10. Apoptotik ve Nekrotik Etki

Sessiz, inflamatuvarıdan bağımsız ve bağışıklık sistemini harekete geçirmeyen hücre ölümü tipi "apoptoz" olarak adlandırılır. Eğer bir organizmada bir hücreye ihtiyaç duyulmadıysa, hücre içi haberci sistemleri aktive edilir ve o hücrede programlanmış hücre ölümü sinyali başlatılır. Bu süreç programlanmış hücre ölümü ya da yunanca yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz olarak adlandırılır [61]. Apoptoz; gelişim, dokularda hücre popülasyonunun korunması ve yaşlanma gibi hemostatik bir mekanizmanın sağlanması amacıyla fizyolojik olarak meydana gelir.

Apoptotik hücre ölümüne alternatif yol nekrozdur. Nekroz, apoptoz ve otofaji özelliklerinden yoksun olan ve genellikle kontrolsüz olarak kabul edilen bir hücre ölümü türü olarak tanımlanmıştır. Isı, radyasyon, hipoksi veya düşük dozlarda sitotoksik antikanser ilaçlara maruz kalma gibi bazı yaralanma uyaran türleri apoptoza neden olabilir, ancak uyaran türleri daha şiddetli hale geldiğinde nekroz ile sonuçlanır [62].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız *in vitro* koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup, deneyler Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü AR-GE Merkez Başkanlığı Laboratuvarları ve Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya AD. Laboratuvarları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal ve cihazların listesi

Cihaz	Markası
+4 °C Buzdolabı	Arçelik
-20 °C Buzdolabı	Electrolux MF280
-80 °C Buzdolabı	Sanyo
İnvert Mikroskop	Leica DMIRB
Biyogüvenlik Kabini (2.seviye)	Nüve MN120
Su Banyosu	Chicago Surgical and Electrical 1170
Santrifüj	Nüve NF815
CO2 'li inkübatör	Sanyo MCO-18AIC
Vorteks	Nüve NM10
Otomatik pipetler	Biologix
Dondurma tüpleri (Croyogenic Vial)	Corning
Hassas Terazı	Adventurer Pro
Kuru buz makinası	AF 80/ Scatsman
Eliza plak okuyucu	Biotech Synergy HT
20 °C Buzdolabı	Bosch
+4 °C Buzdolabı	MD 294
RT-PCR cihazı	Roche Lightcycler 1,5
Vorteks cihazı	Thermo
Thermal Cyclers	BioRad T100
Santrifüj	Sigma 2-16 KL
Hücre sayım lamı	Neubauer Haemocytometry
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	Sartorius Minisart
6 ve 12 kuyucuklu petri	Costar
96 kuyucuklu plaka	Costar
75 cm2 hücre büyütme kapları	Thermo Scientific
25 cm2 hücre büyütme kapları	Thermo Scientific
Serolojik Pipet Tabancası	Biologix
Dondurma tüpler (Croyogenic Vial)	Corning
15 ml Centrifuge Tube kapaklı	Costar
50 ml Centrifuge Tube kapaklı	Costar
1,5 ml Eppendorf tüp kapaklı	Costar
Serologic pipetler (5ml), tek kullanımlık	Greiner Cellstar
Serologic pipetler (10ml), tek kullanımlık	Greiner Cellstar
Pipet Ucu (1-200 µL)	Biologix
Pipet Ucu (100-1000 µL)	Biologix
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	Sartorius Minisart
Lam	Isotherm
Lamel	Isotherm

3.2. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler Çizelge 3.2’ de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler listesi ve marka-modeli

Kimyasalın Adı	Ticari Firması
Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM)	Capricorn Scientific
Fetal bovine serum (FBS)	Biological Industries
L-Glutamine	Capricorn Scientific
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma
Tripan mavi solüsyonu	Sigma
Trypsin	Capricorn Scientific
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Applchem
µ-Plate Angiogenesis 96 Well	Ibidi, Almanya
Matrigel	Corning, Amerika
Arginin	Sigma
Penicilin	Capricorn Scientific, PS-B
NaCl	Merck
Na ₂ CO ₃	Merck
NaOH	Merck
Na-K Tartarat	Fluka Chemika
CuSO ₄	Merck
Folin ciocalteu’s fenol	Merck
Bovine Serum Albumin	Aldrich
RPMI	Capricorn Scientific
Annexin V	BD Cat no:556420
Propidium iyodür (PI)	BD
İzopropanol	Merck
Etil Alkol Sigma	Etil Alkol Sigma
MTT (Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide)	Sigma
Total RNA İzolasyon Solusyonu	GeneAll RiboEx Kiti
Hybrid-R	GeneAll
Primerler	
cDNA sentez kiti	EntiLink cDNA Sentez Kiti
SYBR Green PCR SuperMix	EnTurbo

3.3. Tıbbi Sülüklerin Temini ve İnceleme

Tıbbi sülük türlerinden *Hirudo verbana* örnekleri Tarım Bakanlığı onaylı ticari sülük üretim çiftliğinden (Farmedi Sülük) temin edildi. Kloruz musluk suyuyla dolu, iyi havalandırılmış plastik kaplarda muhafazaları sağlandı. Her 2-3 günde bir düzenli olarak suları değiştirilerek bakımları yapıldı. Temin edilen tıbbi sülüklerin gerek teşhislerinde gerekse morfolojik özelliklerin incelenmesinde “Kameralı Stereozoom Mikroskop” kullanıldı.

3.3.1. Tıbbi sülük salgısının elde edilmesi

Tüm sülükler daha önce beslenmiş olması ihtimaline karşılık yaklaşık 3 ay süre ile aç bırakıldılar. Sülükler suni hazırlanmış havuzlarda (90 x 40 x 60 cm, havuz suyunun derinliği yaklaşık 10 cm; sıcaklık 22 ila 26 °C) tutularak, gözlenip mikroskop altında fotoğraflamaları yapıldı. Sülükleri beslemek için 37°C sıcaklıkta 0.07 M sodyum klorür ve 0.0005 M arginin içeren fagostimülatör solüsyonu hazırlandı [63]. Uzun süre aç bırakılan sülüklerin bu solüsyonla beslenmeleri sağlandı (Şekil 3.1). Sülükler tamamen doyduktan sonra buz dolu kaba batırılmış plastik test tüpünde tutuldular. 15-20 dakikalık bir inkübasyon periyodundan sonra, sülük tamamen felç edilerek, emdiği tüm solüsyonun sülük tarafından çıkarılması sağlandı. Ardından, emilen çözeltiden kalanını çıkarmak için sülük posterior uçtan anterior uca doğru sıkılarak sağım işlemi yapıldı. Salgısı alınan sülükler, 15-30 dakika boyunca ılık suya (37 °C) batırılarak aktivitelerini yeniden kazanmaları sağlandı. Sülüklerden alınan sıvı 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek 4°C'de 2500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Daha sonra elde edilen süpernatant çalışmalarımızda tıbbi sülük salgısı adı ile kullanıldı. Toplanan örnekler bir stok oluşturularak homojen olması sağlandı ve eppendorflara alikotlama yapılarak -20 °C'de ışıktan korunarak muhafaza edildi.

Sülük salgı ekstraktının yüksek kalite ve miktarda toplanması için yeni yöntemler ve bunu optimize etmek için birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan araştırma sonrasında sülüklerden elde edilecek salgının en yüksek protein konsantrasyonunun 12-15 haftalık açlık zaman diliminde olduğu gösterilmiş [64]. Biz de çalışmamızı bu doğrultuda planlayarak sülük temininden sonra salgı elde etme süresini bu zaman aralıklarında uyguladık.



Şekil 3.1. Sülüklerin beslenmesi

3.3.2. Tıbbi sülük salgı ekstraktında protein tayini

Sülük salgı ekstraktının total protein tayini Oliver H. Lowry ve ark. tarafından bildirilen Lowry yöntemine göre yapılmıştır [65]. Lowry protein tayini yapmamızdaki amaç ölçümün basit, hızlı ve spesifikliğinin yüksek olmasıdır. Hızlı ölçümler, çalışma sırasındaki bekleme zamanını azaltarak proteolizin olumsuz etkisini önler.

Bu yöntemde iki farklı reaksiyon meydana gelir.

- Birinci reaksiyon biüret reaksiyonu olup Cu^{+2} iyonlarının peptit azotlarına bağlanması ve Cu^{+1} iyonuna indirgenmesi aşamasıdır.
- İkinci reaksiyonda ise indirgenmiş olan Cu^{+1} iyonlarının alkali koşullarda, fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisi (Folin-Ciocalteu reaktifi) ile proteinlerdeki fenolik amino asitlerle (Tyr, Trp, Cys) tepkime vererek mavi renkli bir kompleks oluşturmasıdır. Oluşan rengin şiddeti protein yoğunluğu ile doğru orantılı olup 750 nm’de spektrofotometrik olarak kuvvetli absorbanza sahiptir.

Kullanılan reaktifler

A reaktifi: %2'lik Na₂CO₃ içinde 0,1 N'lik NaOH bileşiği

B1 reaktifi: %2'lik Na-K tartarat bileşiği

B2 reaktifi: %1'lik CuSO₄ bileşiği

Folin ciocalteu's fenol

Standart: 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır.

C solüsyonu: 1 ml B1+ 1 ml B2+ 33 ml A solüsyonu ile oluşturulmuştur.

Folin reaktifi: 1 hacim Folin ciocalteu's fenol + 1 hacim distile su ile hazırlanmıştır.

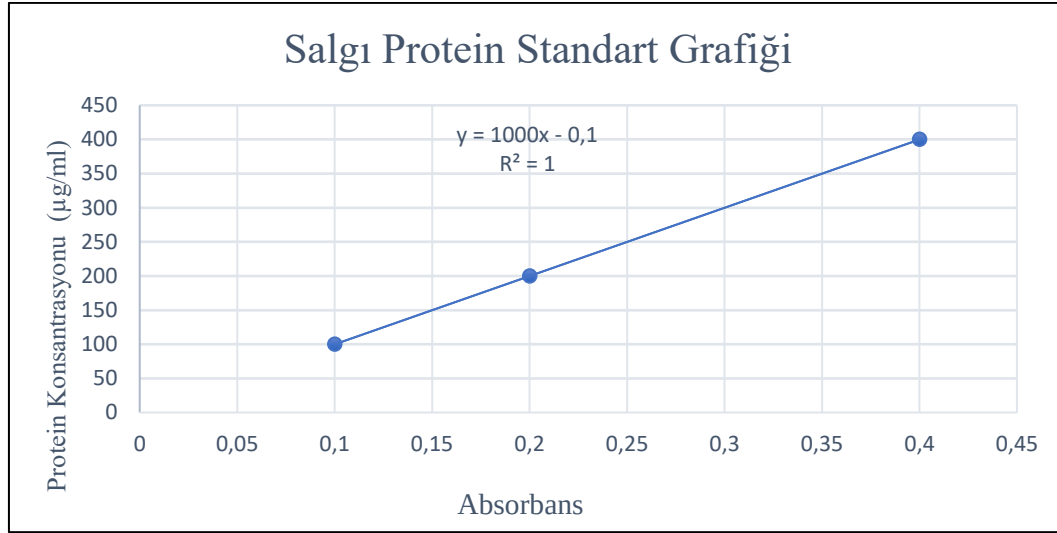
Uygulama basamakları

1. Standart 1, standart 2, standart 3 olmak üzere 3 farklı tüpe standartlar hazırlanır. Sırayla 10µL, 20 µL, 40 µL BSA eklenir.
2. Örnek tüplerine 10 µL numune eklenir. Kör tüpüne 100 µL distile su eklenir.
3. Standart 1'e 90 µL, 2'ye 80 µL, 3'e 60 µL ve numunelere 90 µL olmak üzere distile su eklenir.
4. Tüm tüplere 2 mL C reaktifi ilave edilir.
5. Tüpler vortekslenir ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir.
6. Tüm tüplere 200 µL Folin-Fenol reaktifi eklenip ardından vortekslenir.
7. Oda sıcaklığında 45 dakika kadar bekletilir.
8. Absorbanslar 750 nm'de köre karşı okutulur.
9. Protein miktarları oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplanır. (Şekil 3.2)

Hesaplama

Protein miktarı: (Numune Absorbansı / Standart Absorbansı) × standart konsantrasyonu

Sonuçlar µg/ml cinsinden hesaplanmıştır.



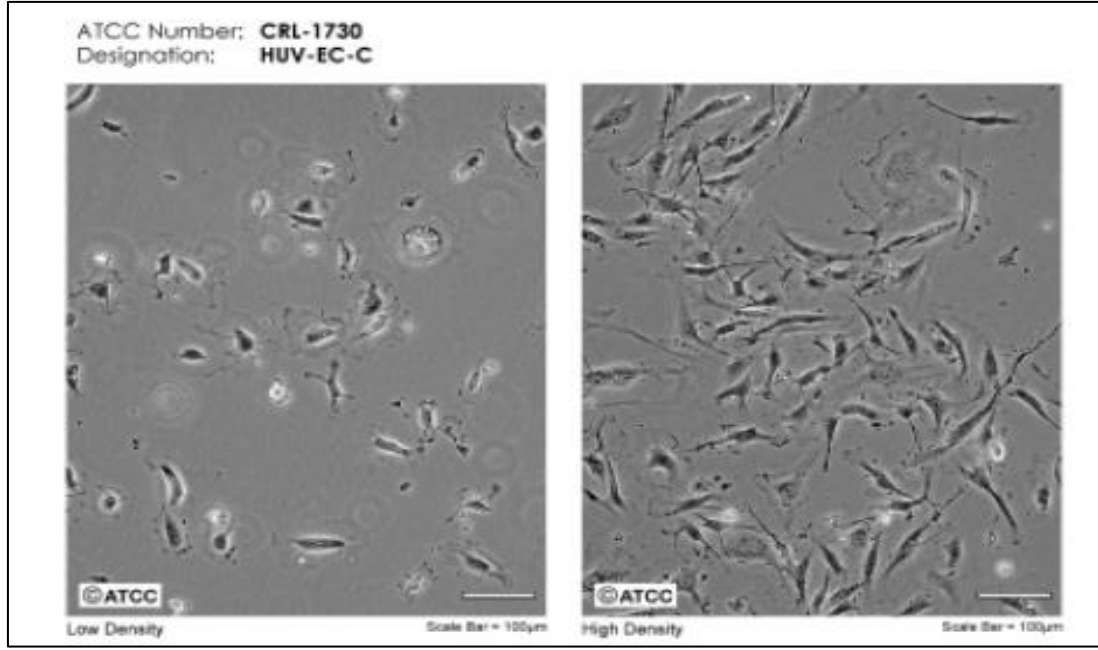
Şekil 3.2. Sülük salgı protein standart grafiği

3.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmalarda, ATCC firmasından HUVEC (ATCC® CRL-1730™), mezenkimal kök hücre (ATCC® PCS500-012™) ve meme fibroblast (ATCC® HTB125) hücre hatları temin edilerek kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. HUVEC hücre hattına ait bilgiler

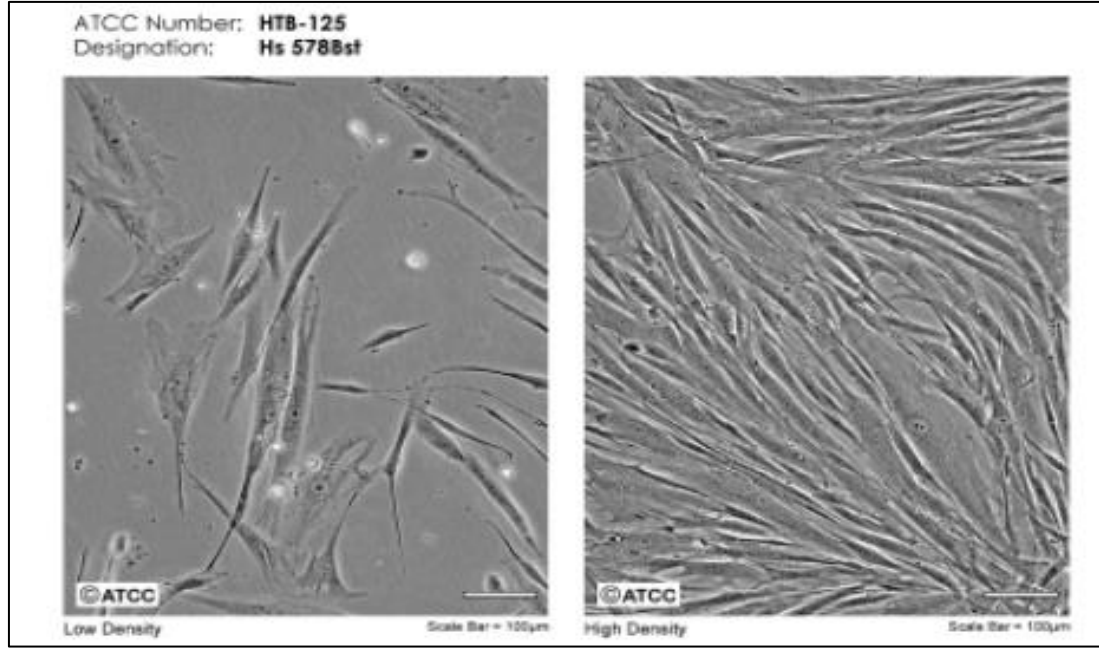
Hücre: HUVEC (Human Umbilical Veni Endothelial Cells)
ATCC Kodu: (ATCC® CRL-1730™),
Doku: Göbek bağı; Göbek bağı damarı, damar endotel
Hücre Tipi Endotelyal hücre
Morfolojisi: Endotelyal
Hastalık: Normal
Organizma: Homo sapiens-insan
Büyüme özelliği: Adherent(yapışan)



Şekil 3.3. HUVEC hücre hattı görüntüsü

Çizelge 3.4. Meme fibroblast hücre hattına ait bilgiler

Hücre: Meme fibroblast
ATCC Kodu: (ATCC® HTB125)
Doku: Meme; Meme bezi
Hücre Tipi: Epitelyal, miyoepitelyal hücre
Morfolojisi: Fibroblast
Hastalık: Normal
Organizma: Homo sapiens-insan
Büyüme özelliği: Adherent(yapışan)



Şekil 3.4. Meme fibroblast hücre hattı görüntüsü

Çizelge 3.5. Mezenkimal kök hücre hattına ait bilgiler

Hücre: Mezenkimal kök hücre

ATCC Kodu:(ATCC® PCS-500-012™)

Doku: Kemik

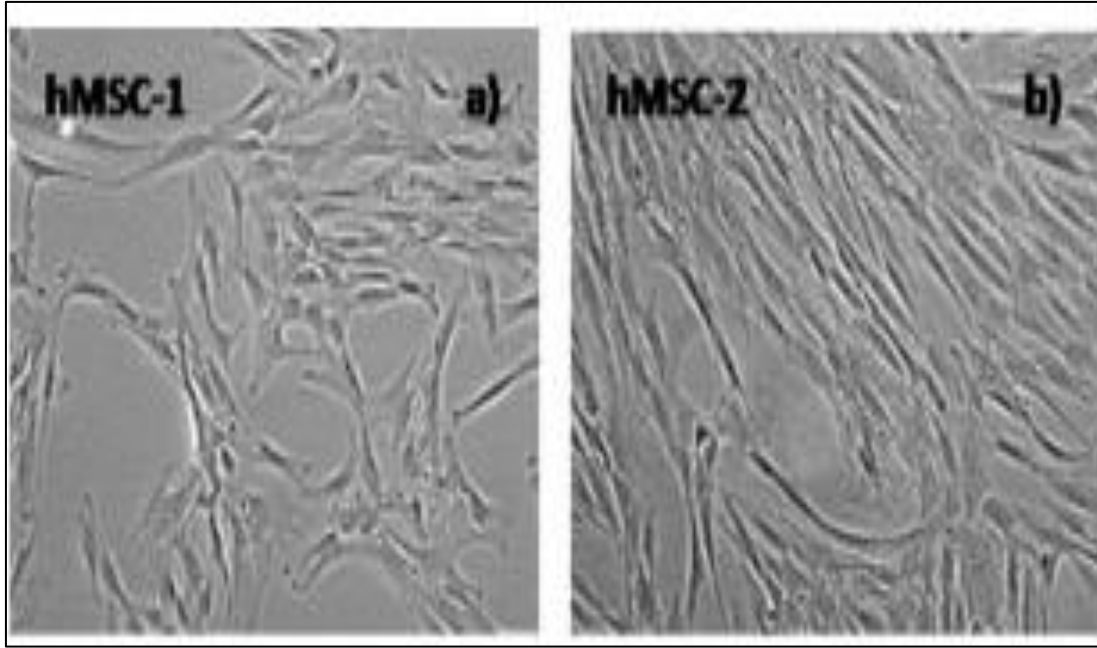
Hücre Tipi: mezenkimal kök hücre

Morfolojisi: İğ şeklinde, fibroblast benzeri

Hastalık: Normal

Organizma: Homo sapiens-insan

Büyüme özelliği: Adherent(yapışan)



Şekil 3.5. Mezenkimal kök hücre hattı görüntüsü

3.5. Çalışmanın Aşamaları

3.5.1. Hücrelerin çözülmesi

Hücreler üretici firma tarafından prosedürüne uygun olarak soğuk zincir ile laboratuvarımıza ulaştırıldı ve çözündürme işlemi uygulandı. Bunun için hücrelerin çözünmesi olana kadar 37°C'lik su banyosunda tutuldu. Çözünen hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne aktararak 5-6 ml %10 serumlu medyum ilave edildi ve 1000 rpm'de 5 dk kadar santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra dimetil sülfoksit (DMSO)'nun etkisinden kurtarmak amacıyla tekrar 5-6 ml %10 serumlu medyumla 1000 rpm'de 5 dk daha santrifüj edildi. Pellete az miktar %10 serumlu medyum eklenerek medyum konulmuş flasklara ekim yapıldı.

3.5.2. Hücre kültürünün hazırlanması

Araştırmada HUVEC, meme fibroblast ve mezenkimal kök hücre hatları kullanıldı.3 hücre hattı hücreleri için besi ortamı, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besi yeri, %10 FBS (fetal bovine serum) ve %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin eklenerek çoğaltıldı. Hücreler bu besi ortamını içeren 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda, iç ortamı %5 CO₂, %95 hava karışımı ve nem içeren ve 37°C olan inkübatör içinde tutularak ve haftada 3

kez rutin pasaj yapılarak üretildi. Çalışmamızda kullandığımız tüm hücre hatları adherent (zemine yapışarak çoğalan) kültür özelliğinde olduğu için hücre kültür kapları yatay bir şekilde konumlandırılarak inkübe edildi. Hücre pasajları için laminar akım kabini, hücre kültürleri incelemeleri için invert mikroskop, stokların depolanması için -80°C derin dondurucu kullanıldı.

3.5.3. Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması

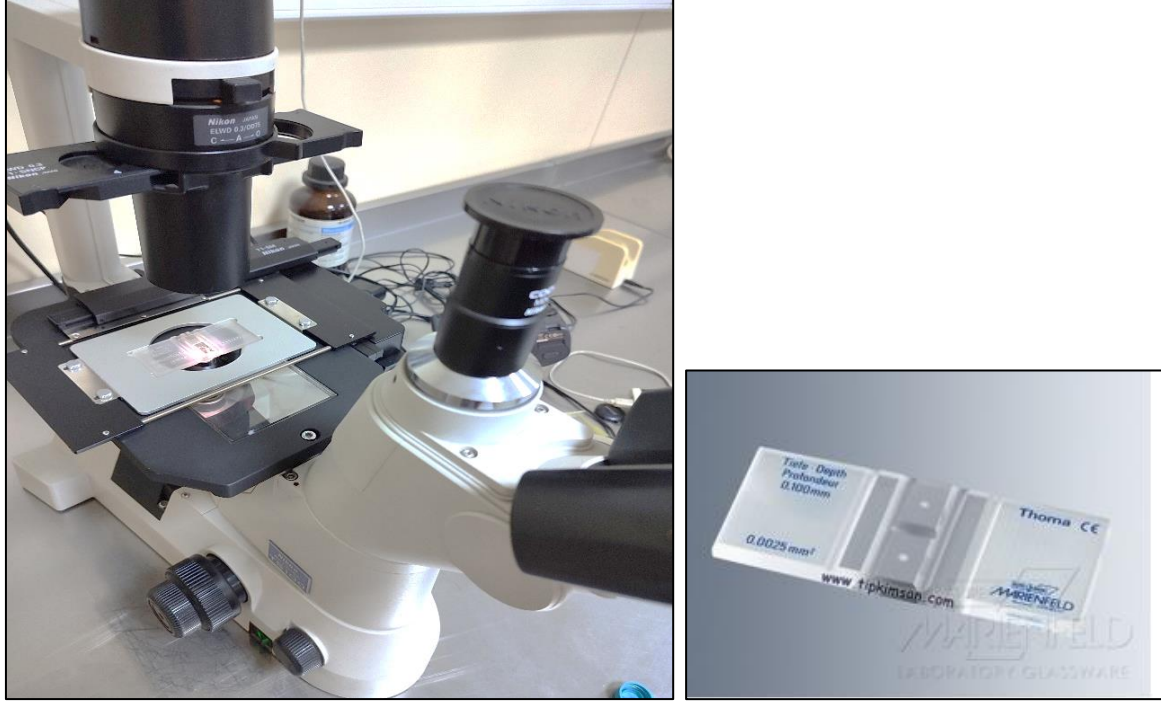
Hücreler, 25 cm²'lik flasklara aktarıldıktan sonra mikroskop altında değerlendirildi. %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıktaki etüvde steril şartlarda inkübe edilerek hücrelerin çoğaltılması sağlandı. Hücreler, 25 cm²'lik flasklarda 7ml, 75 cm²'lik flasklarda ise 14 ml %10 FBS içeren DMEM medyumunu içerisinde üretildi.

Bu işlem için; flasklar içerisinde hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştınca ortamdan medyum uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine %0,05'lik tripsinden küçük flasklara (25 cm²) 1-2 ml, büyük flasklara (75 cm²) 3-5 ml eklenerek, 37°C'lik CO₂ etüvde bekletildi ve hücrelerin zeminden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Yüzeyden ayrılan hücrelerde tripsini uzaklaştırmak için aynı miktarda FBS ilave edilerek tripsinin etkisi bloke edildi ve steril falkona toplanan hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Uygun hacimde medyumla süspanse edilen hücreler medyum konulmuş flasklara ekildi. Flasklar 37°C'lik %5 CO₂'li etüve inkübasyona kaldırıldı.

3.5.4. Hücre sayımı

Toplam hücre süspansiyonu içindeki canlı hücre sayısını tespit etmek için Thoma lamı (hematositometre) kullanıldı. Eppendorf tüpünde 10µl Trypan mavisini ve 10 µL hücre süspansiyonunu pipetaj yaparak karıştırıldı ve oda ısısında 5 dakika bekletildi. Hazırlanan karışım Thoma lamının her iki bölmesine 10 µL olacak şekilde paylaştırıldı. Invert mikroskop kullanılarak 16 eşit kareden oluşan Thoma lamının 4 bölmesinde bulunan hücrelerin ortalaması alınıp sayma işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.6.). Ölü hücreler mavi boyanırken canlı hücreler boyanamayacaktır. Mikroskop yardımıyla 10x objektif kullanılarak canlı (boyayı absorbe etmemiş) ve cansız (boyayı absorbe etmiş) hücreler sayıldı.

1ml'deki hücre sayısı=Sayılan hücre×Sulandırma kat sayısı (Trypan blue) $\times 10^4$ (Thoma lamının hacmi) göre hesaplandı.



Şekil 3.6. İnvirt mikroskop ve Thoma lamı görüntüsü

3.5.5. Hücrelerin dondurulup saklanması

Dondurarak saklama işlemi, hücrelerin çoğaltılması esnasında ihtiyaç durumuna göre planlandı. Dondurma işlemi hücrelerin canlılığının devam etmesi açısından son derece önemlidir. 3 hücre hattımıza da aynı işlemler uygulandı. Pasajlama sırasındaki basamaklara benzer şekilde hücreler önce tripsinle kaldırıldı. Santrifüj işlemi yapıldı ve sonrasında elde edilen pelet medyum (%20 FBS, %10 DMSO içeren) ile homojenize edilmesi sağlandı. Ardından canlılık kontrolü ve hücre sayımı için örnek alındı. Örneğe, tripan mavisi eklenerek hematositometre kullanılarak invert mikroskopta incelendi. Daha önceden hazırlanmış olan ve %20 FBS, %10 DMSO içeren dondurma medyumunu ile hücreler 0°C'ye dayanıklı kriyo tüplere alındı. Bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Hücrelerin içindeki suyu korumak amacıyla bu işlemde yavaş dondurma modeli uygulandı. Tedarikçi firmanın dondurma prosedürünü uygulanarak, -80°C de derin dondurucuda muhafaza edilmesi sağlandı. En sonunda da -196 °C'deki sıvı azot tanklarında muhafaza edildi.

3.6. Hücre Kültüründe MTT Testi ile Hücre Canlılığı ve Proliferasyonunun Değerlendirilmesi

Günümüzde en yaygın kullanılan hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksite belirleme yöntemlerinin başında MTT testi gelmektedir. Mosmann tarafından 1983'te geliştirilen yöntem, hücre canlılığı testlerinin "altın standardı" olarak adlandırılmaktadır [66]. MTT sarı renkli bir formazan tuzdur ve kimyasal yapısı Şekil 3.7'de gösterilmiştir. 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi, genellikle hücre canlılığını ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Mitokondrilerde bulunan dehidrogenazların aktivitesini hızlı bir şekilde ölçer. Prolifere olan hücrelerin tetrazolyum ile formazan ürünleri oluşturması esasına dayanır ve oluşan renk değişimi absorbans ölçümü ile değerlendirilir. Hücre canlılığı kaybolduğunda mitokondriyal fonksiyon ve sonuç olarak tetrazolyum tuzunu formazan kristallerine çevirebilme yeteneği azalır. Birçok hücrede hücre sayısı ile orantılı bir şekilde formazan miktarı değişir ve bu miktar değişimiyle hücre canlılığı tespit edilir [67]. Oluşan bu kristaller dimetil sülfoksit (DMSO)'da veya izopropil alkolde çözünür. Daha sonra hücre canlılığı spektrofotometrik olarak belirlenir ve uygulama yapılmayan hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, uygulama yapılan hücrelerin canlılığı bu hücrelere göre yüzde (%) olarak belirlenir.



Şekil 3.7. MTT'nin kimyasal yapısı

3.6.1. MTT testi

Tıbbi sülük salgı ekstraktının hücre hatları üzerindeki olası sitotoksik etkisi MTT kiti ile üretici firmanın prosedürüne göre uygulandı. Tıbbi sülük salgısı koyulmayan hücre grubu

kontrol grubu olarak seçilmiştir. 24 ve 48 saatlik maruziyet sonrasında, kuyucuklara DMEM içerisinde hazırlanmış 20 µl MTT solüsyonu (%5'lik) eklenmiştir. Kültür kabındaki hücreler 3 saat 37 °C'de inkübatörde bekletilmiş ve daha sonra içerisinde MTT solüsyonu bulunan besi yeri aspire edilmiştir. Süre sonunda MTT ile oluşan formazan kristallerini çözmek için kuyucuklara 100'er µL isopropil alkol eklenerek 15 dakika inkübasyon yapılmıştır. Her bir kuyucuk mikroparka okuyucu ile 570 nm dalga boyunda okutulmuştur (Şekil 2.5). Okunan absorbans değerlerine göre hücre canlılığı ve sitotoksite düzeyleri şu formüllere göre hesaplanmıştır:

Hücre canlılığı (%) = (Ortalama doğrulanmış muamele kuyucuğunun absorbans değeri/Ortalama doğrulanmış kontrol kuyucuğunun absorbans değeri) X100.

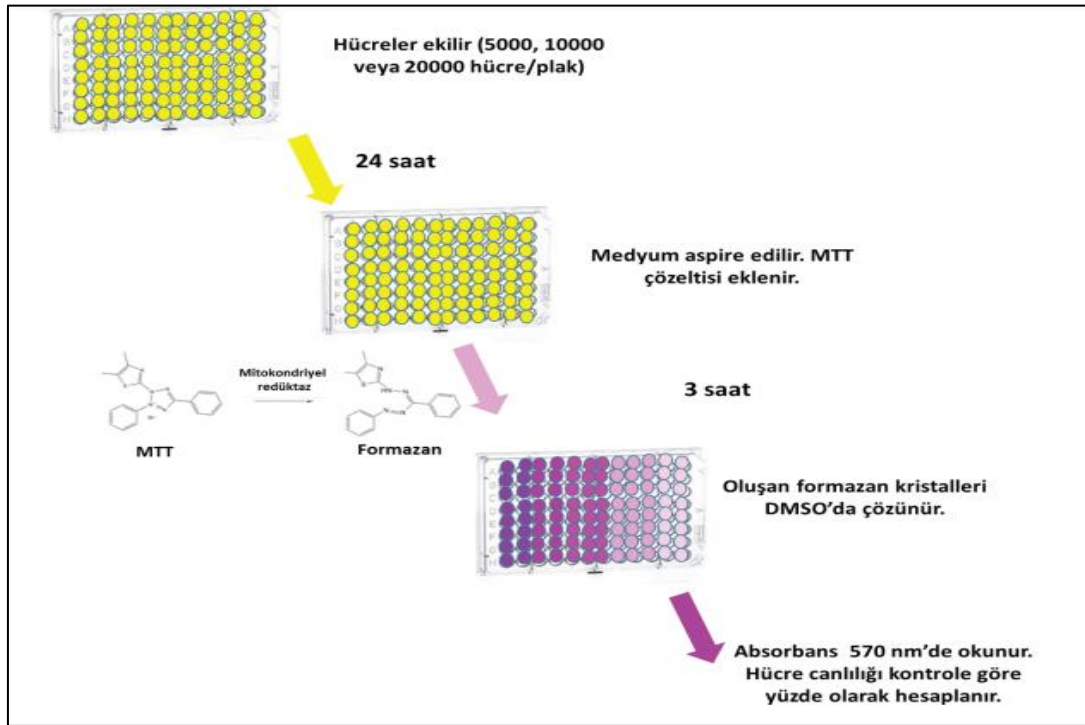
Sitotoksiste (% İnhibisyon) = 100- (Ortalama doğrulanmış muamele kuyucuğunun absorbans değeri/Ortalama doğrulanmış kontrol kuyucuğunun absorbans değeri) X100

Kontrol kuyucuklarından elde edilen değerlerin ortalaması %100 canlı hücre olarak kabul edilmiştir. Muamele edilen kuyucuklardan elde edilen değerleri kontrol değerlere oranlanarak yüzde olarak hücre canlılığı ve sitotoksiste değeri belirlenmiştir.

Hücrelerin 96 kuyucuklu plakaya 24 ve 48 saatler için her bir kuyucuğa 2×10^4 hücre ekildi. Kuyulara (kontrol kuyuları hariç) 24 ve 48 saat için tıbbi sülük salgı ekstraktının seri dilüsyonla hazırlanmış (400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml) farklı konsantrasyonları uygulandı.

1. Kontrol kuyucuklarına 100 µl DMEM pipetlendi.
2. Hücre kuyucuklarına 100 µl (%10 fetal bovine serum+ medyum içeren hücreli medyum) pipetaj yapılarak pipetlendi ve farklı dozları ayarlanan 100 µl Tıbbi sülük salgı ekstraktları 24 saat sonra pipetlenerek inkübatöre kaldırıldı.
3. 24 ve 48 saat için ayrı ayrı plakalar hazırlandı.
4. Gerekli zaman dilimleri dolduğunda, 20 µl MTT solüsyonu multikanal pipetle tüm kuyucuklara pipetlendi. 3-4 saat %5 CO₂ inkübatörde inkübasyona kaldırıldı.
5. Tüm kuyucukların içerikleri nazıkçe multikanal pipetle aspire edildi.

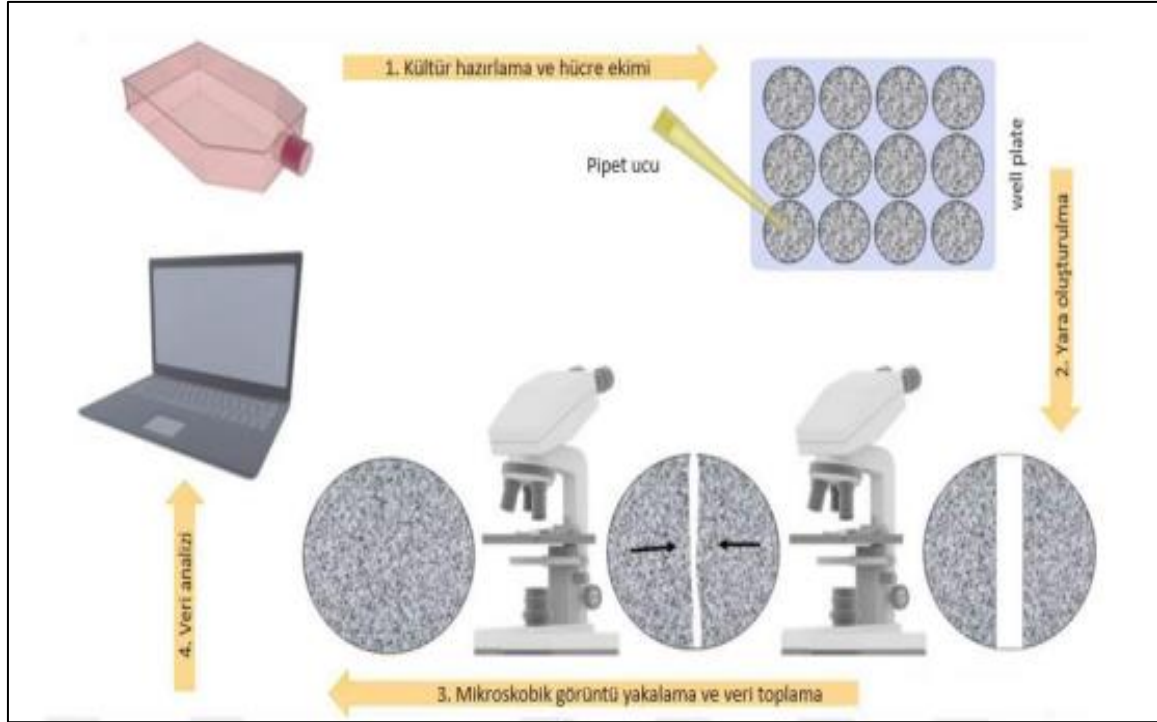
6. 100 µl 0,04 N isopropil alkol/HCl çözeltisi tüm kuyucuklara pipetlendi. (MTT solüsyonu ile hücrelerin reaksiyonu sonucu oluşan formazan kristalleri isopropil alkol/HCl çözeltisi ile çözünür hale getirilir.)
7. Plate yaklaşık 2 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
8. Eliza readerda $A_{570\text{ nm}}-A_{630\text{ nm}}$ 'de absorbans ölçümü yapıldı.
9. Sigma'nın MTT kiti (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma) kullanıldı.



Şekil 3.8. MTT testinin yapılış şeması

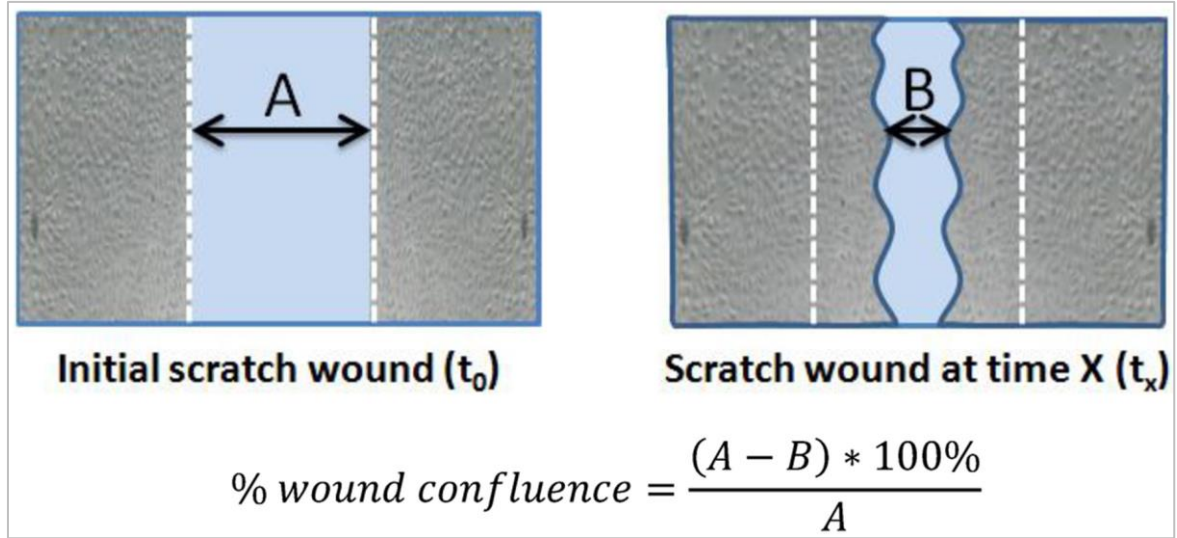
3.7. Yara İyileşme Modeli

Çizilme (strach) deneyi olarak da bilinen yara iyileşme modeli, *in vitro* iki boyutlu hücre migrasyonu araştırmak için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde, birleşen hücrelerin tek tabakasında yapay bir boşluk oluşturulup hücrelerin hareketi mikroskop ile izlenmektedir. Bu çalışmada, fiziksel dışlama veya hücrelerin mekanik, termal veya kimyasal hasar yoluyla alandan çıkarılmasıyla birleşik tek tabakada hücresiz bir alan oluşturulur. Hücresiz alana maruz kalma, hücrelerin boşluğa göç etmesine neden olur. Deneysel koşullar altında toplu hücre göçünü değerlendirmek ve ölçmek için uygun, kolay ve ekonomik bir yöntemdir. Şekil 3.9'da yara iyileşme modelinin prosedürü özetlemektedir [68, 69].



Şekil 3.9. Yara iyileşme testinin prosedürü ve testin temel adımları, 1) hücre hazırlanması ve hücre ekimi; 2) hücrelerde yara oluşturma; 3) belirli zaman noktalarında mikroskopik görüntü yakalama ve boşluk ölçümü yoluyla veri toplama 4) veri analizi

6 kuyucuklu plakanın her kuyusuna 30000 hücre/kuyucuk içeren 100 μ l besi yeri eklenerek, her kuyunun son hacmi 500 μ l olarak belirlendi. 3 hücre hattımız için ayrı 6 kuyucuklu plakaya hücre ekimi yapıldı. Kuyulardaki hücreler tabanı tamamen kapatana kadar, yaklaşık 48 saat inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrası kuyular 20 μ l pipet ucu kullanılarak aynı yönde düz çizgi çizilerek oluşturulan yara modelleri PBS ile yıkandı. Kuyuların 0. saat görüntüsü alındı. Kuyulara hazırlamış olduğumuz salgı konsantrasyonları eklendi. 0.saatten itibaren 48. saate kadar kuyuların görüntüleri alınıp kayıt edildi. Yara açıklığı mesafesi μ m olarak ölçüldü. Yara iyileşme modelinde hücre migrasyonu kuyulardaki 0. saatteki yara açıklığından, 24. saatteki veya 48. saatteki yara açıklığı çıkarılmasıyla hesaplanarak rölatif hücre motilitesi olarak ifade edildi.



A: İlk yara genişliği, B: Zamana bağlı yara genişliği (0. 8.,24. ve 48.saatler).

Şekil 3.10. Yara kapanmasının % hesaplaması [70]

3.8. Real Time PCR(RT-PCR) ile Hücrelerin Farklı Gen Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi:

Kantitatif Gerçek Zamanlı – Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-PCR). RT-PCR; DNA ya da mRNA örneklerinin çoğaltılarak eş zamanlı olarak görünür hale getiren ve ürünlerin miktarını tespit etmede kullanılan bir yöntemdir. RT-PCR metodunun kullanımı ile gen ekspresyonlarının belirlenmesi çok az miktarda biyolojik örnek kullanılarak güvenilir ve hassas bir şekilde ortaya koyulabilmektedir.

3.8.1. RT-PCR öncesi hücre kültürü

Doku kültür kapları içinde hücre kültürü ile çoğaltılan hücreler ekilerek üzerlerine 1 ml DMEM solüsyonu eklendi. Örnekler yaklaşık 1×10^6 hücre sayısına ulaşana kadar inkübe edildi. Yeterli hücre üremesi sağlandıktan sonra her bir örnekten altı kuyucuk olacak şekilde 24 saatin sonunda doku kültür kabındaki hücreler RNA izolasyonu için 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine alınarak 1300 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası üstte kalan süpernatant uzaklaştırıldı ve örnekler 500 µl PBS eklenerek -80 °C'de RNA izolasyonu yapılana kadar bekletildi.

3.8.2. mRNA izolasyon prosedürü

mRNA izolasyonu GeneAll Hybrid-R ve RiboEx Kiti kullanılarak yapıldı. mRNA izolasyonunda daha önce hücre kültürü sonrası PBS içinde -80 °C’de saklanan hücre örnekleri kullanıldı. Hücreler oda ısısına gelene kadar bekletildi ve sonrasında aşağıdaki basamaklar izlendi.

1. 1ml Riboex i 10^6 hücre içeren hatların üzerine eklenip vorteks ya da pipetaj ile karıştırıldı.
2. 5 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. (Bu adım, nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışmasını sağlar. Homojenize numuneler -70°C’de en az bir ay süre ile saklanabilir.)
3. 4°C’de 12.000 x g’de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatantı yeni bir tüpe aktarıldı.
4. 1 ml RiboExTM başına 0,2 ml kloroform eklenip, 15 saniye kuvvetlice çalkalandı ve daha sonra 2 dakika oda ısısında inkübe edildi.
5. 12.000 x g’de 15 dakika 4°C’de santrifüjlendi, ardından süpernatantı temiz bir tüpe aktarıldı.
6. Numuneye Hybrid-R kitinde yer alan RB1 tamponundan 1 hacim eklendi ve santrifüj etmeden çevirerek iyice karıştırıldı.
7. Karışımın 700 ul’ye kadarı spin kolona aktarıldı.
8. Odada ısısında 30 saniye boyunca ≥ 10.000 x g’de santrifüjlendi.
9. Kolon yeni bir tüpe aktarıldı.
10. 500 µl SW1 Odada ısısında 30 saniye boyunca ≥ 10.000 x g’de santrifüjlendi.
11. Mini döndürme kolonuna 500 ul tampon RNW eklendi.
12. Odada ısısında 30 saniye boyunca ≥ 10.000 x g’de santrifüjlendi.
13. Yeni bir tüpe spin kolonu aktarıp 1 dakika boyunca ≥ 10.000 x g’de santrifüjlendi.
14. Mini spin kolonundaki zar üzerine 50 ~ 100 ul RNAaz içermeyen su eklendi ve 1 dakika beklendi.
15. Daha sonra oda ısısında 1 dakika boyunca ≥ 10.000 x g’de santrifüjlendi.

Elde edilen mRNA sonuçları SYNERGYH1 mikropate reader da ölçüldü ve bir sonraki çalışmaya kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

3.8.3. cDNA sentezi

mRNA molekülünden gen ekspresyon çalışması yapılabilmesi için öncelikli olarak tek zincirli RNA molekülünün revers transkriptaz enzimi ile çift zincirli hale getirilmesi gerekmektedir. Bu işlem için EntiLink 1st Strand cDNA sentez kiti kullanılarak protokole uygun olarak sentezlenmiştir. Total RNA her bir örneğe 2 ug\ ul olacak şekilde hesaplandı. Her bir örnek için toplam hacim 20 µl olacak şekilde 0,2 ml tüpler içinde BIO-RAD T100 Thermal Cyclerda çoğaltıldı. 0,2 ml.'lik reaksiyon tüplerine 2 ug RNA, 1 ul oligo (dT) ve toplam hacim 13 µl olacak şekilde steril su eklendi. 65 C°de 10 dakika tutularak primer ve mRNA'nın denatürasyonu sağlandı. Reaksiyon sonrası elde edilen cDNA sentez işlemi 95 C°de 5 dakika ısıtılıp sonrası buz üzerine alınarak tamamlandı. Elde edilen cDNA'lar -20 C°de saklandı.

3.8.4. RT-PCR

Elde edilen cDNA'dan master karışımı ve nükleaz içermeyen su ile hedef gen EGF, VEGF ve FGF, housekeeping gen olarak GAPDH RT- PCR cihazında amplifiye edildi. Çalışma 3 kez tekrar edildi. Elde edilen Ct (Crossing threshold) değerlerinin ortalaması alındı. $\Delta\Delta Ct$ metoduna göre (önce housekeeping gene daha sonra kalibratöre göre normalizasyon) ekspresyon düzeyleri belirtildi. Bu işlemle birlikte her örnekte hedef genler ve housekeeping gen duplike olarak amplifiye edilerek, hedef genlerin ortalama Ct değerleri housekeeping genlerden çıkarılarak normalize edilmiş olur. Ayrıca yapılan tüm örneklerin median Ct değerleri alınır ve bu kalibratör olarak kabul edilerek tüm değerlerin normalize edilmiş Ct değerleri (delta Ct), kalibratörün delta Ct değerlerinden çıkarılır ve bu değer PCR verimliliğini temsil eden 2' eksi kuvveti alınarak ekspresyon düzeyi belirlenir, böylelikle deneyler arasındaki farklılıkların da önüne geçilmiş olur. Gen ifade düzeyi çalışmalarında önce $\Delta\Delta Ct$ değerleri; sonra $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplandı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ kat ifadesidir.

Metod olarak rölatif kantitasyon yöntemi kullanıldı. Rölatif kantitasyon işlemi için SYBR Green I kullanıldı. Hücrelerin RT-PCR ile gen ekspresyonlarının değerlendirilmesinde EnTurbo SYBR Green PCR Supermix kiti ile protokole uygun olarak ve termal döngü cihazı (Applied Biosystem, Foster City, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

Real-Time PCR ısı döngüsü

95°C'de	1 dakika
95°C'de	15 saniye
60°C'de	1dakika
72°C'de	30 saniye

olmak üzere 35 siklus olarak ayarlandı. VEGF, EGF ve FGF gen ekspresyonlarının ölçümleri yapıldı.

3.8.5. RT-PCR'da kullanılan primerler

Housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı. Primer setleri Ncbi ve Primer 3 siteleri kullanılarak tasarlandı. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI-Gen Bankası) veri tabanı üzerinde bulunan primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dizi eşleştirme analizi ile tasarlanıp değerlendirildi. Çalışmamızda tabloda belirtilen primerler kullanıldı (Çizelge 3.6.)

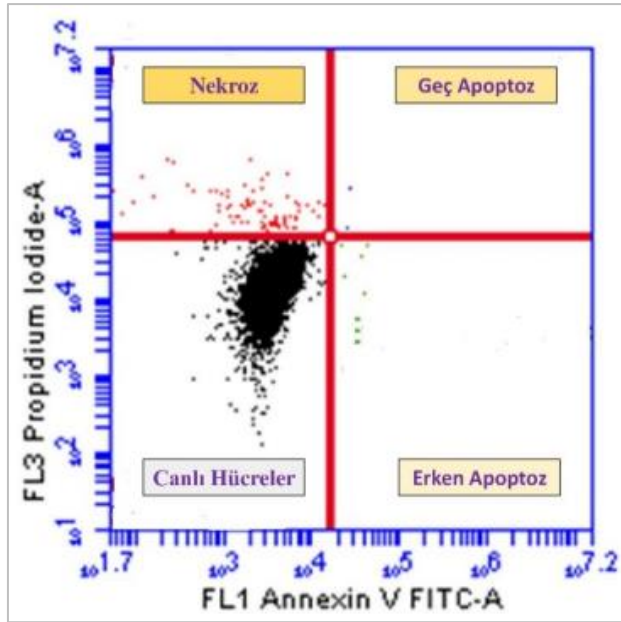
Çizelge 3.6. RT-PCR uygulamasında kullanılan primerler dizisi

Gen (Transkript)	Primer Sekansları (5'-3')
GAPDH Forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC
GAPDH Reverse	CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT
FGF Forward	AGTGTGTGCTAACCGTTACCT
FGF Reverse	ACTGCCCAGTTCGTTTCAGTG
VEGF Forward	AGGGCAGAATCATCACGAAGT
VEGF Reverse	AGGGTCTCGATTGGATGGCA
EGF Forward	GACAGGCCACCTCGTCG
EGF Reverse	TGCGTGAGCTTGTTACTCGT

3.9. Flow Sitometri ile Apoptoz Testi (Annexin V/ Propidium İyodür Boyaması)

Çalışmamızda Annexin V FITC Apoptosis Detection Kits (BD Pharmingen™ Cat. No: 556570) protokolüne uygun olarak aşağıdaki adımlar uygulandı. Öncelikle 3 hücre hattına ait hücreler 5×10^6 olacak şekilde T25 flasklara ekimi yapıldı. Hücreler %5 CO₂ içeren 37 °C' lik etüvde 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tıbbi sülük salgısı çalışmamızda kullandığımız doz aralığında hücreler üzerine uygulandı. Bir gün sonra

hücreler tripsinle muamele edilerek kaldırıldı. Kaldırılan hücreler 1500 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve pellet PBS (1ml) ile yıkaması yapıldı. PBS ile beraber tekrar 1500 rpm de 5 dakika kadar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pelletin üzerine 100 µL PBS eklenip karışmaları sağlandı. Hazırlanan flow tüplerinin içine 100µL hücrelerden ilave edildi. Üzerlerine 100 µL 1x Binding buffer (kit içerisinde bulunmakta) ilave edilerek çözüldü. Hücrelerin üzerine 5 µL FITC Annexin ve 5µL Propidium İyodür (PI) boya ları eklendi. Örnekler vortekslendikten sonra karanlık ortamda oda sıcaklığında (25°C) 15 dakika bekletildi. Bekleme süresi dolduktan sonra örneklerin üzerine 400 µL 1x Binding buffer ilave edildi ve vortekslenerek Flow sitometri cihazında analiz edildi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Canlı hücrelerin ve apoptotik hücre popülasyonlarının belirlenmesi

Analiz sonucunda apoptotik hücre (Erken apoptotik hücreler; Anneksin V pozitif- PI negatif, Geç apoptotik hücreler; Anneksin V pozitif- PI pozitif), nekrotik hücre (Anneksin V negatif- PI pozitif) ve canlı hücre (Anneksin V negatif- PI negatif) popülasyonları karşılaştırılıp tıbbi sülük salgısının hücrelerdeki apoptoz ve nekroza olan etkisi saptandı [61] (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Anneksin V / Propidium İyodür saptanma sonuçları

	Anneksin V	Propidium İyodür
Sağlıklı hücre popülasyonu	-	-
Erken dönem apoptotik hücre profilasyonu	+	-
Geç dönem apoptotik hücre profilasyonu	+	+
Nekrotik hücre popülasyonu	-	+

3.10. İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma ($\text{ort} \pm \text{ss}$) kullanılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile kontrol edilmiştir.

İkiden çok grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA), iki bağımsız grup ortalamasının karşılaştırılmasında Student's t testi kullanılmıştır. ANOVA sonucunda istatistiksel anlamlılık bulunması durumunda farkın kaynağını bulmak için çoklu karşılaştırma testi olarak Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır.

IBM SPSS 21 (IBM SPSS Inc, Chicago, IL) paket programı ile veriler analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık seviyesi 0,05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

4.1.1. Tıbbi sülük salgı ekstraktının HUVEC hücre hattı üzerine 24 -48 saat etkisinin MTT testi ile belirlenmesi

HUVEC hücre hattına uygulanan farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktlarının MTT sonuçlarının absorbans ortalamaları tek yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir.

HUVEC hücre hattına uygulanan farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktının 24.saatteki MTT absorbans ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak için Post-hoc testi olarak Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. 24.saatteki doz gruplarına ait absorbans ortalamalarının (400 $\mu\text{g/ml}$ ($0,75\pm0,03$), 200 $\mu\text{g/ml}$ ($0,87\pm0,03$), 100 $\mu\text{g/ml}$ ($0,78\pm0,03$), 50 $\mu\text{g/ml}$ ($0,87\pm0,04$)) kontrol grup absorbans ortalamasından ($1,18\pm0,05$) anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,001$).

HUVEC hücre hattına uygulanan farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktının 48.saatteki MTT absorbans ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak için Post-hoc testi olarak Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. 48.saatteki doz gruplarına ait absorbans ortalamalarının (400 $\mu\text{g/ml}$ ($1,05\pm0,10$), 200 $\mu\text{g/ml}$ ($1,12\pm0,03$), 100 $\mu\text{g/ml}$ ($1,07\pm0,07$), 50 $\mu\text{g/ml}$ ($0,92\pm0,05$)) kontrol grup absorbans ortalamasından ($1,45\pm0,09$) anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,001$).

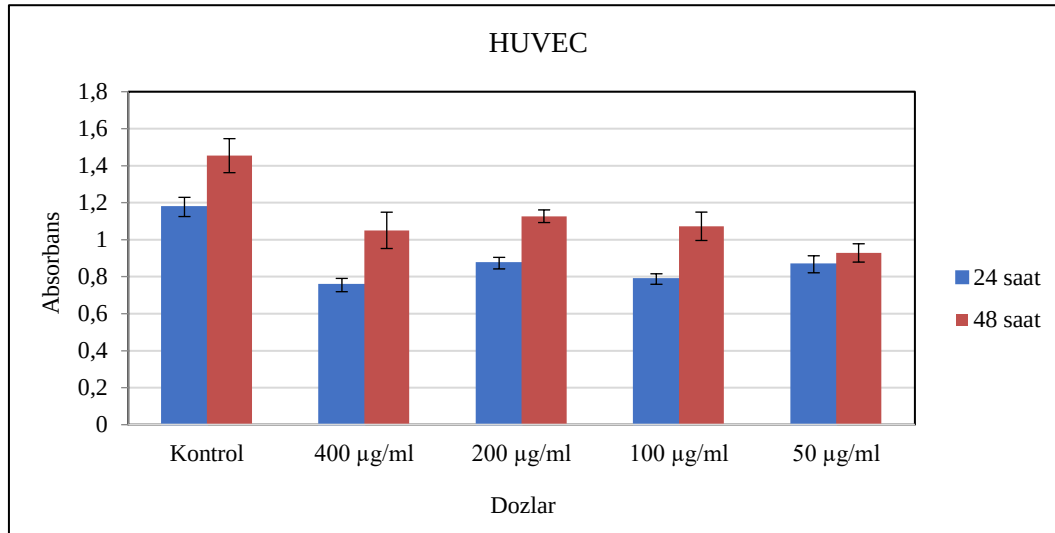
Aynı gruba ait 24. ve 48. saatteki HUVEC hücre hattı MTT absorbans ortalamaları bağımsız gruplarda t testi ile karşılaştırılmıştır. 48.saatteki grupların 24.saatteki gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Çizelge 4.1. HUVEC hücre hattına ait MTT absorbans sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması

HUVEC HÜCRE HATTI	GRUPLAR					p* değeri
	Kontrol (A)	400 µg/ml (B)	200 µg/ml (C)	100 µg/ml (D)	50 µg/ml (E)	
24 Saat Mean ± SD (n=6)	1,18±0,05	0,75±0,03	0,87±0,03	0,78±0,03	0,87±0,04	p<0,001 A>B, C, D, E
48 Saat Mean ± SD (n=6)	1,45±0,09	1,05±0,10	1,12±0,03	1,07±0,07	0,92±0,05	p<0,001 A>B, C, D, E
p**	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,035	

*: Farklı dozlarda tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulanan gruplara ait absorbans sonuçlarının kendi aralarında karşılaştırılması

** : Aynı gruba ait 24 ve 48.saatteki absorbans sonuçlarının birbirleriyle karşılaştırılması



Şekil 4.1. HUVEC hücre hattına ait 24. ve 48. saatine ait MTT sonuçlarının absorbans grafiği

4.1.2. Tıbbi sülük salgı ekstraktının meme fibroblast hücre hattı üzerine 24-48 saat etkisinin MTT testi ile belirlenmesi

Meme fibroblast hücre hattına uygulanan farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktlarının MTT sonuçlarının absorbans ortalamaları tek yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir.

Meme fibroblast hücre hattına uygulanan farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktının 24.saatteki MTT absorbans ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür (p<0,001). Anlamlı farkın kaynağını bulmak için Post-hoc testi olarak Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. 24.saatteki doz gruplarına ait absorbans ortalamalarının (400 µg/ml (0,69±0,07), 200 µg/ml (0,69±0,07), 100 µg/ml (1,22±0,13), 50

$\mu\text{g/ml}$ ($0,75\pm0,24$)) kontrol grup absorbands ortalamasından ($0,56\pm0,07$) anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Meme fibroblast hücre hattına uygulanan farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktının 48.saatteki MTT absorbands ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak için Post-hoc testi olarak Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. 48.saatteki doz gruplarına ait absorbands ortalamalarının ($400 \mu\text{g/ml}$ ($0,41\pm0,03$), $200 \mu\text{g/ml}$ ($0,44\pm0,02$), $100 \mu\text{g/ml}$ ($0,63\pm0,05$), $50 \mu\text{g/ml}$ ($0,57\pm0,03$)) kontrol grup absorbands ortalamasından ($0,35\pm0,07$) anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. $100 \mu\text{g/ml}$ dozunun diğer absorbands ortalamalarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

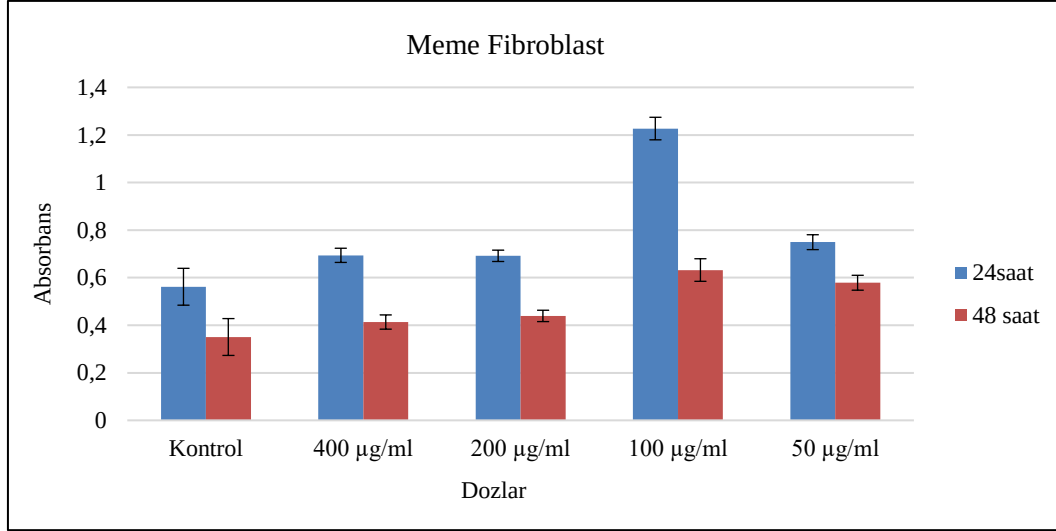
Aynı gruba ait 24. ve 48. saatteki meme fibroblast hücre hattı MTT absorbands ortalamaları bağımsız gruplarda t testi ile karşılaştırılmıştır. 24.saatteki grupların 48.saatteki gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Çizelge 4.2. Meme fibroblast hücre hattına ait MTT absorbands sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması

MEME FİBROBLAST HÜCRE HATTI	GRUPLAR					p*değeri
	Kontrol (A)	$400 \mu\text{g/ml}$ (B)	$200 \mu\text{g/ml}$ (C)	$100 \mu\text{g/ml}$ (D)	$50 \mu\text{g/ml}$ (E)	
24 Saat Mean $\pm$ SD (n=6)	$0,56\pm0,07$	$0,69\pm0,07$	$0,69\pm0,07$	$1,22\pm0,13$	$0,75\pm0,24$	$p<0,001^*$ A<B, C, D, E
48 Saat Mean $\pm$ SD (n=6)	$0,35\pm0,07$	$0,41\pm0,03$	$0,44\pm0,02$	$0,63\pm0,05$	$0,57\pm0,03$	$p<0,001$ A<B, C, D, E
p**	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p=0,035$	

*: Farklı dozlarda tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulanan gruplara ait absorbands sonuçlarının kendi aralarında karşılaştırılması

** : Aynı gruba ait 24 ve 48.saatteki absorbands sonuçlarının birbirleriyle karşılaştırılması



Şekil 4.2. Meme fibroblast hücre hattına ait 24. ve 48. saatine ait MTT sonuçlarının absorbans grafiği

4.1.3. Tıbbi sülük salgı ekstraktının mezenkimal kök hücre hattı üzerine 24-48 saat etkisinin MTT testi ile belirlenmesi

Mezenkimal kök hücre hattına uygulanan farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktlarının MTT sonuçlarının absorbans ortalamaları tek yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir.

Mezenkimal kök hücre hattına uygulanan farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktının 24.saatteki MTT absorbans ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak için Post-hoc testi olarak Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. 24.saatteki doz gruplarına ait absorbans ortalamalarının (400 µg/ml ($0,21\pm0,04$), 200 µg/ml ($0,28\pm0,05$), 100 µg/ml ($0,37\pm0,03$), 50 µg/ml ($0,38\pm0,05$)) kontrol grup absorbans ortalamasından ($0,50\pm0,07$) anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,001$).

48.saatteki MTT absorbans ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak için Post-hoc testi olarak Bonferroni düzeltmesi kullanılmıştır. 48.saatteki doz gruplarına ait absorbans ortalamalarının (400 µg/ml ($0,41\pm0,04$), 200 µg/ml ($0,43\pm0,03$), 100 µg/ml ($0,52\pm0,06$), 50 µg/ml ($0,67\pm0,03$)) kontrol grup absorbans ortalamasından ($0,74\pm0,08$) anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,001$).

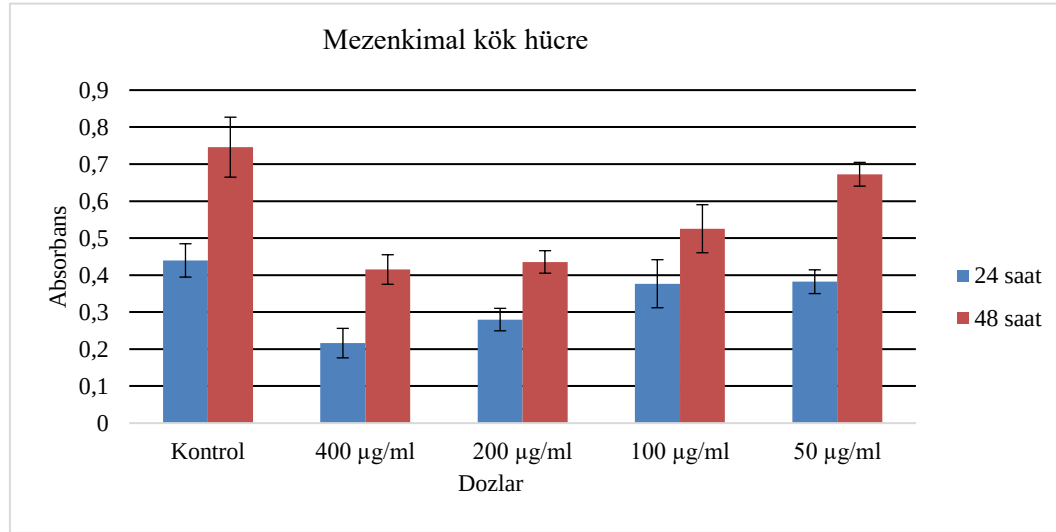
Aynı gruba ait 24. ve 48. saatteki mezenkimal kök hücre hattı MTT absorbans ortalamaları bağımsız gruplarda t testi ile karşılaştırılmıştır. 48.saatteki grupların 24.saatteki gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Çizelge 4.3. Mezenkimal kök hücre hattına ait MTT absorbans sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE HATTI	GRUPLAR					p*değeri
	Kontrol (A)	400 µg/ml (B)	200 µg/ml (C)	100 µg/ml (D)	50 µg/ml (E)	
24 Saat Mean ± SD (n=6)	0,50±0,07	0,21±0,04	0,28±0,05	0,37±0,03	0,38±0,05	p<0,001 A>B, C, D, E
48 Saat Mean ± SD (n=6)	0,74±0,08	0,41±0,04	0,43±0,03	0,52±0,06	0,67±0,03	p<0,001 A>B, C, D, E
p**	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,035	

*: Farklı dozlarda tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulanan gruplara ait absorbans sonuçlarının kendi aralarında karşılaştırılması

** : Aynı gruba ait 24 ve 48.saatteki absorbans sonuçlarının birbirleriyle karşılaştırılması



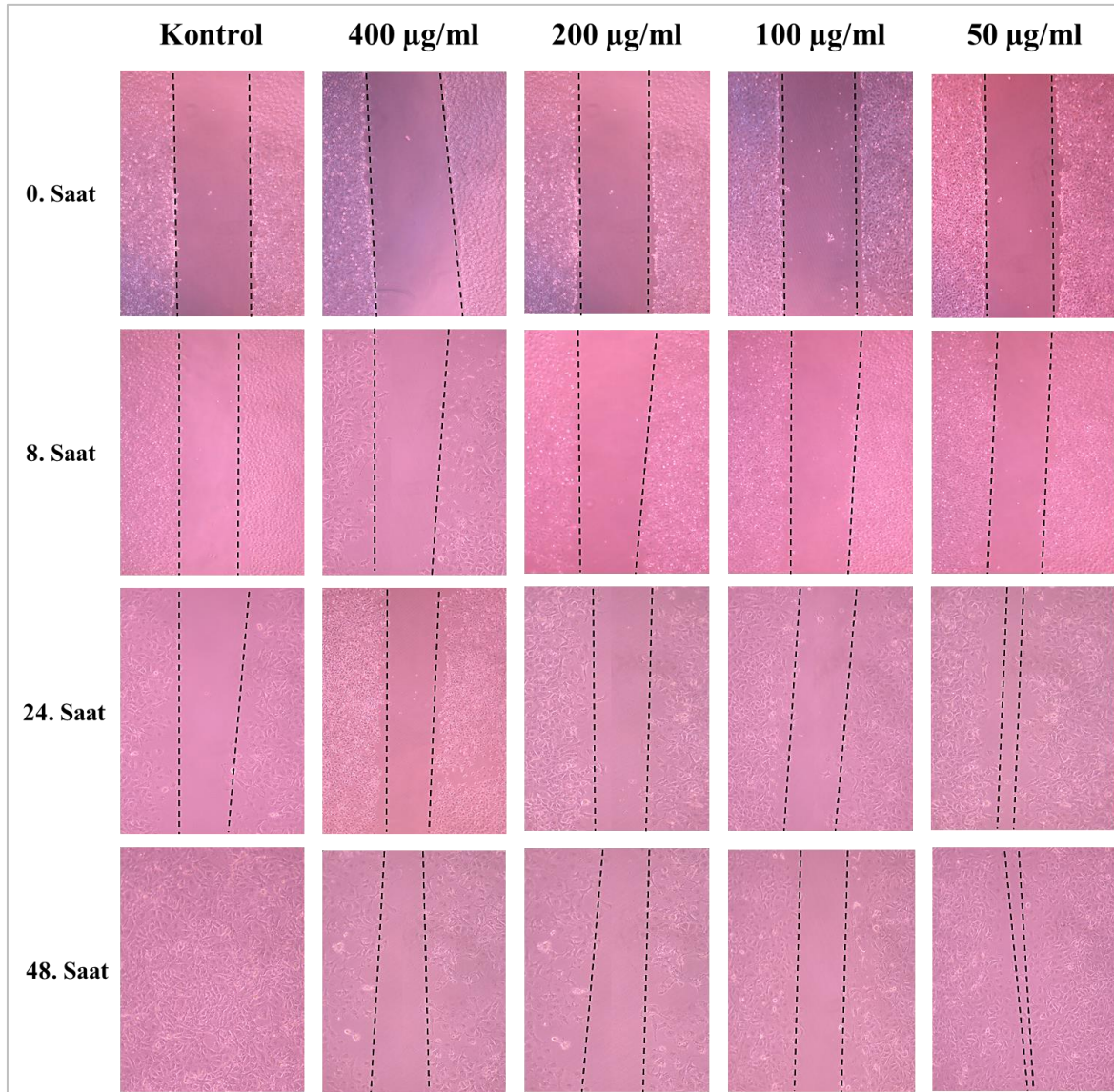
Şekil 4.3. Mezenkimal kök hücre hattına ait 24. ve 48. saatine ait MTT sonuçlarının absorbans grafiği

4.2. Yara Modelinde Proliferasyonun Belirlenmesi

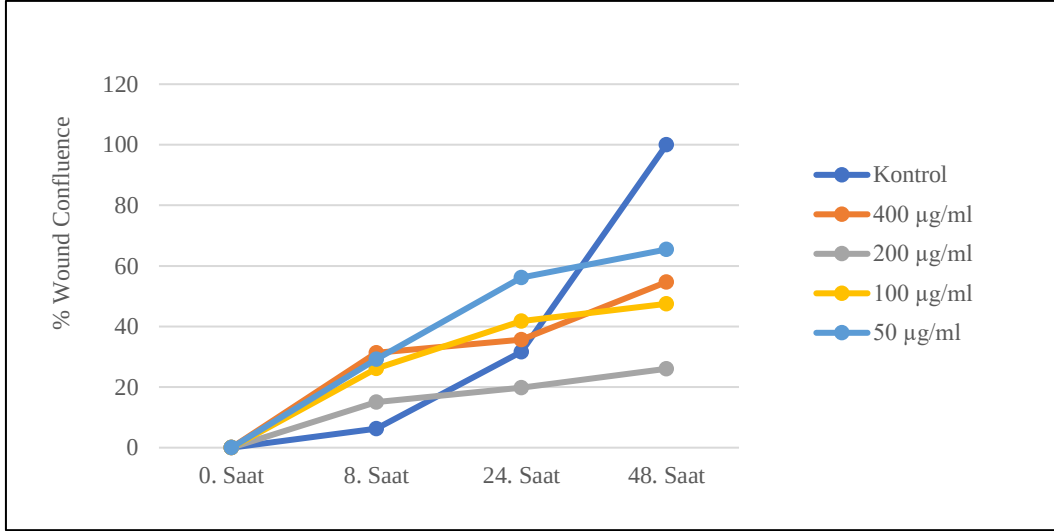
Ters ışık mikroskobu (invert) ile fotoğrafları çekilerek görüntüler elde edildi. Elde edilen görüntüler kontrolle karşılaştırılarak değerlendirildi.

4.2.1. Tıbbi sülük salgı ekstraktının HUVEC hücre hattı yara modeli bulguları

Tıbbi sülük salgı ekstraktıyla oluşturulan HUVEC hücre hattında yara modelinin 0., 8., 24. ve 48. saatlerde invert mikroskop altında fotoğrafları çekilerek görüntüler elde edildi. *İn vitro* yara modeli uygulamasında 50 µg/ml uygulanan dozun kontrol grubunda olduğu gibi 48. saatte tüm alanları hücreler ile kapattığı gözlemlenmiştir. Özellikle 48. saatte yara modelinde en hızlı etkiyi gösteren tıbbi sülük salgı ekstraktı dozumuz 50 µg/ml'dir.



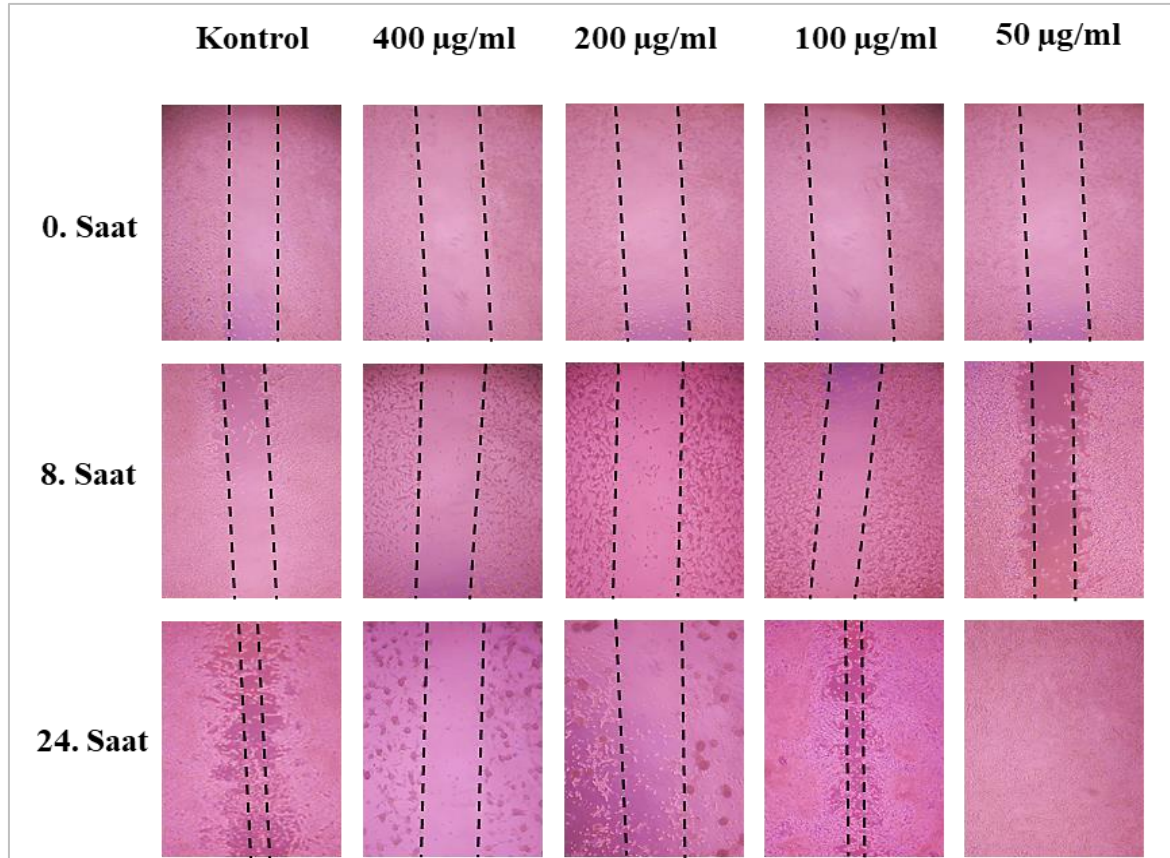
Şekil 4.4. İvert mikroskop ile HUVEC hücre hattında elde edilen yara modeli görüntüleri



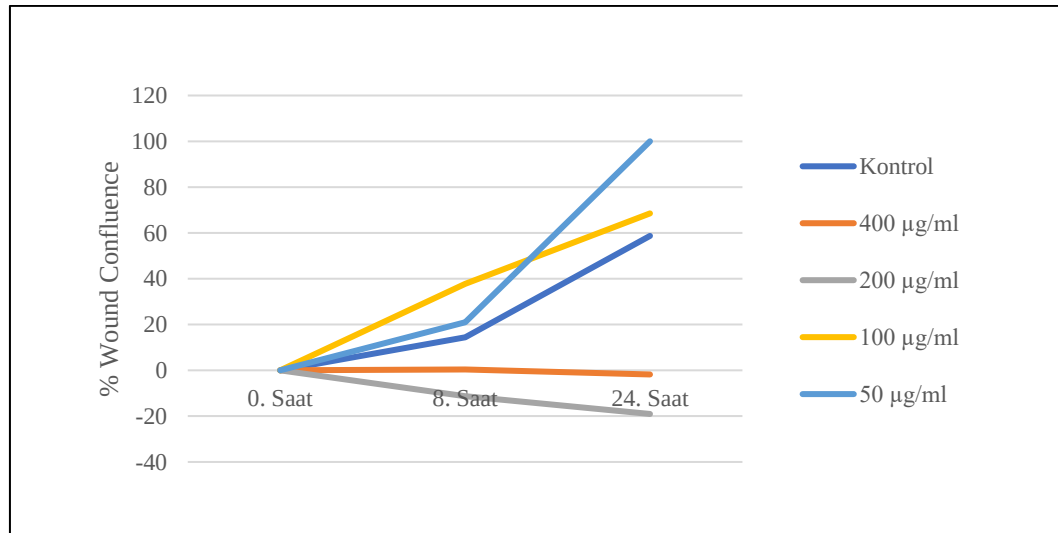
Şekil 4.5. HUVEC hücre hattında gruplara ait yara iyileşmesi grafiği

4.2.2. Tıbbi sülük salgı ekstraktının meme fibroblast hücre hattı yara modeli bulguları

Tıbbi sülük salgı ekstraktıyla oluşturulan meme fibroblast hücre hattı yara modelinin 0., 8. ve 24.saatlerde invert mikroskop altında fotoğrafları çekilerek görüntüler elde edildi. Farklı dozlarda sülük salgısı uygulanan meme fibroblast hücre hattında 50 µg/ml dozunun 24.saatte yara modelini kapattığını gözlemledik. Kontrol grubu ve diğer dozlarda 24.saatte yara bölgesinde bir miktar kapanma olmasına rağmen, 50 µg/ml dozunda olduğu gibi tam kapanma olduğunu bulduk. meme fibroblast hücre hattında *in vitro* yara modeli uygulamasında en hızlı etki gösteren doz 50 µg/ml'dir.



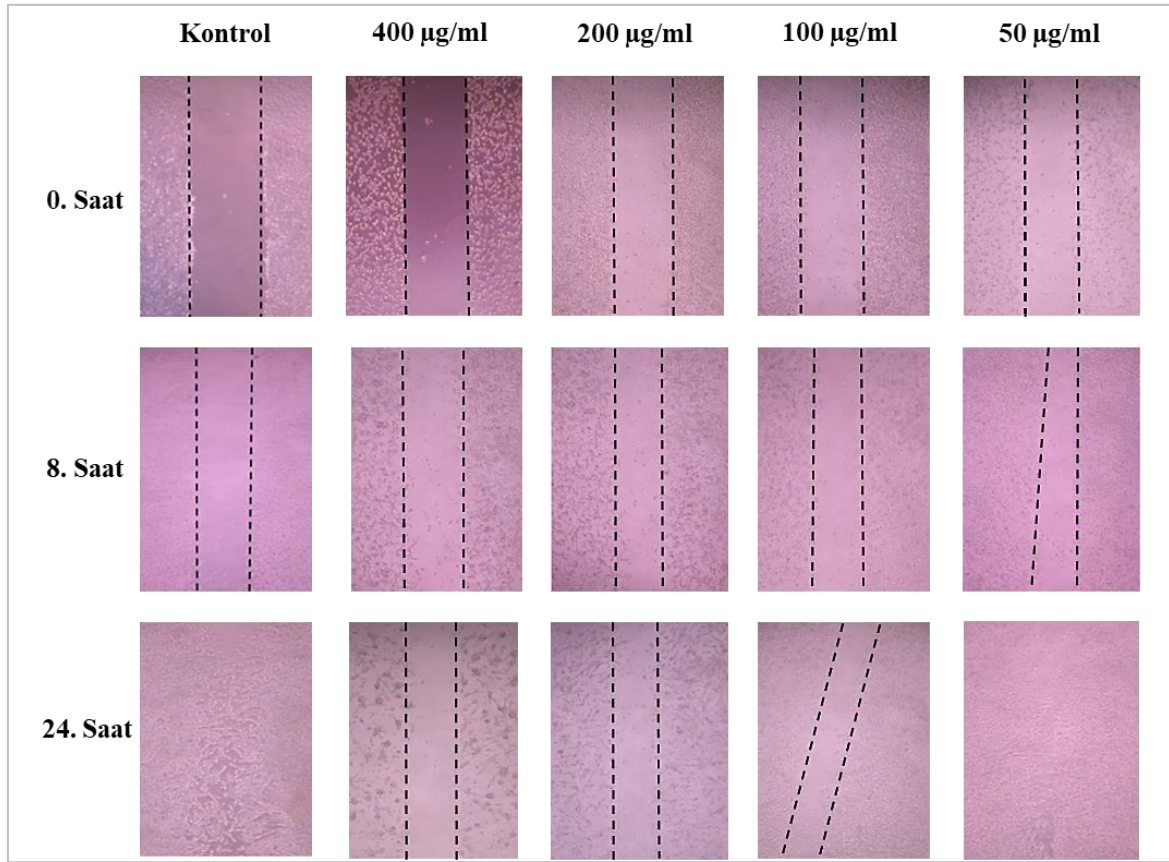
Şekil 4.6. İnvirt mikroskop ile meme fibroblast hücre hattında elde edilen yara modeli görüntüleri.



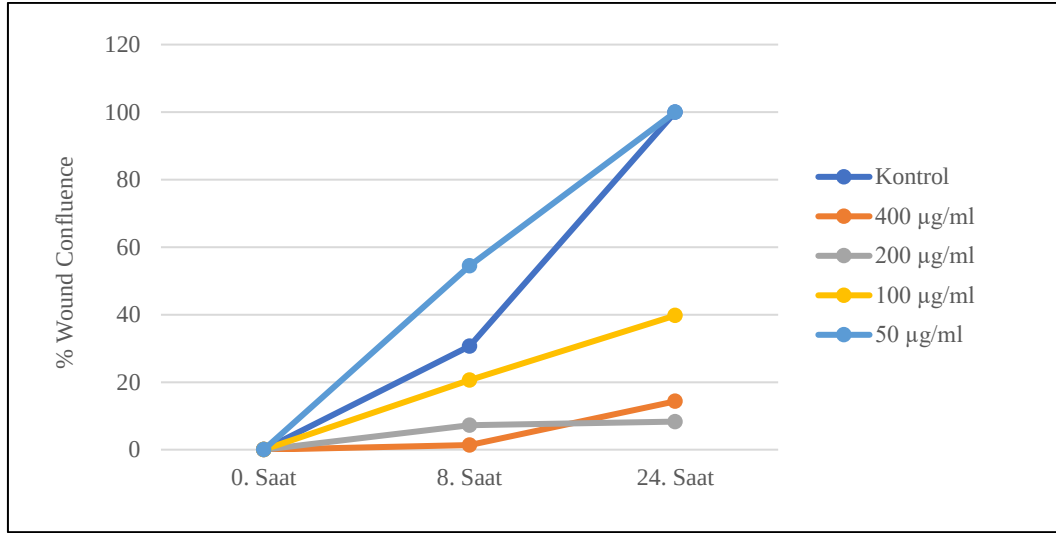
Şekil 4.7. Meme fibroblast hücre hattında gruplara ait yara iyileşmesi grafiği

4.2.3. Tıbbi sülük salgı ekstraktının mezenkimal kök hücre hattı yara modeli bulguları

Tıbbi sülük salgı ekstraktıyla oluşturulan mezenkimal kök hücre hattı yara modelinin 0., 8. ve 24. saatlerde invert mikroskop altında fotoğrafları çekilerek görüntüler elde edildi. *İn vitro* yara modeli uygulamasında 50 µg/ml uygulanan dozun kontrol grubunda olduğu gibi 24.saatte tüm alanları hücreler ile kapattığı gözlemlenmiştir. Özellikle 24.saatte yara modelinde en hızlı etkiyi gösteren tıbbi sülük salgı ekstraktı dozumuz 50 µg/ml'dir.



Şekil 4.8. İnvirt mikroskop ile mezenkimal kök hücre hattında elde edilen yara modeli görüntüleri.



Şekil 4.9. Mezenkimal kök hücre hattında gruplara ait yara iyileşmesi grafiği

4.3. RT-PCR Gen Ekspresyonu Bulguları

RT-PCR yöntemi ile HUVEC, meme fibroblast ve mezenkimal kök hücrelerinde anjiyogenez ve yara iyileşmesinde sorumlu tutulan olası gen ekspresyonları değerlendirilmiştir.

4.3.1. HUVEC hücre hattı RT-PCR sonuçları

HUVEC hücre hattında farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktının uygulanan gruplarda ve kontrol grubunda RT-PCR ile elde edilen m RNA gen ekspresyonu ortalamaları arasındaki fark tek yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir.

Grupların FGF gen ekspresyonu ölçüm ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

Grupların EGF gen ekspresyonu ölçüm ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

Grupların VEGF gen ekspresyonu ölçüm ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

Anlamlı farkın kaynağını bulmak için gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırılmıştır. 200 µg/ml doz uygulamasına ait FGF, EGF ve VEGF gen ekspresyonları ortalaması kontrol ve

diğer doz ortalamalarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı görülmüştür.

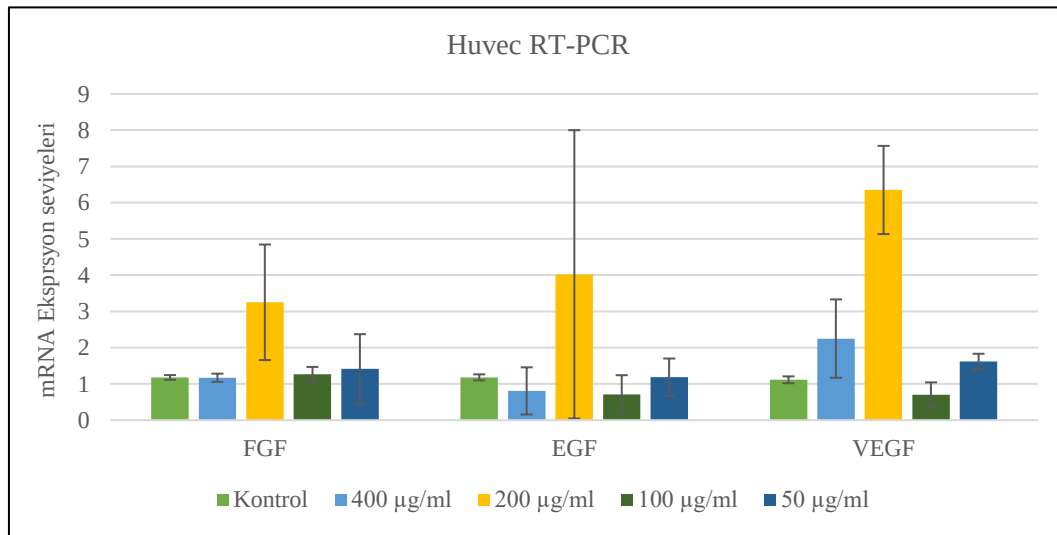
Çizelge 4.4. HUVEC hücre hattında RT-PCR gen ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması

HUVEC HÜCRE HATTI	GRUPLAR					p değeri
	Kontrol	400 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	
FGF Mean ± SD (n=3)	1,17±0,06	1,17±0,11	3,25±1,59	1,26±0,20	1,41±0,96	$p<0,05^*$
EGF Mean ± SD (n=3)	1,18±0,08	0,80±0,65	4,02±3,98	0,71±0,53	1,18±0,51	$p<0,05^{***}$
VEGF Mean ± SD (n=3)	1,11±0,09	2,25±1,08	6,35±1,21	0,70±0,34	1,61±0,21	$p<0,05^{**}$

*: 200mg/ml doz grubundaki FGF gen ekspresyonunun diğer gruplarla karşılaştırılması

** : 200mg/ml doz grubundaki EGF gen ekspresyonunun diğer gruplarla karşılaştırılması

***: 200mg/ml doz grubundaki VEGF gen ekspresyonunun diğer gruplarla karşılaştırılması



Şekil 4.10. HUVEC hücre hattına mRNA gen ekspresyon grafikleri

4.3.2. Meme fibroblast hücre hattı RT-PCR sonuçları

Meme fibroblast hücre hattında farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktının uygulanan gruplarda ve kontrol grubunda RT-PCR ile elde edilen mRNA gen ekspresyonu ortalamaları arasındaki fark tek yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir.

Grupların FGF gen ekspresyonu ölçüm ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

Grupların EGF gen ekspresyonu ölçüm ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

Grupların VEGF gen ekspresyonu ölçüm ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

Anlamlı farkın kaynağını bulmak için gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırılmıştır. 200 $\mu\text{g/ml}$ doz uygulamasına ait FGF, EGF ve VEGF gen ekspresyonları ortalaması kontrol ve diğer doz ortalamalarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Diğer dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı görülmüştür.

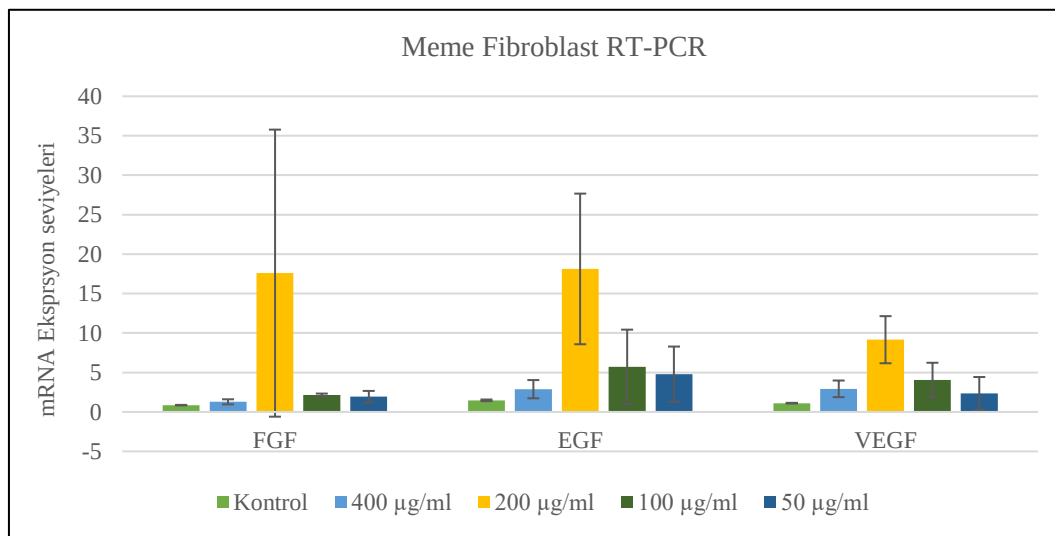
Çizelge 4.5. Meme fibroblast hücre hattında RT-PCR gen ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması

MEME FİBROBLAST HÜCRE HATTI	GRUPLAR					p değeri
	Kontrol	400 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	
FGF Mean $\pm$ SD (n=3)	0,85 $\pm$ 0,03	1,28 $\pm$ 0,32	17,58 $\pm$ 18,18	2,15 $\pm$ 0,17	1,92 $\pm$ 0,73	$p<0,001^*$
EGF Mean $\pm$ SD (n=3)	1,47 $\pm$ 0,10	2,88 $\pm$ 1,15	18,12 $\pm$ 9,54	5,70 $\pm$ 4,72	4,78 $\pm$ 3,50	$p<0,001^{***}$
VEGF Mean $\pm$ SD (n=3)	1,11 $\pm$ 0,04	2,92 $\pm$ 1,05	9,15 $\pm$ 2,98	4,04 $\pm$ 2,19	2,33 $\pm$ 2,09	$p<0,001^{**}$

*: 200mg/ml doz grubundaki FGF gen ekspresyonunun diğer gruplarla karşılaştırılması

** : 200mg/ml doz grubundaki EGF gen ekspresyonunun diğer gruplarla karşılaştırılması

***: 200mg/ml doz grubundaki VEGF gen ekspresyonunun diğer gruplarla karşılaştırılması



Şekil 4.11. Meme fibroblast hücre hattına ait mRNA gen ekspresyon grafikleri

4.3.3. Mezenkimal kök hücre hattı RT-PCR sonuçları

Mezenkimal kök hücre hattında farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktının uygulanan gruplarda ve kontrol grubunda RT-PCR ile elde edilen m RNA gen ekspresyonu ortalamaları arasındaki fark tek yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir.

Grupların FGF gen ekspresyonu ölçüm ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı görülmüştür ($p=0,726$).

Grupların EGF gen ekspresyonu ölçüm ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak için gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırılmıştır. Kontrol ve 200 $\mu\text{g/ml}$ doz gruplarındaki EGF ölçüm ortalamalarının 400 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ grup ortalamalarından anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

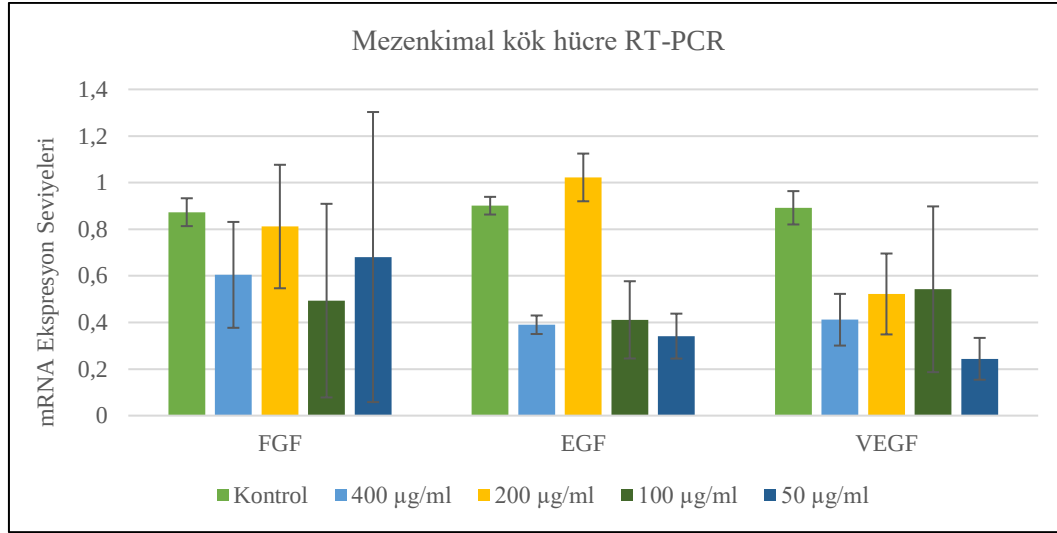
Grupların VEGF gen ekspresyonu ölçüm ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak için gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırılmıştır. Kontrol grubundaki VEGF gen ekspresyonu ölçüm ortalamasının 50 $\mu\text{g/ml}$ doz grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).

Çizelge 4.6. Mezenkimal kök hücre hattında RT-PCR gen ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE HATTI	GRUPLAR					p değeri
	Kontrol	400 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	
FGF Mean $\pm$ SD (n=3)	0,87 $\pm$ 0,06	0,60 $\pm$ 0,22	0,81 $\pm$ 0,26	0,49 $\pm$ 0,41	0,68 $\pm$ 0,62	$p=0,726$
EGF Mean $\pm$ SD (n=3)	0,90 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,10	0,41 $\pm$ 0,16	0,34 $\pm$ 0,09	$p<0,001^*$
VEGF Mean $\pm$ SD (n=3)	0,89 $\pm$ 0,71	0,41 $\pm$ 0,11	0,52 $\pm$ 0,17	0,54 $\pm$ 0,35	0,24 $\pm$ 0,09	$p<0,001^{**}$

*: Kontrol grubu ile 200 $\mu\text{g/ml}$ dozunun diğer dozlarla karşılaştırılması

** : Kontrol grubu ile 50 $\mu\text{g/ml}$ doz grubu arasında diğer dozlarla karşılaştırılması



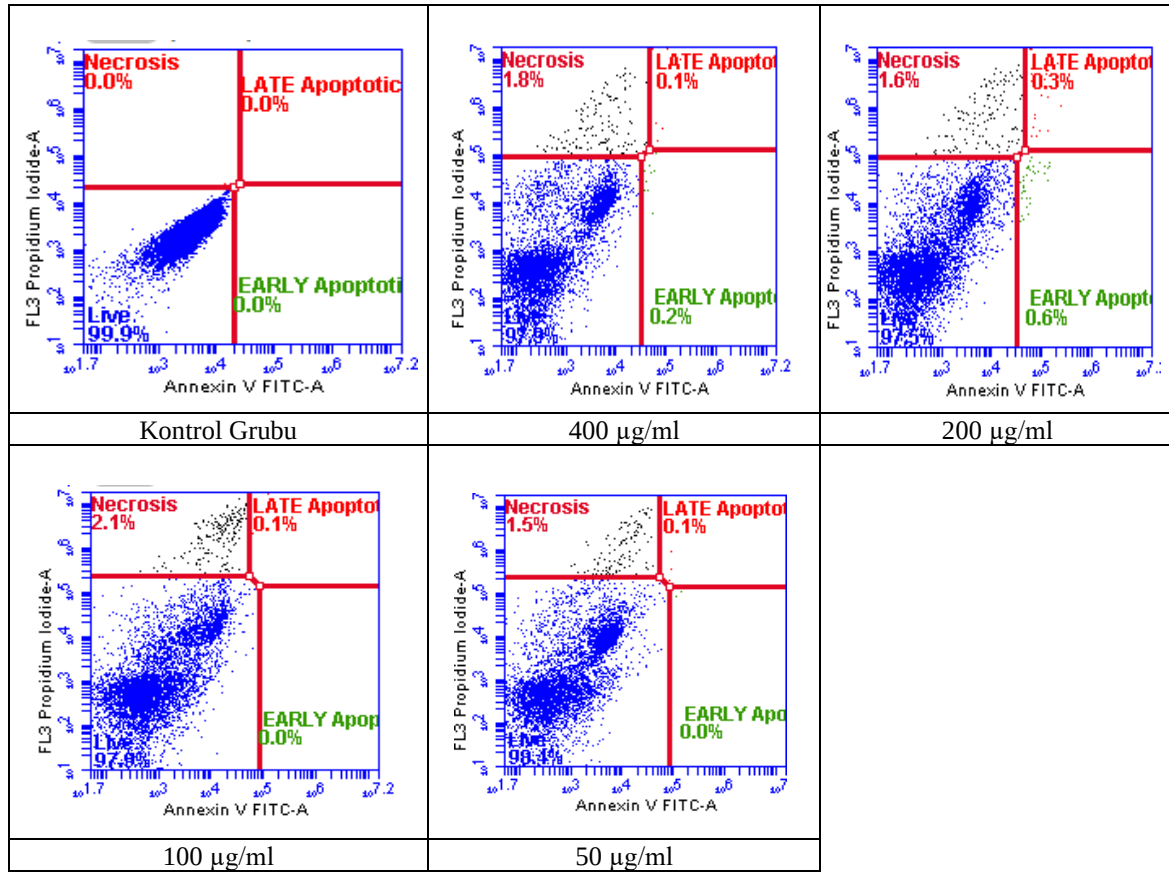
Şekil 4.12. Mezenkimal kök hücre hattına ait mRNA gen ekspresyon grafikleri

4.4. Apoptotik Etkinin Belirlenmesi

Farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktının belirlenen hücre hatları üzerinde apoptotik ve /veya nekrotik ölüm mekanizması üzerinden etki gösterip göstermediğini tespit edebilmek için; uygulama yapılmayan (kontrol grubu) ve doz uygulaması yapılan hücreler flow sitometri ile analiz edilmiştir.

Apoptoz analizlerinde; Annexin V ve hücre canlılık belirteci olan Propidium İyodür (PI) boyası ile ikili boyama yaparak erken/geç apoptotik hücre ayrımı mümkün olmaktadır.

4.4.1. HUVEC hücre hattında flow sitometri sonuçları



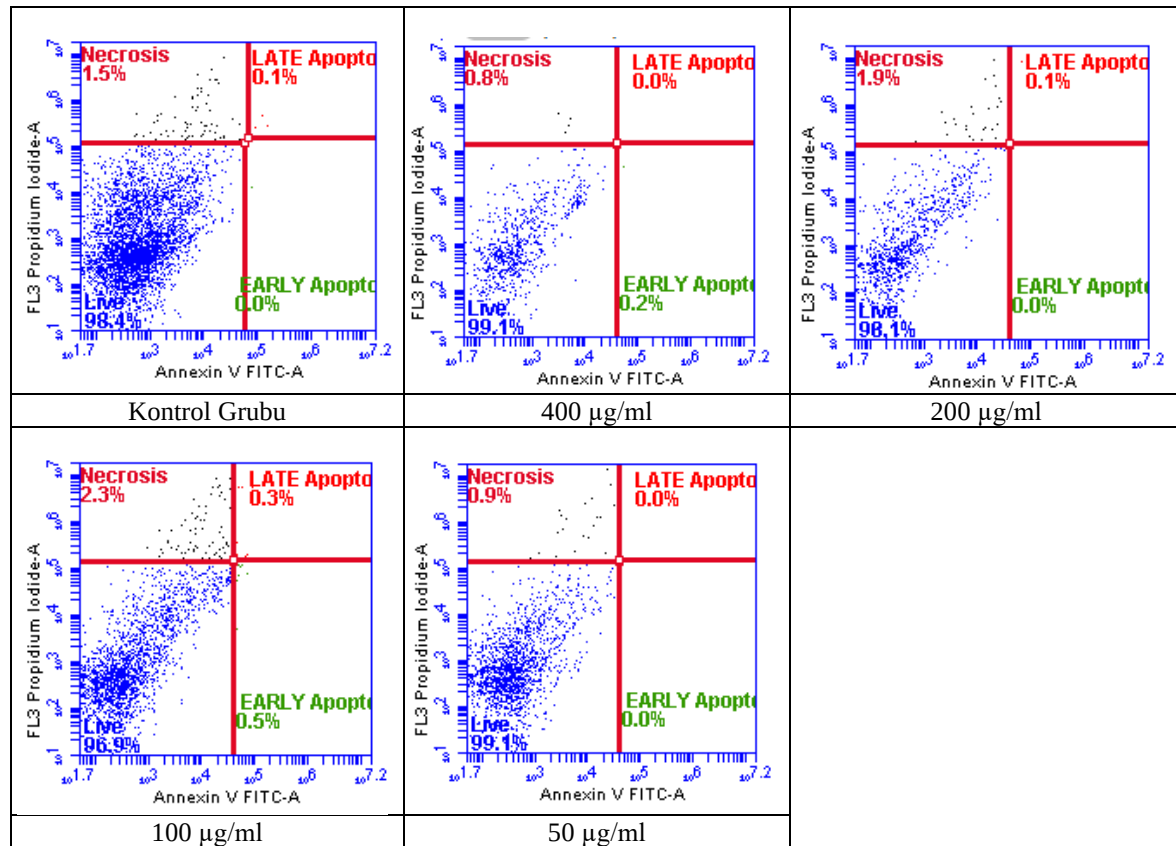
Şekil 4.13. HUVEC hücre hattına ait flow sitometri sonuçları

Çizelge 4.7. HUVEC hücre hattına ait flow sitometri sonuçlarının yüzde ifadeleri

HUVEC Anneksin V/PI	Canlı Hücreler	Nekroz	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz
Kontrol	%99,9	%0	%0	%0
400 µg/ml	%97,9	%1,8	%0,2	%0,1
200 µg/ml	%97,5	%1,6	%0,6	%0,3
100 µg/ml	%97,8	%2,1	%0	%0,1
50 µg/ml	%98,4	%1,5	%0	%0,1

Flow sitometri analizinde HUVEC hücre hattında %100'e yakın hücre canlılık oranları bulunmuş olup hücrelerin apoptoza ve/veya nekroza gitmediği belirlenmiştir. Böylece flow sitometri çalışmamızla tıbbi sülük salgı ekstraktının HUVEC hücre hattında proliferasyonun inhibe etmediğini de göstermiş olduk.

4.4.2. Meme fibroblast hücre hattında flow sitometri sonuçları



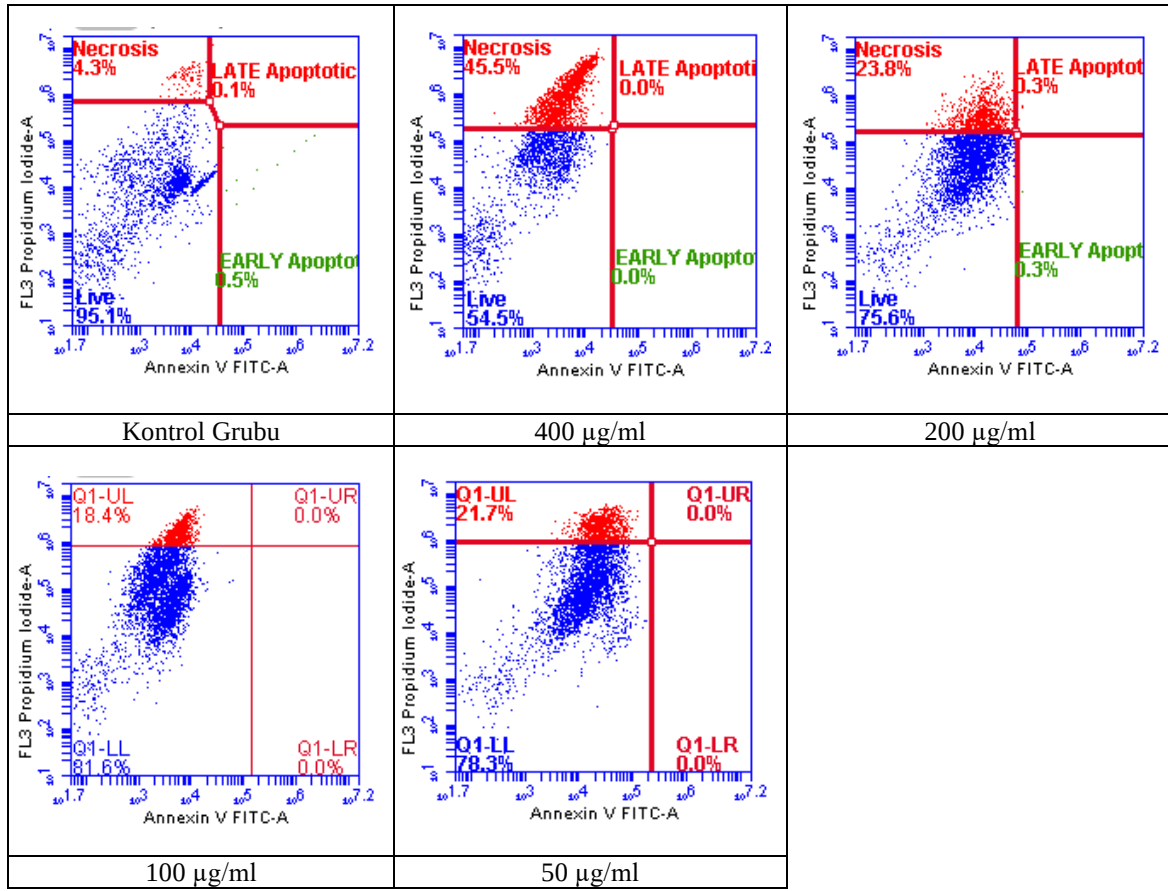
Şekil 4.14. Meme fibroblast hücre hattına ait flow sitometri sonuçları

Çizelge 4.8. Meme fibroblast hücre hattına ait flow sitometri sonuçlarının yüzde ifadeleri

Meme fibroblast Anneksin V/PI	Canlı Hücreler	Nekroz	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz
Kontrol	%98,4	%1,5	%0	%0,1
400 µg/ml	%99,1	%0,8	%0,2	%0
200 µg/ml	%98,1	%1,9	%0	%0,1
100 µg/ml	%96,9	%2,3	%0,5	%0,3
50 µg/ml	%99,1	%0,9	%0	%0

Flow sitometri analizinde meme fibroblast hücre hattında %100'e yakın hücre canlılık oranları bulunmuş olup hücrelerin apoptoza ve/veya nekroza gitmediği belirlenmiştir. Böylece flow sitometri çalışmamızla tıbbi sülük salgı ekstraktının meme fibroblast hücre hattında proliferasyonun inhibe etmediğini de göstermiş olduk.

4.4.3. Mezenkimal kök hücre hattında flow sitometri sonuçları



Şekil 4.15. Mezenkimal kök hücre hattına ait flow sitometri sonuçları

Çizelge 4.9. Mezenkimal kök hücre hattına ait flow sitometri sonuçlarının yüzde ifadeleri

Mezenkimal kök hücre Anneksin V/PI	Canlı Hücreler	Nekroz	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz
Kontrol	%95,1	%4,3	%0	%0,1
400 µg/ml	%54,5	%45,5	%0	%0
200 µg/ml	%75,6	%23,8	%0,3	%0,3
100 µg/ml	%81,6	%18,4	%0	%0,1
50 µg/ml	%78,3	%21,7	%0	%0

Mezenkimal kök hücre Hattına ait Flow sitometri analizinde kontrol grubundaki hücrelerde %4,3 nekroz görülmekle beraber apoptoz görülmemektedir. Tıbbi sülük salgı dozları uygulanan mezenkimal kök hücre hattının flow sitometri analizinde doza bağlı olarak nekrotik etkinin arttığı saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Tıbbi sülüklerin tükürük bezleri 100'den fazla biyoaktif madde içermektedir. Tıbbi sülük tedavisi Türkiye ve tüm dünyada geleneksel ve tamamlayıcı bir tedavi yöntemi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Günümüzde tıbbi sülüklerin içerdikleri biyoaktif maddeler ve bu maddelerin iyileştirici etkileri hakkında birçok çalışma yapılmaya devam etmektedir.

Bu çalışmada, tıbbi sülük salgısının; hücre canlılığı, yara iyileşmesi, apoptoz ve bu etkilerden sorumlu olası gen ekspresyonlarını incelemek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda HUVEC, meme fibroblast ve mezenkimal kök hücre olmak üzere üç farklı hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmamızda *Hirudo verbana* cinsi steril tıbbi sülüklerden beslenme sonrası sülük sağım yöntemi ile salgı elde edildi. Bu salgıdan Lowry yöntemi ile total protein konsantrasyonu tayin edilerek, seri dilüsyon ile hücre hatlarına uygulanacak çeşitli doz miktarları (400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml ve 50 µg/ml) ayarlandı.

Çalışmamızın ilk aşamasında farklı dozlarda tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulanmış HUVEC, meme fibroblast ve mezenkimal kök hücre hattında hücre canlılığı ve proliferasyonun değerlendirilmesi için MTT testi yaptık. Çalışma için seçilen hücre hatlarındaki hücreler önce çoğaltıldı, ardından üretilen hücreler üzerine belirlenen dozlarda sülük salgısı uygulandı. 24. ve 48. saat sonundaki MTT testi sonrası absorbans değerlerini ölçtük.

Çalışmamızda farklı dozlarda sülük salgısı uygulanan HUVEC hücre hattında, 24.ve 48. saatlerde tüm gruplara ait hücre canlılığının kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu gözlemledik ($p < 0,001$). 24 ve 48 saatlik MTT sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldığında tüm grupların 48.saatteki absorbanslarının 24.saatteki absorbanslara göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulduk ($p < 0,001$).

Farklı dozlarda sülük salgısı uygulanan meme fibroblast hücre hattında, 24. ve 48. saatlerde tüm gruplara ait hücre canlılığı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemledik ($p < 0,001$). 24 ve 48 saatlik MTT sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldığında tüm grupların 24.saatteki absorbanslarının 48.saatteki absorbanslara göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p < 0,001$). Özellikle hem 24.saatteki hem de 48.saatteki en çok hücre proliferasyonuna sebep olan etkin doz 100 µg/ml'dir.

Farklı dozlarda sülük salgısı uygulanan mezenkimal kök hücre hattında, 24.ve 48. saatlerde tüm gruplara ait hücre canlılığının kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu bulduk ($p<0,001$). 24 ve 48 saatlik MTT sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldığında tüm grupların 48.saatteki absorbanslarının 24.saatteki absorbanslara göre anlamlı derecede yüksek olduğunu gördük($p<0,001$).

Bu çalışmada sülük salgı uygulamasının meme fibroblast hücre hattında hücre proliferasyonunu artırırken, HUVEC ve mezenkimal kök hücre hattında hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemledik. Böylece MTT testinde sülük salgısına verilen yanıtın; sülük salgısı dozuna, süreye (24. ve 48. saat) ve seçilen hücre hattına göre değiştiği tespit etmiş olduk.

Amir Shakouri ve ark.'nın *H. medicinalis* tıbbi sülük salgısının etkinliğini değerlendirdiği bir çalışmada, kanserli hücre hattı olarak meme kanseri hücre hattı (MCF-7) ve kontrol grubu olarak HUVEC hücre hattı kullanılmıştır. Bu çalışmada sülük salgısı direkt olarak ve lipozomal form halinde hücre hatlarına uygulanmıştır. Uygulanan salgıların 24. ve 48. saatteki etkisine MTT testi ile bakılmıştır. Özellikle direkt sülük salgısının MCF-7 kanser hücreleri üzerinde %50 oranında antitümör aktivitesine sahip iken, lipozomal form sülük salgı uygulamasında antitümör aktivite oranı %97'ye yükselmiştir. Bunun yanı sıra uygulamanın sağlıklı hücre hattında (HUVEC) %10 oranında antiproliferatif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [71].Bu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da farklı dozlarda sülük salgısı uygulanan HUVEC hücre hattında antiproliferatif etki gözlemlenmiştir.

Ahmet Merzouk ve arkadaşları *H. malinensis* tıbbi sülük salgısını küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı (SW1721) üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada sülük salgısı rutinde kullanılan farklı antikanser ilaçlarla kombine edilerek kullanılmıştır. Çalışma sonucunda sülük salgının antikanser ilaçlarla kombine edilmesinin, tek başına antikanser ilaç uygulanmasına göre antitümör aktivitesini anlamlı derecede arttırdığı gözlemlenmiştir [72].

Mohamed Hessein ve arkadaşları *H. malinensis* tıbbi sülük salgısının prostat kanseri hücre hattı üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada tıbbi sülük salgısının kontrol grubuna göre anti-tümör aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir [73].

Sanaz Mahmoudi ve arkadaşları *H. medicinalis* tıbbi sülük salgısının pankreas adacık hücre hattı üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. MTT testi ile yüksek doz sülük salgısı uygulanan pankreas adacık hücrelerinde düşük doz uygulama ve kontrol grubuna kıyasla %20 oranında daha fazla hücre proliferasyonu gözlemlenmiştir. Sülük salgı uygulamasının hücreler üzerine toksik etkisinin olmadığı, hem hücre canlılığı hem de insülin sekresyonunun korunduğu belirtilmiştir[74].

Lixu Xu ve arkadaşları *Whitmania pigra*'dan elde edilen sülük ekstraktlarının farklı formlarını insan endotel hücre hattına (EA. Hy926) uygulayarak etkisini değerlendirmişlerdir. Yapılan MTT testinde 48. saatte sülük salgısının insan endotel hücre hattı üzerinde proliferasyona sebep olduğu gösterilmiştir [75]. Bu çalışmada, bizim çalışmamızdan farklı olarak endotel hücrelerinde proliferasyon gözlemlenmiştir. İki çalışmada da kullanılan hücre hattı insan endotel hücre hattı olup biz çalışmamızda HUVEC hücre hattı, Lixu Xu ve arkadaşları ise EA. Hy926 hücre hattı kullanmıştır. Sülüğün cinsi, sülük salgısının dozu ve seçilen hücre hattı farklı yanıtların sebebi olabilir.

Chien-Hao Wang ve arkadaşları sülük ekstraktının kalp miyokard hücre hattı (H9C2) üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada Angiotensin II'nin (ANG II) miyokard hücreleri üzerinde yaptığı hipertrofi ve fibrozisin sülük ekstraktı uygulaması ile önemli derecede azaldığı gösterilmiştir. Sülük ekstraktının miyokard hücre canlılığını arttırıp, ANG II etkisine bağlı hücre boyutlarındaki büyümeyi azalttığı bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucunda kardiyak hipertrofi ve fibroz tedavisinde sülük salgı ekstraktının etkili olabileceği hipotezi öne sürülmüştür[76].

Li Zhao'nun yaptığı çalışmada *H. medicinalis* tıbbi sülük salgısında bulunan hirudinin glioblastoma tümörü hücre hatları (LN-229 ve U251) üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu kapsamda hücrelere hirudin uygulanmış ve MTS testi ile hücre canlılık oranlarına bakıldığında artan hirudin konsantrasyonu ile hücre canlılığının azaldığı gösterilmiştir. Böylece hirudinin en doğal trombin inhibitörü olarak kullanılıp, kanserde terapötik potansiyel olarak kullanılabileceği gösterilmiştir[77].

Sülük salgısının hücreler üzerindeki etkisinin MTT testi ile değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde, literatürde oldukça farklı bulgular olduğu görülmektedir. Seçilen sülüğün

cinsi, sülükten elde edilen salgının protein konsantrasyonu, MTT testinin yapıldığı süreler ve araştırmacıların seçtiği hücre hattına göre bulguların değişebileceğini öngörmekteyiz.

Çalışmamızın ikinci aşamasında farklı dozlarda tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulanmış HUVEC, meme fibroblast ve mezenkimal kök hücre hattında hücrelerin migrasyon yeteneklerini test etmek için *in vitro* yara iyileşmesi modeli yaptık. Bu yöntemde hücrelerin ekildiği kuyucukta orta hatta yapay bir boşluk oluşturup hücre kaybı sağlanır. Bu boşluğun, çevre hücrelerin migrasyon yetenekleri doğrultusunda ne oranda kapandığını belirlemek esastır. Böylece oluşturulan yara modelinde 0.,8.,24. ve 48.saatlerde invert mikroskopta yara kapanmasına ait görüntüler alınarak analizleri yapılır.

Çalışmamızda farklı dozlarda sülük salgısı uygulanan HUVEC hücre hattında 50 µg/ml dozunun 48.saatte yara modelini kapattığını gözlemledik. Sülük salgısı uygulanmayan kontrol grubu da 48.saatte yara modelini kapatmış olup, 50 µg/ml dozu ile aynı etkiye sahip olduğu bulduk. Diğer dozların etkisi incelendiğinde 48.saatte yara bölgesinde azalma gözlenmesine rağmen kapanma olmamıştır. HUVEC hücre hattında *in vitro* yara modeli uygulamasında diğer dozlara oranla en hızlı etki gösteren doz 50 µg/ml'dir.

Farklı dozlarda sülük salgısı uygulanan meme fibroblast hücre hattında 50 µg/ml dozunun 24.saatte yara modelini kapattığını gözlemledik. Kontrol grubu ve diğer dozlarda 24.saatte yara bölgesinde bir miktar kapanma olmasına rağmen, 50 µg/ml dozunda olduğu gibi tam kapanma olmadığını bulduk. meme fibroblast hücre hattında *in vitro* yara modeli uygulamasında en hızlı etki gösteren doz 50 µg/ml olup, ikinci sırada en hızlı etkin doz 100 µg/ml'dir.

Farklı dozlarda sülük salgısı uygulanan mezenkimal kök hücre hattında 50 µg/ml dozunun 24.saatte yara modelini kapattığını gözlemledik. Sülük salgısı uygulanmayan kontrol grubu da 24.saatte yara modelini kapatmış olup, 50 µg/ml dozu ile aynı etkiye sahip olduğunu bulduk. mezenkimal kök hücre hattında *in vitro* yara modeli uygulamasında diğer dozlara oranla en hızlı etki gösteren doz 50 µg/ml'dir.

In vitro yara modeli kısmında sülük salgı uygulamasının HUVEC, meme fibroblast ve mezenkimal kök hücre hattında çeşitli etkiler gösterdiğini gözlemledik. Uygulanan sülük salgı dozu düştükçe *in vitro* yara kapanma oranının arttığı, doz ve yara iyileşmesi arasında

ters bir ilişki olduğunu gözlemledik. 50 µg/ml dozunun kontrol grubuna göre aynı oranda hücre göçüne sebep olduğu veya kontrolden daha etkin proliferasyona neden olduğu saptanmıştır. 400 µg/ml, 200 µg/ml ve 100 µg/ml dozlarının kontrol grubuna göre genel olarak hücre göçünü azalttığı yara iyileşmesini inhibe ettiğini bulduk. Tıbbi sülük salgısının hücre hatları üzerine etki ederek ortama salgıladığı faktörlerle yara modelindeki etkiyi gözlemlediğimizi düşünmekteyiz. Bunlar bizim çalışmamızdan çıkan bulgulardır, ancak literatürde sağlıklı hücre hattıyla ilgili yapılmış bir çalışma görülmemiştir. *In vitro* yara iyileşme modellerinde kısıtlı sayıda uyarana kısıtlı sayıda hücre tipinin verdiği yanıtlar incelendiği için hücre hatlarında salgı uygulaması sonrası aldığımız yanıtın farklılığını açıklama sebebimiz olabilir.

Amir Shakouri ve ark.'nın *in vitro* yara modelinde *H. medicinalis* tıbbi sülük salgısının yara modeli üzerindeki etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, kanserli hücre hattı olarak meme kanseri hücre hattı (MCF-7) ve kontrol grubu olarak HUVEC hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmada 0.,24. ve 48. saatlerde yara modeline ait görüntüler alınmıştır. HUVEC hücre hattına *in vitro* yara modeli için her hangi bir dozda sülük salgısı verilmemiş olup sadece kontrol grubu amaçlı kullanılmıştır. HUVEC hücre hattında 48. saatte yara modeli tamamen kapanmış olup, MCF-7 hücrelerinde yara modelinde hiçbir saatte kapanma olmamıştır. Bu durum MCF-7 hücre hattında sülük salgısı uygulamasının yara modelini kapatmaya çalışan hücre göçünü baskıladığını göstermektedir[71].

Xinxin Pang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sülük salgısından elde edilen hirudinin renal anjiyopatisi olan diyabetik fare böbrek glomerul endotel hücresi üzerine etkisi incelenmiştir. Anjiyopatisi olan diyabetik farelere ait glomerüler endotel hücre hattına uygulanan hirudinin *in vitro* yara modelinde hücre göçünü inhibe ettiği görülmüştür[78]. Bu çalışmaya benzer şekilde bizim çalışmamızda da bir endotel hücre türü olan HUVEC hücre hattı kullanılmıştır. Ancak bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak sağlıklı endotel hücreleri değil de hasar oluşturulmuş mikroanjiyopatisi olan hücreler kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan hirudinin *in vitro* yara modelindeki inhibe edici etkisinin bulunması renal anjiyopati de hirudininin terapötik etkinliği olduğunu göstermektedir.

Tıbbi sülük salgısı uygulamasının *in vitro* yara modeli üzerindeki etkisini inceleyen çalışmaların yanı sıra, tıbbi sülüğün *in vivo* yara iyileşme modeli üzerine etkisinin incelendiği insan ve hayvan çalışmaları da literatürde bolca bulunmaktadır.

Kaveh Darabi ve arkadaşları sülük tedavisi ve topikal fenitoin (PHT) uygulamasının hayvan modelinde insizyonel cilt yara iyileşmesi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Wistar Albino cinsi ratlar ve *H. orientalis* cinsi tıbbi sülük kullanılmıştır. Tıbbi sülük ile tedavi edilen gruptaki ratların yaraları topical fenitoin (PHT) uygulanan rat grubuna göre yara iyileşmesi süreci anlamlı derecede daha hızlı gerçekleşmiştir[79].

Leili Amani ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *H. orientalis*’ den elde edilen sülük ekstraktı, krem içine katılarak farmasötik ürün elde edilmiştir. Ratlarda oluşturulan cilt kaybına bağlı yarada, sülük içerikli kremin yara iyileşmesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Sülük içerikli bu kremin epitelizasyon ve anjiyogenezi arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu durum yara iyileşmesinde kullanılan farmasötik ürünlere alternatif olarak, sülük içerikli kremlerin de kullanılabileceğini öngörmektedir [80].

Nair Harikrishna K.R ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ağrı ve yara iyileşmesi üzerinde *H. manillensis* tıbbi sülük tedavisinin etkinliği gösterilmiştir. Bu çalışma diyabete bağlı yara ve ülser kaynaklı yaraları olan hastalarda gerçekleştirilmiştir. Hastaların yara bölgelerine direk sülük uygulandıktan sonra ağrılarını azaltmada ve perfüzyonu arttırmada tıbbi sülüklerin etkili olduğu gösterilmiştir [81].

C.Durrant ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada çocuk hastada *H. medicinalis* tıbbi sülüğü uygulanmasının yara iyileşmedeki etkisi incelenmiştir. Hatalı turnike uygulamasına bağlı serçe parmağında venöz iskemi oluşan hastanın parmağına sülük tedavisi uygulanmış, 7.gün sonunda hastanın parmağında duysal ve fonksiyonel parametrelerde iyileşme gözlemlenmiştir [82].

BW Mortenson ve arkadaşları *H. medicinalis* tıbbi sülüğünün flep uygulaması üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bisiklet kazası sonrası burnundan yaralanan hasta ameliyat edilerek flep uygulaması yapılmıştır. Ameliyat sonrası 4 günlük sülük tedavisi uygulanmış ve sonucunda komplikasyonsuz tatmin edici iyileşme sağlandığı gözlemlenmiştir.[83].

Literatürde tıbbi sülük üzerinde yara modeli yapılarak, *in vivo* yara modeline sülüğün verdiği yanıtın incelendiği çalışmalar da bulunmaktadır.

Gianluca Tettamanti ve ark.'nın *H. medicinalis* sülüğünü kullanarak yaptıkları *in vivo* yara modeli çalışmasında sülüğün fibroblastlarının yara iyileşmesi sürecindeki etkisi araştırılmıştır. Sülük üzerinde oluşturulan yara modelinde iyileşme sürecinde sülük fibroblastlarının kan damar ağı oluşumu ve yara iyileşme sürecinde aktif rol aldıkları gösterilmiştir [84]. Bu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da bir fibroblast türü olan meme fibroblast hücre hattı yara iyileşme modeline en iyi cevabı veren hat olmuştur.

Francesca Cialdai ve arkadaşlarının *H. medicinalis* sülüğünü kullanarak yaptıkları *in vivo* yara modeli çalışmasında mikro yerçekimi ve trombositten zengin plazmanın (PRP) yara iyileşmesi sürecindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda yer çekiminin yara iyileşme sürecini geciktirdiğini, PRP tedavisinin ise yara iyileşme sürecinde yer çekiminin neden olduğu yara iyileşmedeki gecikmeyi önlemede etkili olduğu gösterilmektedir [85].

Çalışmamızın üçüncü aşamasında farklı dozlarda tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulanmış HUVEC, meme fibroblast ve mezenkimal kök hücre hattında, yara iyileşmesi ve anjiyogenez gibi etkilerden sorumlu olduğu düşünülen VEGF, EGF ve FGF genlerinin mRNA ekspresyon oranlarını RT-PCR ile analiz ettik.

HUVEC hücre hattında FGF, EGF ve VEGF gen ekspresyonları gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğunu gördük. Anlamlı farkın kaynağını bulmak için gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırdık. 200 µg/ml doz uygulamasına ait FGF, EGF ve VEGF gen ekspresyonları ortalamasını kontrol ve diğer doz ortalamalarından anlamlı derecede yüksek bulduk ($p < 0,05$).

Meme fibroblast hücre hattında FGF, EGF ve VEGF gen ekspresyonları gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğunu gördük. Anlamlı farkın kaynağını bulmak için gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırdık. 200 µg/ml doz uygulamasına ait FGF, EGF ve VEGF gen ekspresyonları ortalamasını kontrol ve diğer doz ortalamalarından anlamlı derecede yüksek bulduk ($p < 0,001$).

Mezenkimal kök hücre hattında EGF ve VEGF gen ekspresyonları gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğunu gördük. Anlamlı farkın kaynağını bulmak için gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırdık. Kontrol ve 200 µg/ml doz gruplarındaki EGF ölçüm ortalamalarının 400 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml grup

ortalamalarından anlamlı derecede yüksek olduğu gördük($p<0,001$). Kontrol grubundaki VEGF gen ekspresyonu ölçüm ortalamasının ise 50 $\mu\text{g/ml}$ doz grubundan anlamlı derecede yüksek bulduk ($p<0,001$).

Amir Shakouri ve arkadaşları *H. medicinalis* tıbbi sülük salgısının tümör anjiyogenezi üzerindeki etkinliğini değerlendirdiği bir çalışmada meme kanseri (MCF-7) ve HUVEC hücre hattı kullanılmıştır. Bu çalışmada sülük salgısı hücre hatlarına uygulandıktan sonra VEGF-A gen ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılan HUVEC hücre hattı, sülük salgısı uygulanmamış MCF-7 hücre hattı ve sülük salgısı uygulanmış MCF-7 hücre hattında VEGF-A gen ekspresyon oranları sırasıyla %42, %67 ve %29 olduğu gösterilmiştir. Burada tıbbi sülük salgı uygulaması sonrası MCF-7 hücre hattında VEGF-A gen ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğü gösterilmiştir [71] Bu çalışmanın aksine bizim çalışmamızda özellikle meme fibroblast ve HUVEC hücre hatlarında artış gözlenen gen ekspresyonlarının kullanılan hücre hattına bağlı olduğunu düşünüyoruz. Bizim çalışmamızda sağlıklı hücre hatları kullanılmış olup, bu çalışmada kanserli hücre hattı kullanılmıştır.

Xinxin Pang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sülük salgısından elde edilen hirudininin renal anjiyopatisi olan diyabetik fare böbrek glomerul endotel hücresi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada anjiyogeneze açısından önemli olan VEGF protein ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Anjiyopatisi olan diyabetik farelere ait glomerüler endotel hücre hattına uygulanan hirudin VEGF protein ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [78]. Bizim çalışmamızda tıbbi sülük salgısı sağlıklı hücre hatlarında gen ekspresyonlarını arttırırken, bu çalışmada sağlıklı olmayan hücre hattı kullanılmasının azalmış gen ekspresyonlarından sorumlu olduğunu düşünüyoruz.

Nicolo Baranzini ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *H. verbana* tıbbi sülüğünden elde edilen RNASET2 rekombinant proteinin insan fibroblast hücre hattı (MRC5) üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada anjiyogeneze açısından önemli olan kollajen 1 α protein ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Rekombinant sülük proteinin MRC5 hücrelerinde kollajen 1 α protein ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı gözlemlenmiştir.[86].

Tıbbi sülük salgısı uygulamasının VEGF, EGF ve FGF genlerinin anjiyogenez üzerindeki etkisini inceleyen *in vitro* çalışmaların yanı sıra *in vivo* çalışmalar da literatürde bulunmaktadır.

Guo Yingxin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ratlarda doğal ve rekombinant hirudin enjeksiyonunun VEGF gen ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Wistar cinsi ratların dorsal bölgesinde deri flepi oluşturularak doğal hirudin ve rekombinant hirudin uygulaması yapılmıştır. VEGF mRNA gen ekspresyonları PCR ile analiz edilmiştir. Doğal hirudin uygulamasının flep modelinde rekombinant hirudin uygulamasına göre VEGF gen ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir. Doğal hirudin uygulamasının flep sağ kalımında daha etkili olduğu öngörülmüştür. [87].

Kırchner ve arkadaşlarının ratlarla yaptıkları çalışmada yara bölgesine rekombinant VEGF uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Genetik olarak diyabetik hale getirilmiş farelerin dorsal bölgesinde oluşturulmuş yaraya VEGF uygulamasının iyileşme ve yara kapanma üzerinde olumlu etkileri gözlemlenmiştir [88].

Tıbbi sülük salgısı uygulamasının VEGF, EGF ve FGF genlerinin yara iyileşmesi ve anjiyogenez üzerindeki etkisini incelemeye direk tıbbi sülük üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalar da bulunmaktadır.

M. de Eguileor ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *H. medicinalis* tıbbi sülüğü üzerinde yara oluşturularak omurgasızlardaki anjiyogenik süreç araştırılmıştır. Sülüklerin vücut duvarında oluşturulan yaradaki anjiyogenetik etki immünokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. Sonuç olarak VEGF ve FGF gibi büyüme faktör reseptörlerinin yara bölgesindeki endotelial hücrelerde arttığı tespit edilmiştir. Böylece sülüklerin anjiyogenik süreçte büyüme faktörlerine omurgalıya benzer şekilde yanıt verdiği gözlemlenmiştir [89].

Gianluca Tettamanti ve ark.'nın yaptıkları çalışmada *H. medicinalis* tıbbi sülüğü üzerinde yara oluşturularak fibroblastlarının yara iyileşmesi sürecindeki etkisi araştırılmıştır. Oluşturulan yara modelinde iyileşme ile ilgili birtakım faktörler immünokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. FGF büyüme faktör reseptörlerinin yara bölgesindeki endotelial hücrelerde arttığı tespit edilmiştir [84].

Başka bir çalışmada *H. verban*a sülüğünün hücre duvarına RNASET2 enjeksiyonu yapılarak bağ dokunun verdiği yanıt gözlemlenmek istenmiştir. Sülükte kas liflerini çevreleyen bağ dokusunda fibroblast belirteci olan FGF gen ekspresyonu PCR yöntemi ile analiz edilmiş, FGF gen ekspresyonlarında önemli derecede artış olduğu gözlemlenmiştir [86].

Tıbbi sülük salgısının anjiyogenez ve yara iyileşmesi üzerine etkili olduğu düşünülen gen ekspresyonlarının değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde, literatürde oldukça farklı bulgular olduğu görülmektedir. Seçilen sülüğün cinsine, sülükten elde edilen moleküle, analiz edilmesi hedeflenen gen ekspresyonuna, araştırmacıların seçtiği hücre hattı veya araştırılmak istenen patolojiye göre bulguların değişebileceğini öngörmekteyiz.

Çalışmamızın 4. aşamasında farklı dozlarda tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulanmış HUVEC, meme fibroblast ve mezenkimal kök hücre hatları üzerinde apoptotik veya nekrotik ölüm mekanizması üzerinden etki gösterip göstermediğini flow sitometri ile gözlemledik.

Çalışmamızda HUVEC hücre hattına tıbbi sülük salgısı uygulamasının ardından yapılan Flow sitometri analizinde %100'e yakın hücre canlılık oranları bulunmuş olup hücrelerin apoptoza ve/veya nekroza gitmediğini belirledik.

Meme fibroblast hücre hattına tıbbi sülük salgısı uygulamasının ardından yapılan Flow sitometri analizinde %100'e yakın hücre canlılık oranları bulunmuş olup hücrelerin apoptoza ve /veya nekroza gitmediği belirledik.

Mezenkimal kök hücre hattına tıbbi sülük salgısı uygulamasının ardından yapılan Flow sitometri analizinde; uygulanan sülük salgı dozu arttıkça hücrelerde nekrotik etkinin arttığını bulduk. Doz ve nekroz arasında doğru orantılı bir ilişki olduğunu gözlemledik. Tıbbi sülük salgısı uygulanan hücrelerde apoptotik etkinin olmadığını fark ettik.

HUVEC ve meme fibroblast hücre hatlarında uygulanan salgının, hücreleri apoptoz veya nekroza sürüklediği gözlemlenmezken, mezenkimal kök hücre için durum aynı değildir. Bu çalışmayla Flow sitometri testinde sülük salgısına verilen yanıtın; sülük salgısı dozuna ve seçilen hücre hattına göre değiştiğini tespit etmiş olduk.

Literatürde tıbbi sülük salgı uygulamasının apoptoz ve/veya nekroz üzerindeki etkisinin flow sitometri ile *in vitro* olarak etkisini inceleyen çalışmalar mevcuttur.

Li Zhao'nun yaptığı çalışmada *H. medicinalis* tıbbi sülük salgısında bulunan hirudinin glioblastoma tümörü hücre hatları (LN-229 ve U251) üzerine uygulanarak antineoplastik bir ilaç olup olmadığını araştırılmıştır. Bu kapsamda hücrelere hirudin uygulanmış ve Flow sitometri ile Anneksin V boyaması yapılarak hirudinin glioma hücrelerini apoptoza sürüklediği gösterilmiştir. [77].

Yang Shen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hirudinin mesane kanseri hücre hatları (EJ ve J82) ve bu hatlardan elde edilen eksozomlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Hirudin uygulaması sonrası yapılan flow sitometri analizinde her iki mesane kanseri hücre hattında da apoptozun önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. [90].

Jiangying Zhu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada insan mikrovasküler endotel hücre hattı (HMVEC) üzerine hirudin ve trombinin etkisi araştırılmıştır. Hirudin, trombin ve bu ikisinin kombinasyonunun hücrelere uygulanması sonrası flow sitometri analizi yapılarak apoptoz araştırılmıştır. Tek başına trombin uygulaması hücreler üzerinde apoptoz oranını arttırırken, özellikle hirudinin trombin ile birlikte uygulanması sonrası apoptoz oranında belirgin azalma gözlemlenmiştir [91].

Li Yuanyuan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *H. nipponica* tıbbi sülük salgı ekstraktının insan retinoblastom (WERI-RB-1) hücreleri üzerindeki inhibitör etkisi araştırılmıştır. Tıbbi sülük salgı ekstraktının hücrelere uygulanması sonrası hücre döngüsü flow sitometri analizi ile araştırılmıştır. Sülük özütü, insan retinoblastom hücrelerinin in vitro proliferasyonunu, invazyonunu ve apoptozunu indükleyebildiği gözlemlenmiştir [92].

Liu Wei ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ratlardan elde edilen dorsal kök ganglion nöronlarında (DRGn) hirudinin oksidatif stres ve apoptoz üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda hirudin uygulamasının hücrelerde apoptoz oranlarını ve oksidatif stres önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir [93].

Sülük salgısının hücreler üzerinde apoptoz ve/veya nekroz yapıp yapmadığının Flow sitometri ile değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde, literatürde oldukça farklı bulgular olduğu görülmektedir. Sağlıklı hücrelerde sülük salgısı ve sülük salgısından elde edilen hirudin apoptozu azaltırken, kanser hücrelerinde apoptozu arttırmaktadır. Sülük salgısı dozu ve seçilen hücre hattına göre bulguların değişebileceğini öngörmekteyiz.

Çalışmamızın son aşaması olan tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulanmış hücre hatlarında anjiyogenez üzerine etkisini Tüp Formasyon modeli ile *in vitro* ortamda gerçekleştirilmiştir.4 kez Tüp Formasyon modeli tekrarlanmasına rağmen sonuç alınamamıştır. Kullanılan malzemelerin bitmesi ve yeniden alım için bütçe sağlanamadığı için tekrarı bir daha yapılamamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda in vitro ortamda sağlıklı hücre hatlarına uygulanan tıbbi sülük salgının etkilerini araştırdık. Çalışma kapsamında hücre hatlarında hücre canlılığı, yara iyileşmesi, apoptoz ve bu etkilerden sorumlu olası gen ekspresyonlarına bakıldı.

Tıbbi sülüklerin kendisinden ve salgılarından elde edilen doğal veya sentetik organik bileşikler çeşitli bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu kapsamda hem in vitro hem de in vivo çalışmalar yapılmıştır. Literatürde sülük salgısının kanser hücre hatlarında antikanser etkisini göstermek için çeşitli çalışmalar yapılmış olup biz ise çalışmamızda sağlıklı hücre hatları kullandık. Bu kapsamda yeni bir potansiyel ajan olabileceğini düşündüğümüz salgı ekstraktıyla ilgili önemli veriler elde ettik. Tıbbi sülük salgı ekstraktının yara iyileşmesinde rol oynayan hücreler üzerinde doza bağlı olarak, hücre proliferasyonu ve migrasyonunu arttırmanın yanısıra, yara iyileşmesinde rol oynayan proteinlerin ve büyüme faktörlerinin salınımını sitümule ederek, yara iyileşmesi ve anjiyogeneze katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Verilerimizin PCR ve flow sitometri gibi ileri analiz yöntemleri ile desteklenmesi de çalışmamıza ayrı bir önem kazandırmıştır.

Çalışmamızdan elde edilen verilerde kullandığımız hücre hattına göre farklılıklar gözlenmektedir. Ayrıca bizim çalışmamızla literatürdekiler arasında da çeşitli farklılıklar vardır. Bunun sebebi olarak; seçilen sülüğün cinsi, sülükten elde edilen salgının protein konsantrasyonu ve araştırmacıların seçtiği hücre hattına göre bulguların değişebileceğini görmekteyiz.

Yayınlanmış diğer makalelere bakıldığında, çalışmamızda sağlıklı hücrelerin kullanılması ve bu hücre hatlarında bakılan parametrelerin çeşitliliği açısından araştırmamız bir ilk teşkil etmektedir. Bahsedilen sonuçlar ilk kez raporlanmakta ve daha sonraki çalışmalara kapı aralamaktadır. Yine de tıbbi sülük salgısının etki yolları ve moleküler mekanizmaları daha detaylı incelenip in vivo olarak desteklenmelidir.

Sonuç olarak, bu in vitro çalışmamız ile elde edilen bulgular, ileride gerçekleştirilecek olan in vivo çalışmalar için öncü veriler oluşturmaktadır. Ayrıca tıbbi sülük salgısının etki mekanizması hakkında mevcut literatür bilgisine önemli katkılar sağlamaktadır. Çalışmamız tıbbi sülük salgı ekstraktının; tıbbi tedavilere ek yardımcı ajan olarak kullanılabilecek umut

vaad eden bir molekül olabileceğini sunmaktadır. Sülük tedavisinin potansiyel terapötik etkisini doğrulamak için daha kapsamlı alanlarda daha kesin metodolojilerle daha geniş alanlarda çalışmaya ihtiyaç olduğu kesindir.

6.1. Sonuçlar

Bu tez çalışmasında tıbbi sülük salgısının; hücre canlılığı, yara iyileşmesi, apoptoz ve bu etkilerden sorumlu olası gen ekspresyonlarını incelemek amaçlanmıştır. Bu amaçla MTT testi, *in vitro* yara iyileşmesi deneyi, hücrelerin RT-PCR ile mRNA gen ekspresyonları ve flow sitometri ile apoptoz/nekroz tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre;

1. HUVEC hücre hattına uygulanan farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktının 24.ve 48. saatlerde tüm gruplara ait hücre canlılığının kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu gözlemledik($p<0,001$).
2. HUVEC hücre hattında 24 ve 48 saatlik MTT sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldığında tüm grupların 48.saatteki absorbanslarının 24.saatteki absorbanslara göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulduk($p<0,001$).
3. HUVEC hücre hattına uygulanan *in vitro* yara modelinde 50 µg/ml dozunun kontrol grubunda olduğu gibi 48.saatte tüm alanları hücreler ile kapattığını gözlemledik.
4. HUVEC hücre hattında FGF, EGF ve VEGF gen ekspresyonları gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğunu gördük. Anlamlı farkın kaynağını bulmak için gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldığında, 200 µg/ml doz uygulamasına ait FGF, EGF ve VEGF gen ekspresyonları ortalamasını kontrol ve diğer doz ortalamalarından anlamlı derecede yüksek bulduk ($p<0,05$).
5. HUVEC hücre hattına tıbbi sülük salgısı uygulamasının ardından yapılan Flow sitometri analizinde%100'e yakın hücre canlılık oranları bulunmuş olup hücrelerin apoptoza ve/veya nekroza gitmediğini belirledik.
6. Meme fibroblast hücre hattına uygulanan farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktının 24. ve 48. saatlerde tüm gruplara ait hücre canlılığı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemledik ($p<0,001$).
7. Meme fibroblast hücre hattında 24. ve 48. saatlik MTT sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldığında 24.saatteki absorbanslarının 48.saatteki absorbanslara göre anlamlı derecede yüksek bulduk ($p<0,001$).

8. Meme fibroblast hücre hattına uygulanan in vitro yara modelinde 50 µg/ml dozunun 24.saatte yara modelini kapattığını gözlemledik. Kontrol grubu ve diğer dozlarda 24.saatte yara bölgesinde bir miktar kapanma olmasına rağmen, 50 µg/ml dozunda olduğu gibi tam kapanma olmadığını tespit ettik. ($p<0,001$).
9. Meme fibroblast hücre hattında FGF, EGF ve VEGF gen ekspresyonları gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğunu görülmüştür. Anlamlı farkın kaynağını bulmak için gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldığında, 200 µg/ml doz uygulamasına ait FGF, EGF ve VEGF gen ekspresyonları ortalaması kontrol ve diğer doz ortalamalarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$).
10. Meme fibroblast hücre hattına tıbbi sülük salgısı uygulamasının ardından yapılan Flow sitometri analizinde %100'e yakın hücre canlılık oranları bulunmuş olup hücrelerin apoptoza ve/veya nekroza gitmediğini belirledik.
11. Mezenkimal kök hücre hattına uygulanan farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktının 24.ve 48. saatlerde tüm gruplara ait hücre canlılığının kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu bulduk ($p<0,001$).
12. Mezenkimal kök hücre hattına uygulanan farklı dozlardaki tıbbi sülük salgı ekstraktının 24. ve 48. saatlik MTT sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldığında tüm grupların 48.saatteki absorbanslarının 24.saatteki absorbanslara göre anlamlı derecede yüksek olduğunu gördük ($p<0,001$).
13. Mezenkimal kök hücre hattına uygulanan in vitro yara modelinde 50 µg/ml dozunun kontrol grubunda olduğu gibi 24.saatte tüm alanları hücreler ile kapattığını gözlemledik.
14. Mezenkimal kök hücre hattında EGF ve VEGF gen ekspresyonları gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğunu görülmüştür. Anlamlı farkın kaynağını bulmak için gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldığında, kontrol ve 200 µg/ml doz gruplarındaki EGF ölçüm ortalamalarının diğer doz grup ortalamalarından anlamlı derecede yüksek olduğu gördük ($p<0,001$). Kontrol grubundaki VEGF gen ekspresyonu ölçüm ortalamasının ise 50 µg/ml doz grubundan anlamlı derecede yüksek bulduk ($p<0,001$).
15. Mezenkimal kök hücre hattına tıbbi sülük salgısı uygulamasının ardından yapılan Flow sitometri analizinde; uygulanan sülük salgı dozu arttıkça hücrelerde nekrotik etkinin arttığını belirledik. Doz ve nekroz arasında doğru orantılı bir ilişki olduğunu gözlemledik.

KAYNAKLAR

1. Gödekmerdan, A., Arusan, S., Bayar, B., ve Sağlam, N. (2011). Tıbbi sülükler ve hirudoterapi. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*, 35(4), 234-239.
2. Glyova, O. (2005). Modern hirudotherapy-a review.(Biotherapeutics, Education and Research Foundation). *The (BeTER) LeTTER*, 2, 1-3.
3. Abdullah, S., Dar, L. M., Rashid, A., and Tewari, A. (2012). Hirudotherapy/leech therapy: applications and indications in surgery. *Archives of Clinical and Experimental Surgery*, 1(3), 172-180.
4. Söllner, C., Mentele, R., Eckerskorn, C., Fritz, H., and Sommerhoff, C. P. (1994). Isolation and characterization of hirustasin, an antistatin-type serine-proteinase inhibitor from the medical leech *Hirudo medicinalis*. *European Journal of Biochemistry*, 219(3), 937-943.
5. Ayhan, H., ve Mollahaliloğlu, S. (2018). Tıbbi sülük tedavisi: Hirudoterapi. *Ankara Medical Journal*, 18(1), 141-148.
6. Minkin, B. I. (1990). Leeches in modern medicine. *Carolina Tips*, 52, 1-6.
7. Baskova, I. P., Aguejouf, O. M., Azougagh-Oualane, F., Zavalova, L. L., Basanova, A. V., and Doutremepuich, C. (1995). Arterial antithrombotic effect of piyav1t, the novel pharmacological preparation from the medicinal leech, and of its components, prostanooids and enzyme destabilase. *Thrombosis Research*, 77(6), 483-492.
8. Salzet, M. (2001). Anticoagulants and inhibitors of platelet aggregation derived from leeches. *FEBS Letters*, 492(3), 187-192.
9. Sağlam, N. (2019). Tıbbi Sülük Türleri *Hirudo sulukii* ve *Hirudo verbana*'nın İç ve Dış Morfolojik Özellikleri. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*, 43(4), 204.
10. Gödekmerdan, A., Arusan, S., Bayar, B., ve Sağlam, N. (2011). Medicinal leeches and hirudotherapy. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*, 35(4), 234.
11. Atmaca, V. (2011). Tıp ve Tıbb-i Nebevi hakkında muasır çalışmalar (Bibliyografya Denemesi). *Fırat Üniversitesi İlahiyat Fakültesi Dergisi*, 16(1).
12. Yakışan Maden, R. Ş. (2015). *Varis tedavisinde rutin tedaviler ile tıbbi sülük tedavisinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi*, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Erzurum.
13. Hildebrandt, J. P., and Lemke, S. (2011). Small bite, large impact–saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Naturwissenschaften*, 98(12), 995-1008.
14. Gasic, G. J., Viner, E. D., Budzynski, A. Z., and Gasic, G. P. (1983). Inhibition of lung tumor colonization by leech salivary gland extracts from *Haementeria ghilianii*. *Cancer Research*, 43(4), 1633-1636.

15. Resmi Gazete. (2014). *Geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamaları yönetmeliği*. Tarih: 27.10.2014 ve sayı: 29158.
16. Sağlam, N. (2000). *Sülük biyolojisi ve yetiştirme teknikleri*. Ticari Balık Türlerinin Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri Hizmet İçi Eğitim Semineri, 1-5.
17. Lone, A. H., Ahmad, T., Anwar, M., Habib, S., Sofi, G., and Imam, H. (2011). Leech therapy-a holistic approach of treatment in unani (greeko-arab) medicine. *Ancient Science of Life*, 31(1), 31.
18. Aloto, D., and Eticha, E. (2018). Leeches: A review on their pathogenic and beneficial effects. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 9(1), 511.
19. Abdulkader, A. M., Ghawi, A. M., Alaama, M., Awang, M., and Merzouk, A. (2013). Leech therapeutic applications. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(2), 127.
20. Ma, C. J., Li, X., and Chen, H. (2021). Research progress in the use of leeches for medical purposes. *Traditional Medicine Research*, 6(2), 15-27.
21. Kazancı, N., Ekingen, P. I. N. A. R., Dügel, M., and Türkmen, G. E. N. C. E. R. (2015). Hirudinea (Annelida) species and their ecological preferences in some running waters and lakes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(3), 1087-1096.
22. Trontelj, P., and Utevsky, S. Y. (2005). Celebrity with a neglected taxonomy: molecular systematics of the medicinal leech (genus *Hirudo*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34(3), 616-624.
23. Sig, A. K., Guney, M., Guclu, A. U., and Ozmen, E. (2017). Medicinal leech therapy—an overall perspective. *Integrative Medicine Research*, 6(4), 337-343.
24. Das, B. K. (2014). An overview on hirudotherapy/leech therapy. *Indian Research Journal of Pharmacy and Science* 1(1), 34-45.
25. Johnson, Ph. D, P. H. (1994). Hirudin: clinical potential of a thrombin inhibitor. *Annual review of Medicine*, 45(1), 165-177.
26. Öner Küçük, M., and Yaman, O. (2019). Tıbbi sülük terapisi (Hirudoterapi). *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 3, 29-46.
27. Hovingh, P., and Linker, A. (1999). Hyaluronidase activity in leeches (Hirudinea). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 124(3), 319-326.
28. Abdisa, T. (2018). Therapeutic importance of leech and impact of leech in domestic animals. *MOJ Drug Design Development and Therapy*, 2, 235-242.
29. Nikonov, G. I., and Titova, E. A. (1999). Destabilase complexes-natural liposome produced by medicinal leeches *Hirudo medicinalis*. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 13(1), 102-106.

30. Zaidi, S. M., Jameel, S. S., Zaman, F., Jilani, S., Sultana, A., and Khan, S. A. (2011). A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. *Alternative Medicine Review*, 16(1), 59-65.
31. Trak, G. (2019). Hirudoterapi ve cerrahide kullanımı. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 3, 47-54.
32. Özkaptan, B. B. (2019). Geleneksel bir tedavi yöntemi: Tıbbi sülük tedavisi (Hirudoterapi). İ. Çaltekin ve M. Çaltekin (Ed.). *Sağlık bilimleri alanında araştırma makaleleri-1*, Ankara: Gece Akademi, 96.
33. Chudzinski-Tavassi, A. M., Kelen, E. M. A., de Paula Rosa, A. P., Loyau, S., Sampaio, C. A., Bon, C., and Anglés-Cano, E. (1998). Fibrino (geno) lytic properties of purified hementerin, a metalloproteinase from the leech *Haementeria depressa*. *Thrombosis and Haemostasis*, 80(07), 155-160.
34. Seymour, J. L., Henzel, W. J., Nevins, B. E. T. A. L., Stults, J. T., and Lazarus, R. A. (1990). Decorsin. A potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor from the leech *Macrobdella decora*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(17), 10143-10147.
35. Jung, H. I., Kim, S. I., Ha, K. S., Joe, C. O., and Kang, K. W. (1995). Isolation and Characterization of Guamerin, a New Human Leukocyte Elastase Inhibitor from *Hirudo nipponia**. *Journal of Biological Chemistry*, 270(23), 13879-13884.
36. Kim, D. R., and Kang, K. W. (1998). Amino acid sequence of piguamerin, an antistasin-type protease inhibitor from the blood sucking leech *Hirudo nipponia*. *European Journal of Biochemistry*, 254(3), 692-697.
37. Tokem, Y. (2006). Astımlı hastalarda tamamlayıcı ve alternatif tedavi kullanımı. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 54(2), 189-196.
38. Srivastava, A., and Sharma, R. (2010). A brief review on applications of leech therapy. *Archives of Applied Science Research*, 2(2), 271-274.
39. Bayir, Z. K., Yürümez, Y., ve Aslan, N. (2021). Sülük Tedavisi ile ilişkili senkop: Olgu sunumu. *Geleneksel ve Tamamlayıcı Anadolu Tıbbi Dergisi*, 3(1), 7-11.
40. Hoşnüter, M., Demircan, N., Ünalacak, M., ve Kargı, E. (2003). Modern tıbbın yeniden keşfettiği bir alternatif tedavi metodu: Hirudoterapi. *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi*, 7(4), 177-179.
41. Öztaş, P. (2021). Yara iyileşmesi, bakımı ve tedavisi. *Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*. 54(2), 341-351.
42. Nauta, A., Gurtner, G. C., and Longaker, M. T. (2011). Wound healing and regenerative strategies. *Oral Diseases*, 17(6), 541-549.
43. Han, G., and Ceilley, R. (2017). Chronic wound healing: A review of current management and treatments. *Advances in Therapy*, 34(3), 599-610.

44. George Broughton, I. I., Janis, J. E., and Attinger, C. E. (2006). The basic science of wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7), 12-34.
45. Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9(6), 653-660.
46. Lawrence, W. T., and Diegelmann, R. F. (1994). Growth factors in wound healing. *Clinics in Dermatology*, 12(1), 157-169.
47. Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 422-433.
48. Hopf, H. W., Gibson, J. J., Angeles, A. P., Constant, J. S., Feng, J. J., Rollins, M. D., and Hunt, T. K. (2005). Hyperoxia and angiogenesis. *Wound Repair and Regeneration*, 13(6), 558-564.
49. Ausprunk, D. H., and Folkman, J. (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular Research*, 14(1), 53-65.
50. Konukoğlu, D., ve Turhan, M. (2005). Anjiyogenezin Temel Moleküler Mekanizmaları Ve Tümör Anjiyogenezini. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 36(1), 42-48.
51. Vural, P. (2018). Fizyolojik ve Patolojik Anjiyogenezde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün Rolü. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 16(1), 53-62.
52. Hu, D. E., Hori, Y., and Fan, T. P. (1993). Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats. *Inflammation*, 17(2), 135-143.
53. Cohen, S. (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *Journal of Biological Chemistry*, 237(5), 1555-1562.
54. Carpenter, G. (1979). Cohen. S. Epidermal growth factor. *Annual Review of Biochemistry*, 48, 193-216.
55. Sibilio, M., and Wagner, E. F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*, 269(5221), 234-238.
56. Sibilio, M., Steinbach, J. P., Stingl, L., Aguzzi, A., and Wagner, E. F. (1998). A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *The EMBO Journal*, 17(3), 719-731.
57. Yarım, G. F., ve Kazak, F. (2016). Epidermal büyüme faktörü. *Kocatepe Veterinary Journal*, 9(3), 215-225.
58. Türkyılmaz, A., Çelebi, N., and Gönül, B. (1996). 'Epidermal büyüme faktörü (EGF)'nin yara iyileşmesindeki rolü'. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21, 61-69.

59. Steiling, H., and Werner, S. (2003). Fibroblast growth factors: key players in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5), 533-537.
60. D'Amore, P. A. (1990). Modes of FGF release in vivo and in vitro. *Cancer and Metastasis Reviews*, 9(3), 227-238.
61. Güleş, Ö., ve Ülker, E. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73-78.
62. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
63. Abdulkader, A. M., Merzouk, A., and Ghawi, A. M. (2011). The anticoagulant activity of Malaysian leech saliva extract. In *the Abstracts of the 25th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology*. Selangor, Malaysia: University Putra Malaysia.
64. Alaama, M., Helaluddin, A. B. M., Mohammad, A., Merzouk, A., Abdulkader, A. M., and Awang, M. (2014). Starvation time and successive collection effects on leeches saliva collection quantity and proteins quality and quantity in wet season. *Sains Malaysiana*, 43(11), 1693-1697.
65. Lowry, O. H. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
66. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
67. Ökçesiz, A., ve Bucurgat, Ü. Ü. (2017). Sitotoksosite çalışmalarında kök hücre. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 41(2), 1-14.
68. Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., and Falanga, V. (2017). Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(2), e11-e16.
69. Jonkman, J. E., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., and Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion and Migration*, 8(5), 440-451.
70. Buachan, P., Chularojmontri, L., and Wattanapitayakul, S. K. (2014). Selected activities of Citrus maxima Merr. fruits on human endothelial cells: enhancing cell migration and delaying cellular aging. *Nutrients*, 6(4), 1618-1634.
71. Shakouri, A., Kahroba, H., Hamishekar, H., and Abdolalizadeh, J. (2022). Nanoencapsulation of Hirudo medicinalis proteins in liposomes as a nanocarrier for inhibiting angiogenesis through targeting VEGFA in the Breast cancer cell line (MCF-7). *BioImpacts: BI*, 12(2), 115.

72. Merzouk, A., Ghawi, A. M., Abdualkader, A. M., Abdullahi, A., and Alaama, M. (2012). Anticancer effects of medical Malaysian leech saliva extract (LSE). *Pharmaceutica Analytica Acta*, 15, 2-6.
73. Hessein, M., Ammar, A., Chin, M., Abdualkader, A., Alaama, M., Merzouk, A., and Guns, E. (2015). Assessment of the antitumor activity of leech (*hirudinaria manillensis*) saliva extract in prostate cancer. *American Society of Clinical Oncology*, 33(15).
74. Mahmoudi, S., Ebtia, M., Merzouk, A., Stratton, S., Jalili, R., and Ghahary, A. (2016). Evaluation of the Anti-Glucotoxic Effects of Leech Saliva Extract (LSE) on Mouse and Human Pancreatic Islets. *Canadian Journal of Diabetes*, 40(5), S71.
75. Xu, L., Li, X., Zhang, E., Liang, H., Li, W., Wang, S., and Ji, A. (2019). The effect of leech extracts on endothelial cell coagulation-related factors and endothelial dysfunction-related molecules. *Clinical and Experimental Hypertension*, 41(3), 220-230.
76. Wang, C. H., Pandey, S., Sivalingam, K., Shibu, M. A., Kuo, W. W., Viswanadha, V. P., and Huang, C. Y. (2021). Leech extract: a candidate cardioprotective against hypertension-induced cardiac hypertrophy and fibrosis. *Journal of Ethnopharmacology*, 264, 113346.
77. Zhao, L. (2015). Hirudin inhibits cell growth via ERK/MAPK signaling in human glioma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(11), 20983-20987.
78. Pang, X., Zhang, Y., Peng, Z., Shi, X., Han, J., and Xing, Y. (2020). Hirudin reduces nephropathy microangiopathy in STZ-induced diabetes rats by inhibiting endothelial cell migration and angiogenesis. *Life Sciences*, 255, 117779.
79. Darestani, K. D., Mirghazanfari, S. M., Moghaddam, K. G., and Hejazi, S. (2014). Leech therapy for linear incisional skin-wound healing in rats. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 7(4), 194-201.
80. Amani, L., Motamed, N., Ardakani, M. M., Shasaltaneh, M. D., Malek, M., Shamsa, F., and Amin, M. (2021). Semi-Solid Product of Medicinal Leech Enhances Wound Healing in Rats. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 16(4), e113910.
81. Nair, H. K., Ahmad, N. W., Lee, H. L., Ahmad, N., Othamn, S., Mokhtar, N. S. H. M., and Chong, S. S. Y. (2020). Hirudotherapy in wound healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 10, 1177.
82. Durrant, C., Townley, W. A., Ramkumar, S., and Khoo, C. T. K. (2006). Forgotten digital tourniquet: salvage of an ischaemic finger by application of medicinal leeches. *The Annals of The Royal College of Surgeons of England*, 88(5), 462-464.
83. Mortenson, B. W., Dawson, K. H., and Murakami, C. (1998). Medicinal leeches used to salvage a traumatic nasal flap. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 36(6), 462-464.

84. Tettamanti, G., Grimaldi, A., Rinaldi, L., Arnaboldi, F., Congiu, T., Valvassori, R., and De Eguileor, M. (2004). The multifunctional role of fibroblasts during wound healing in *Hirudo medicinalis* (Annelida, Hirudinea). *Biology of the Cell*, 96(6), 443-455.
85. Cialdai, F., Colciago, A., Pantalone, D., Rizzo, A. M., Zava, S., Morbidelli, L., and Monici, M. (2020). Effect of unloading condition on the healing process and effectiveness of platelet rich plasma as a countermeasure: study on in vivo and in vitro wound healing models. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 407.
86. Baranzini, N., Weiss-Gayet, M., Chazaud, B., Monti, L., de Eguileor, M., Tettamanti, G., and Grimaldi, A. (2020). Recombinant HvRNASET2 protein induces marked connective tissue remodelling in the invertebrate model *Hirudo verbana*. *Cell and Tissue Research*, 380(3), 565-579.
87. Yingxin, G., Guoqian, Y., Jiaquan, L., and Han, X. (2013). Effects of natural and recombinant hirudin on VEGF expression and random skin flap survival in a venous congested rat model. *International Surgery*, 98(1), 82-87.
88. Kirchner, L. M., Meerbaum, S. O., Gruber, B. S., Knoll, A. K., Bulgrin, J., Taylor, R. A. J., and Schmidt, S. P. (2003). Effects of vascular endothelial growth factor on wound closure rates in the genetically diabetic mouse model. *Wound Repair and Regeneration*, 11(2), 127-131.
89. De Eguileor, M., Grimaldi, A., Tettamanti, G., Ferrarese, R., Congiu, T., Protasoni, M., and Lanzavecchia, G. (2001). *Hirudo medicinalis*: a new model for testing activators and inhibitors of angiogenesis. *Angiogenesis*, 4(4), 299-312.
90. Shen, Y., Ye, H., Zhang, D., Yang, M., Ji, Y., Tang, L., and Yuan, L. (2022). The role of exosomal CDC6 in the hirudin-mediated suppression of the malignant phenotype of bladder cancer cells. *Gene*, 821, 146269-146278.
91. Zhu, J., Pan, X., Lin, B., Lin, G., Pradhan, R., Long, F., and Yin, G. (2019). The effect of hirudin on antagonizing thrombin induced apoptosis of human microvascular endothelial cells. *Acta Cirurgica Brasileira*, 34(1), e20190010000006.
92. Leech, M., Metz, C., Hall, P., Hutchinson, P., Gianis, K., Smith, M., and Morand, E. F. (1999). Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis and Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 42(8), 1601-1608.
93. Liu, W., Liang, X. C., and Shi, Y. (2020). Effects of hirudin on high glucose-induced oxidative stress and inflammatory pathway in rat dorsal root ganglion neurons. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 26(3), 197-204.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TIRIK, Nihan
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri :
 Medeni hali :
 e-posta :

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi/ Biyoloji Anabilim Dalı	2017
Lisans	Samsun 19 Mayıs Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2004
Lise	Samsun 19 Mayıs Lisesi	1998

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2016-devam ediyor	Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Biyolog
2014-2016	Gülhane Askeri Tıp Akademisi	Biyolog
2010	Kara Kuvvetleri Komutanlığı / Gıda Kontrol Müfreze Komutanlığı	Biyolog
2004-2008	Özel Kurumlarda Biyoloji Öğr.	Öğretmen

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Sertifikalar

1. Facs Canto II Flow Sitometri
2. Luminex HLA SSO, SSP, PRA



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

