IN VITRO EFFECT OF MEDICINAL LEECH SALIVA EXTRACT ON PROLIFERATION, WOUND HEALING AND -APOPTOSIS IN BREAST FIBROBLAST CELL LINE

Nihan Tirik [1 *], Kübranur Ünal [2], Hüseyin Ayhan [3], Leyla Memmedova [4], M. Pınar Elçi [5]

[1,5] Gazi University Institute of Health Sciences, Ankara

[1] ORCID ID: 0000-0001-5832-9579,nihan0621@gmail.com

[5] ORCID ID: 0000-0003-1007-9456,muallapinarelci@gmail.com

[2,4] Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Ankara

[2] ORCID ID: 0000-0001-7940-4590,kubranurunal@gazı.edu.tr

[4] ORCID ID: 0000-0002-3131-3152, leyla mammadova@gazi.edu.tr

[3] Yıldırım Beyazıt University Vocational School of Health Services, Ankara

[3] ORCID ID:0000-0001-9519-5979, drhayhan@gmail.com

**** Corresponding Author***

Abstract

Medical leech therapy is frequently used as a traditional and complementary treatment method in Turkey and all over the world. Many biologically and pharmacologically effective bioactive substances have been detected in leech secretion. 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. In our study, *Hirudo verbana* were used as a sterile medicinal leeches Leech saliva extract was obtained by milking method after feeding. Total protein concentration was determined from this secretion by Lowry method. Various dose amounts (400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml and 50 µg/ml) were adjusted by serial dilution. The healthy breast fibroblast cell line (HTB-125) was used in this study. The certain doses of leech secretion have been applied on reproductive cells. MTT test was used to evaluate cell viability and cell proliferation after 24 and 48 hours. The effect of leech saliva extract on wound healing was evaluated with the in vitro wound model. The images of wound closure were taken under the light microscope of the created wound model at zero, eight and 24 hours. RT-PCR method was used for mRNA expression determination of VEGF, EGF and FGF genes in breast fibroblast cells. The possible effect of the extract on apoptosis was investigated by flow cytometry using Annexin V/propidium iodide dyes. In cell viability test, the cell viability of breast fibroblasts applied different doses of leech saliva was found to be significantly higher than the control group ($p<0.001$). In particular, the effective dose is 100 µg/ml at both the 24th and 48th hours. In the in vitro wound model, it was observed that the applied dose of 50 µg/ml covered all areas with cells at 24 hours. In RT-PCR analysis, mRNA expression levels of EGF and VEGF genes were found to be significantly higher at 200 µg/ml leech saliva dose compared to control and other doses ($p<0.001$). In the flow cytometry analysis, cell viability rates close to 100% were found in the cell line and it was determined that the cells did not have apoptosis and/or necrosis.

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. We predict that our findings will contribute to the development of alternative treatment approaches.

Keywords: *Leech Saliva Extract, Wound healing, Angiogenesis, Apoptosis, Proliferation*

TIBBİ SÜLÜK SALGISININ MEME FİBROBLAST HÜCRE HATTINDA PROLİFERASYON, YARA İYİLEŞMESİ VE APOPTOZ ÜZERİNE İN VİTRO ETKİSİ

Özet

Tıbbi sülük tedavisi Türkiye ve tüm dünyada geleneksel ve tamamlayıcı bir tedavi yöntemi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Sülük salgısında biyolojik ve farmakolojik açıdan etkili birçok biyoaktif madde tespit edilmiştir. Çalışmamızda tıbbi sülük salgısının hücre canlılığı, yara iyileşmesi, apoptoz ve bu etkilerden sorumlu olası gen ekspresyonlarını incelenmek amaçlanmıştır. Çalışmamızda *Hirudo verbana* cinsi steril tıbbi sülükler kullanıldı. Sülük salgısı beslenme sonrası sülük sağım yöntemi ile elde edildi. Bu salgıdan Lowry yöntemi ile total protein konsantrasyonu tayin edilerek, seri dilusyon ile çeşitli doz miktarları (400 µg/ml,200 µg/ml,100 µg/ml ve 50µg/ml) ayarlandı. Çalışmamızda sağlıklı meme hücresi olan meme fibroblast (HTB-125) hücre hattı kullanılmış olup, üretilen hücreler üzerine belirlenen dozlarda sülük salgısı uygulanmıştır. 24 ve 48 saat sonundaki hücre canlılığı ve proliferasyonun

değerlendirilmesi için MTT testi ile yapıldı. Sülük salgısının yara iyileşmesi üzerine etkisi in vitro yara modeli yöntemi ile değerlendirildi. Oluşturulan yara modelinde 0.,8. ve 24.saatlerde ters ışık mikroskobunda yara kapanmasına ait görüntüler alındı. Farklı dozlarda sülük salgısı uygulanan meme fibroblast hücrelerindeki VEGF, EGF ve FGF genlerinin mRNA ekspresyon tayininde RT-PCR yöntemi kullanıldı. Apoptozis üzerine olası etkisi Anneksin V/propidium iyodür boyaları kullanılarak flow sitometre ile araştırıldı. Hücre proliferasyonunu açısından, sülük salgısının farklı dozları uygulanan meme fibroblastlarındaki hücre canlılığı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Özellikle hem 24.saatteki hem de 48.saatteki etkin doz 100 µg/ml'dir. İn vitro yara modeli uygulamasında 50 µg/ml uygulanan dozun 24. saatte tüm alanları hücreler ile kapattığı gözlemlenmiştir. RT-PCR analizinde, 200 µg/ml'lik sülük salgısı dozunda EGF ve VEGF genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri kontrol ve diğer dozdaki gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Flow sitometri analizinde hücre hattında %100 yakın hücre canlılık oranları bulunmuş olup hücrelerin apoptoza ve/veya nekroza gitmediği belirlenmiştir. Bu çalışmada farklı dozlardaki sülük salgısının meme fibroblast hücreleri üzerinde hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, yara iyileşmesi ve anjiogenez için gen ekspresyonu üzerine önemli etkileri olduğu bulunmuştur. Bulgularımızın alternatif tedavi yaklaşımlarının gelişimine katlı sağlayacağını öngörmekteyiz.

Anahtar Kelimeler:*Sülük Salgı Ekstraktı, Yara iyileşmesi, Anjiyogenez, Apoptoz,Proliferasyon.*