T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GENÇ VE YAŞLI DERİ FİBROBLAST HÜCRELERARASI KUVVETLERİNİN, HP(HIGH THROUGHPUT) BIOFORCE SİSTEM İLE, BİYOFİZİKSEL VE ULTRASTRÜKTÜREL DÜZEYDE DEĞERLENDİRİLMESİ VE CTFG, COL1A1, MMP1 GEN İFADELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

GÖZDE DURSUN

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2014

DEU.HSI.MSc-2011970099

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GENÇ VE YAŞLI DERİ FİBROBLAST HÜCRELERARASI KUVVETLERİNİN, HP(HIGH THROUGHPUT) BIOFORCE SİSTEM İLE, BİYOFİZİKSEL VE ULTRASTRÜKTÜREL DÜZEYDE DEĞERLENDİRİLMESİ VE CTFG, COL1A1, MMP1 GEN İFADELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÖZDE DURSUN

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Sefa Kızıldağ
İkinci Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Ayşegül Temiz Artmann

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2011970099

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Gözde Dursun 'Genç ve yaşlı deri fibroblast hücrelerarası kuvvetlerinin, HP(high throughput) BIOFORCE sistem ile, biyofiziksel ve ultrastrüktürel düzeyde değerlendirilmesi ve CTFG,COL1A1, MMP1, gen ifadelerinin karşılaştırılması' konulu Yüksek Lisans tezini 27.08.2014 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Doç. Dr. Sefa KIZILDAĞ
BAŞKAN

Yard. Doç. Dr. Çiğdem E. Yazıcıoğlu
ÜYE

Yard. Doç. Dr. Yasemin Soysal
ÜYE

Prof. Dr. Ogün Sercan
ÜYE

Doç. Dr. Ayhan Abacı
ÜYE

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ 13
2. GENEL BİLGİLER 15
2.1 Deri Dokusu 15
2.1.1 Epidermis 16
2.1.2 Dermis 17
2.1.3 Hipodermis 18
2.2 Dermal Fibroblastlar 18
2.3 Ekstrasellülar Matriks (ECM) 19
2.3.1 Kollajen 20
2.3.2 Elastik Fiberler 21
2.3.3 Glikozaminoglikan (GAG) 21
2.4 Hücre İskeleti 21
2.4.1 Aktin Filamanları 22
2.4.2 Mikrotübüller 23
2.4.3 Ara Filamanlar 24
2.5 Hücresel Bağlantılar 25
2.5.1 İntegrinler 25
2.5.2 Kaderinler 25
2.6 Deri Yaşlanması 28
2.6.1 İntrensek Yaşlanma 29
2.6.2 Ekstrensek Yaşlanma 30
2.7 Dermal Dokuda Mekanik Kuvvetler ve Tansiyon 32
2.7.1 Fibroblastlar ve Hücresel Kuvvetler 35
2.8 Dermal Yaşlanmanın MMP1, CTFG ve COL1A1 Genleri ile İlişkisi 36
2.8.1 MMP 1 Gen Yapısı İşlevi ve Kromozom Yerleşimi 36
2.8.2 CTGF Gen Yapısı İşlevi ve Kromozom Yerleşimi 36

2.8.3 COL1A1 Gen Yapısı İşlevi ve Kromozom Yerleşimi 37
2.9 HP Bioforce Ölçümü 37
2.9.1 Cell Drum^{TM} Teknolojisi 37
2.9.2 HP Bioforce Teknolojisi 39
3. GEREÇ VE YÖNTEM 40
3.1. Araştırmanın Tipi 40
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı 40
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları 40
3.4 Çalışma Materyali 40
3.5. Araştırmanın Değişkenleri 40
3.6. Veri Toplama Araçları 41
3.7 Araştırma Planı ve Takvimi 42
3.8 Verilerin değerlendirilmesi 43
3.8.1 Hücre Kültüründe Kullanılan Methodlar 43
3.8.1.1 Hücre Hattı Seçimi 43
3.8.1.2 Besi Ortamı Hazırlanması 43
3.8.2 HP Bioforce Ölçümleri için Kullanılan Metodlar 49
3.8.3 HP Bioforce Ölçüm Metodu 56
3.8.4 Gerçek Zamanlı PCR 58
3.8.5 Verilerin İstatiksel Analizleri 63
3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları 64
3.10 Etik Kurul Onayı 64
4. BULGULAR 65
4.1 Trombin Konsantrasyonu Belirlenmesi 65
4.2 Trombin ve TGF Beta'nın Hücresel Kuvvetlere Etkisi 65
4.3 İçeriklerin Hücresel Kuvvetlere Etkisi 70
4.4 Gerçek Zamanlı PCR 72

5. TARTIŞMA 77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 81
7. KAYNAKLAR 82
8. EKLER 87

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Projede kullanılan mevcut makine/malzeme-teçhizat listesi 41
Tablo 2. Projede kullanılan sarf malzemeler ve diğer gereçler 42
Tablo 3. Araştırmanın öngörülen çalışma süresi 42
Tablo 4. Kullanılan Hücre Hatları Listesi..... 43
Tablo 5. Yaşlı hücre hatlarına uygulanan içerekler ve konsantrasyonları 56
Tablo 6. cDNA sentezinin ilk basamağı birleşenleri..... 61
Tablo 7. cDNA sentezinin ikinci basamağı birleşenleri 61
Tablo 8. İfadesi Araştırılan Genler ve Primerleri 62
Tablo 9. Gerçek zamanlı PCR için oluşturulan karışım birleşenleri ve miktarları..... 62
Tablo 10. Gerçek zamanlı PCR reaksiyon basamakları 63
Tablo 11. CTFG'nin yeni primerleri..... 63
Tablo 12. 29 ve 59 yaş arasındaki hücresel kuvvetlerin ölçümü sonucunda elde edilen bulgular 68
Tablo 13. 59, 73 Ve 77 Yaşlarından Oluşan Hücrelere TGF beta ve Beş Farklı İçerikle İnkübasyonu Sonucu Hücresel Kuvvetlerin Ölçümü Sonuçları Ve Standart Sapma Değerleri..... 70
Tablo 14. RNA Konsantrasyon Ölçüm Sonuçları..... 72
Tablo 15. Gerçek zamanlı PCR sonucu alınan Ct değerlerinin ortalaması ve standart sapmalarının gösterilmesi..... 74
Tablo 16. Gerçek zamanlı PCR sonucunda MMP1, COL1A1 ve CTFG genlerinin Ct değerlerinin ACTB Ct değeri ile normalizasyonu 75
Tablo 17. Genç ve yaşlı hücreler arasındaki ΔCt farklarından elde edilen ΔΔCt değerleri..... 75
Tablo 18. Genç ve Yaşlı Hücreler Arasındaki Ekspresyon Değişimi farklarının Saptanması 75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Derinin Yapısı 15
Şekil 2. Epidermisin Tabakaları 17
Şekil 3. Fibroblastın Yapısı 18
Şekil 4. Ekstrasellülar Matriks (ECM) Bileşenleri 20
Şekil 5. A) Kollajen molekülü α zincirleri B) Kollajen molekülü 20
Şekil 6. Aktin Polimerizasyonu 23
Şekil 7. Mikrotübüllerin ikincil yapısı 24
Şekil 8. Desmozomlar 26
Şekil 9. Aralık (gap) Bağlantılar 27
Şekil 10. Sıkı Bağlantılar 28
Şekil 11. Telomer Kısalması ve Telomeraz Aktivitesi 29
Şekil 12. Yaşlanmanın Moleküler Şeması 32
Şekil 13. Dokuya etki eden mekanik kuvvetler ve tansiyon 33
Şekil 14. Dokunun stres gerilim eğrisinde kollajen davranışı 34
Şekil 15. MMP 1'in Kromozom 11 üzerinde yerleşimi 36
Şekil 16. CTGF'nin Kromozom 11 üzerinde yerleşimi 37
Şekil 17. COL1A1'in Kromozom 11 üzerinde yerleşimi 37
Şekil 18. Cell Drum Teknolojisi 38
Şekil 19. BioRad "Cell Counter "Sayım Slaytı 46
Şekil 20. Slaytın cihaz içine yerleştirilmesi..... 46
Şekil 21. Alınan sonuçların ekranda gösterilmesi 46
Şekil 22. Neubauer Lamı 47
Şekil 23. Neubauer Lamı Sayım Alanı ve Sayım Sistemi 48
Şekil 24. 24'lük silikon membran plaka..... 49
Şekil 25. Ölçüm haznesi ve haznenin kapağı 51
Şekil 26. Silikon membran plakanın ölçüm haznesine yerleştirilmesi 51
Şekil 27. HP Bioforce İnkübatör düzeneği 52
Şekil 28. HP Bioforce Sisteminde kullanılan pompa 52
Şekil 29. (I) Ölçümün ilk 4 saniyesinde alınan grafik (II) Ölçümün ilk 10 saniyesinde alınan grafik (III)Ölçüm sonucunda elde edilen grafik..... 54
Şekil 30. Silikon membrana uygulanan basıncın zamanla değişimi grafiği 57
Şekil 31. TGF Beta'nın yaşlanma sürecine etki mekanizması 66
Şekil 32. 29 yaş hücrelerinin cell drum üzerindeki görüntüsü 66

Şekil 33. 59 yaş hücrelerinin cell drum üzerindeki görüntüsü 67
Şekil 34. 29 Yaş ve 59 Yaş arasındaki hücresel kuvvetlerin trombin ve TGF beta uygulamaları(24 sa ve 48 sa)ile değişiminin kendi aralarında ve kontrol grubuyla karşılaştırılması 68
Şekil 35. Wilcoxon Testi sonucunda elde edilen p değerleri 69
Şekil 36. 59, 73 Ve 77 Yaşlarından Oluşan Beş Farklı İçerikle ve TGF beta ile İnkübasyonu Sonucunda Hücresel Kuvvet Değişimlerinin Karşılaştırılması 71
Şekil 37. Wilcoxon Testi sonucunda elde edilen p değerleri 71
Şekil 38. PCR Amplifikasyon / Döngü Grafiği (ilk deneme)..... 73
Şekil 39. PCR Amplifikasyon / Döngü Grafiği (ikinci Deneme) 73

KISALTMALAR

ECM : Ekstrasellülar Matriks
PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TGF-β : Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
GAG: Glikozaminoglikan
DNA: Deoksiribonükleik Asit
RNA: Ribonükleik Asit
mDNA: Mitokondiriyal Deoksiribonükleik Asit
mRNA: Mesajcı Ribonükleik Asit
ROÜ: Reaktif Oksijen Ürünleri ve reaktif nitrojen ürünleri
RNÜ: Reaktif Nitrojen Ürünleri
UV: Ultraviyole
PMMA: Polimetilmetakrilat
HDFa : Homo sapiens fibroblast
CTFG : Bağ doku faktörü
MMP1 : Matriks metalloproteinaz 1(kollejenaz)
COL1A1: Kollajen tip 1
µm: Mikrometre

TEŞEKKÜR

Herşeyden önce, Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başlama şansını bana veren ve her zaman bana destek olan danışmanım Doç.Dr. Sefa Kızıldağ'a, Almanya Jülich'de bulunan laboratuarına beni kabul eden ve yüksek lisans tezimi oluşturmam için katkısını esirgemeyen ve her zaman olumlu düşünceleri ile beni motive eden ikinci danışmanım Prof.Dr.Ayşegül Temiz Artmann'a, tüm içten teşekkürlerimi sunarım.

İkinci danışmanım Prof.Dr. Ayşegül Temiz Artmann ile bağlantı kurmam için fırsat yaratan, Prof.Dr. Neşe Atabey başta olmak üzere Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda eğitimime katkıda bulunan tüm öğretim üyelerine, çok teşekkür ederim.

FH Aachen Üniversitesi'nin Biyofizik ve Moleküler Biyoloji Laboratuarı'nda, en başta Matthias Gossman ve Peter Linder olmak üzere tüm laboratuar ekibine benimle her zaman ilgilendikleri ve her türlü yardımda bulundukları için, en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu laboratuar ekibinin bir parçası olabilmek, hayatımda elime geçen en güzel şanslardan biri oldu.

Tezimin hazırlık ve yazım sürecinde benimle fikir paylaşımı yapan, her zaman yanımda olan, bana yardımcı olan tüm arkadaşlarıma, çok teşekkür ederim. Çevremde güzel insanların olması her zaman ne kadar şanslı bir insan olduğumu hissettirir. Arkadaşlarıma, bana bu duyguyu hissetirdikleri ve yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Son olarak da, bugüne kadar her kararımda arkamda olan, maddi ve manevi hiç bir desteği esirgemeyen anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim. Yoluma ışık tutmaktan hiç vazgeçmediler. Sevgilerini, desteklerini, bana olan inançlarını her zaman hissettirdiler. Böyle bir ailem olduğu için çok şanslıyım. Onları çok seviyorum. Yüksek lisans tezimi anneme, babama ve kardeşime armağan ediyorum.

Genç ve yaşlı deri fibroblast hücrelerarası kuvvetlerinin, HP(high throughput) BIOFORCE sistem ile, biyofiziksel ve ultrastrüktürel düzeyde değerlendirilmesi ve CTFG, COL1A1, MMP1, gen ifadelerinin karşılaştırılması

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.
Balçova-İzmir
gozde.dursun@gmail.com

ÖZET

Mekanik tansiyon, hücrelerde gen ifadesi, hücre metabolizması, hücresel tansiyon ve hücreler arasında tansiyon aktarımı gibi, bir çok hücresel süreci etkilemektedir. HP Bioforce sistemi, in vitro hücre kuvvetlerinin ölçümü için geliştirilen yeni bir teknolojidir. Bu sistem silikon ince membran üzerindeki hücre ya da doku tabakalarını mikrometre aralığında indükleyen, küçük miktarlarda kuvvetler oluşturur.

Thrombin, endotelyal hücreler ve stres fiberlerinde hücre tansiyonunu ve endotelyal hücre bariyer geçirgenliğini arttırdığı bilinen, bir enzimdir. Hücresel kuvvetlerin ölçümleri ile ilgili önceki çalışmalarda thrombin, hücre kontraktil tansiyonunu arttırıcı bir faktör olması sebebi ile, bu projede de, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. TGF-β ise doku yenilenmesi ve matriks formasyonundaki önemi sebebiyle, sıklıkla çalışılan bir sitokinindir. TGF-β'nın ayrıca, fibroblast kontraktilitesini arttırdığı bilinen ''α-smooth muscle actin '' (α-SMA) ifadesini de düzenlediği, düşünülmektedir.

Bu çalışmada, HP Bioforce sistemi ile monolayer olarak kültive edilen yaşlı ve genç dermal fibroblastlara thrombin, TGF β ve içeriği bilinmeyen beş farklı substansın uygulanmış, sonrasında monolayer yaşlı ve genç dermal fibroblast hücre grupları hücresel kuvvetler ölçülmüş, verdikleri cevaplar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, genç (18, 29 yaş) ve yaşlı (59, 73 yaş) dermal fibroblast hücre gruplarında ekspresyonu farklı olacağı düşünülen kollagenaz enzimi geni MMP1, kollajen tip 1 alfa proteinini sentezleyen COL1A1, bağ doku faktörü olan CTFG gen ekspresyonları, gerçek zamanlı PCR tekniği ile incelenmiştir.

Sonuçlara göre thrombinin genç hücrelerde hücresel kuvvetleri, TGF beta'nın ise yaşlı hücrelerde hücresel kuvvetleri önemli ölçüde arttırdığı belirlenmistir. Yapılan gen ifadeleri çalışmalarında, ΔΔCt formülü kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda ise, yaşlı hücrelere göre genç hücrelerde MMP1 gen ifadesinin 1,71 kat azaldığı, COL1A1 gen ifadesinin 2,81 kat arttığı ve CTFG gen ifadesinin 1,53 oranında azaldığı gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Hücresel kuvvetler, doku yaşlanması, gen ifadesi

Biophysical and ultrastructural evaluation of cellular forces between young and old dermal fibroblasts using HP (high throughput) BIOFORCE system and the comparision of gene expression of CTFG, COL1A1, MMP1

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.
Balçova-İzmir
gozde.dursun@gmail.com

ABSTRACT

Mechanical tension impacts a multitude of cellular processes including signal transduction, gene expression, cellular tension and cell tension transmission between cells, and cell metabolism. The HP Bioforce System is an innovative instrument used for measurement of the in vitro cell forces in thin film tissue constructs. This system creates the quantification of small forces and induces thin cell or tissue layers in µm –range.

Thrombin is well-known to increase tension in endothelial cells and stress fibers, and increase endothelial cell barrier permeability. Thrombin is used as a positive control in previous studies since it is a biological factor known to stimulate cell contractile tension. TGF-β is an extensively studied cytokineon, the basis of its importance in wound healing and matrix formation and possibly in regulating a-SMA expression is discussed in literature.

The first aim of this project was to find the differences in cellular forces between human young and old dermal fibroblasts without any application of substances and between human young and old dermal fibroblasts following application of thrombin (1U/mL), TGF beta (20 ng/mL) and five different substances, using HP-Bioforce screening system. The second aim of this project was to find the differences in the expression of MMP1, CTFG and COL1A1 genes which were considered to have different expressions between human dermal fibroblasts derived from young (18,29 years old) and elderly (59, 73 years old) donors, using Real Time PCR analysis system.

Thrombin increased significantly the cell forces in young cells than old cells. On the contrary, TGF beta increases significantly the cell forces in old cells than young cells. The relative gene expressions were calculated by ΔΔCt formula and the results gained from the comparison of the young dermal skin cell lines and the old dermal skin cell lines demonstrated that there has been 1,71 -fold decrease in MMP1, 2,81-fold increase in COL1A1, 1,53-fold decrease in CTFG, 5.80-fold, respectively.

Keywords: Cell forces, skin aging, gene expression

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Fibroblastlar dermiste bulunan ve kollajen üretiminden sorumlu hücrelerdir. Dokunun yeniden modellenmesinde ve yara iyileşme sürecinde önemli görevlere sahiplerdir [1]. Fibroblastların başarılı stimule edilmesiyle daha fazla kollajen üretimi sağlanabilir ve kollajen kalitesinin değiştirilebilir. Kollajen kalitesi değişimi yaşlanan dokuların yeniden gençleştirilmesi çalışmalarında önemlidir. Ayrıca fibroblastlar ECM oluşturan öğelerin hücresel gen ifadelerini de etkileyen hücresel tansiyon sıkıştırılabilirlik gibi mekanik özelliklerden sorumlulardır. Mekanik kuvvetler hücre içindeki proliferasyon, sitoskeleton ekspresyonu, sinyal yolakları ve gen aktivitesi gibi bir çok süreci etkilemektedir [2].

ECM'de yaşlanma ile olan değişiklikler derinin güçlülüğünü ve elastikitesini azaltır. Yaşlanmaya başlayan hücrelerdeki mekanik tansiyon kaybı moleküler değişimlere katkıda bulunur. Örneğin, mekanik tansiyon kaybı yaşlanma sürecinde fibrolastlarda, yeni kollajen sentezini azaltabilmesini etkileyebilir. Yaşlı hücrelerde parçalamış kollajen akümülasyonu ve aynı zamanda sıkı kollajen ve fibroblastlar arasında bağlanma bölgelerinin kaybının sebep olduğu bu mekanik tansiyon azalışı, fibroblastların yıkılmasına sebep olur.

Bu projede, primer insan dermal monolayer hücreleri arasındaki olası hücresel kuvvet farklılıklarının, hem biyomoleküler ve hem de biyofiziksel açıdan karşılaştırılması amaçlanmıştır. Thrombinin, endotel hücrelerde ve stres fiberlerinde tansiyonu arttıran bir faktör olduğu bilinmektedir. Thrombin hücre kontraktil tansiyonunu arttıran bir biyolojik faktör olduğu için, trombin Eylem K.D. ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır [3]. Bu projede thrombinin dermal fibroblastlarda hücresel kuvvetleri arttıran bir faktör olduğu hipotezinden yola çıkılmıştır ve deri yaşlanması ile ilişkili olan kırışmanın ana düzenyicisi kollajenin biyosentezine katkısı olan TGF ß sitokininin de, thrombin gibi hücrelerde mekanik kuvvetleri arttırıcı bir etkisi olduğu hipotezi kurulmuştur.

Hücre kuvvetlerinin ölçülebilmesi için FH Aachen Biyofizik Laboratuarı çalışanlarının geliştirmiş olduğu, HP Bioforce teknolojisi kullanılmıştır. HP Bioforce sistemi CellDrum^{TM} sistemi prensibine dayanmaktadır [4]. CellDrum^{TM} sisteminin

amacı, mekanik stimülasyon vasıtasıyla in vitro çevrelerde doku ilişkili, in vivo reaksiyonların analiz edilmesidir. HP Bioforce sistemi, yüksek verimle ve otomatik olarak hücre kuvvet ölçümlerini gerçekleştiren, CellDrum^{TM} teknolojisinin geliştirilmiş biçimidir. Pasaj numaraları aynı kalmak kaydıyla, iki farklı yaştaki dermal hücre hattının; hücresel kuvvetleri, elastisitesi, saptanarak, iki grup arasındaki farkların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Projenin ikinci aşamasında ise, kollajen üretiminde eksprese olan COL1A1 geni, doku tamirinde etkili olan CTFG geni ve yaşlanma sürecinde kollajenin parçalanmasında ekspresyonu artan MMP1 genlerinin ekspresyonları, gerçek zamanlı PCR tekniği ile incelenmiştir. Genç hücrelerde, COL1A1 ve CTFG geni ifadesinin yaşlılara göre daha fazla olması, MMP1 geni ifadesinin ise genç hücrelerde yaşlı hücrelere göre az olması ön hipotez olarak alınmıştır.

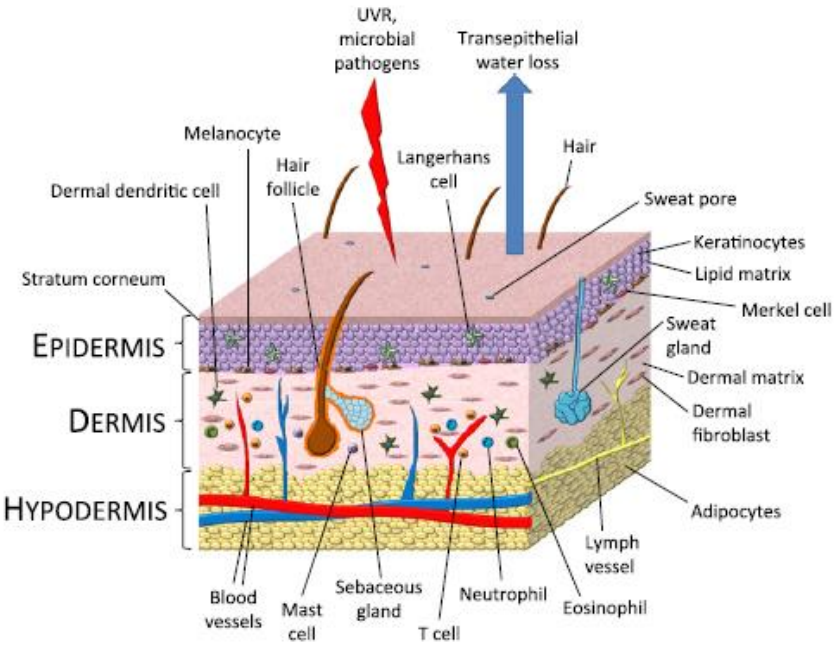
.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Deri Dokusu

Deri, vücut ağırlığının yüzde 16'sını oluşturan, 1.8 m^2 yüzey alanına sahip olan, memelilerdeki en büyük organdır [5] [6]. Vücudun iç çevresini dış çevreden ayıran koruyucu bir bariyer olan deri dokusunun, vücudu, su kaybı, patojen ve mikroorganizmalardan korumak, vücut sıcaklığı ve metabolizmasının düzenlenmesine yardımcı olmak, sahip olduğu melanosit hücreleri sayesinde vücudu UV ışınlarından korumak, vücut için önemli olan D vitamini sentezini gerçekleştirmek gibi, birçok önemli görevi vardır [7] [8].

Deri, epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç tabakadan oluşmuştur. Epidermis tabakası, derinin en üst tabakasıdır. Kalınlığı 0,1 mm- 0,2 mm aralığında ve alt tabakasındaki dermis tabakasına göre daha incedir. Epidermis ve dermis aralarındaki seçici bariyer sayesinde, birbirlerine bağlanırlar. Üçüncü tabaka olan hipodermis, dermisin altında yer almaktadır [7] [8] [9] (Şekil 1).



Şekil 1. Derinin Yapısı [9]

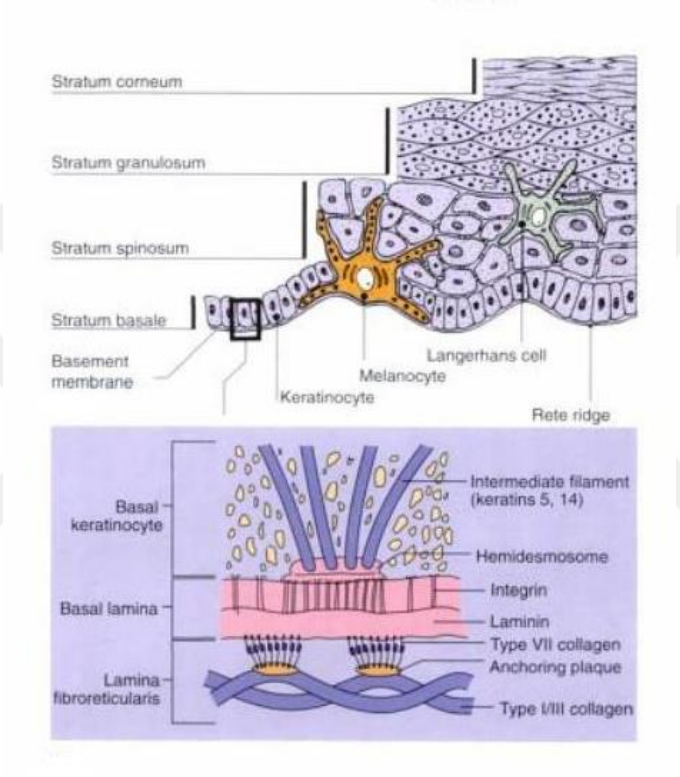
2.1.1 Epidermis

Epidermis, derinin en dıştaki yapısıdır. Derinin en üstteki katmanı olduğu için, görevlerinden biri, mekanik bariyer gibi fonksiyon göstererek mekanik stres, incinme ve yaralanmalarda, vücudu korumaktadır. Buna ek olarak vücudu, su kaybına ve birçok bakteri, virus ve dışarıdan vücuda girebilecek her türlü yabancı cisime karşı koruyucu olarak görev almaktadır [6] [9] [10].

Keratinositler, keratin ve keratoyhalin proteinince zengin, epidermis hücrelerinin, en az yüzde seksenini oluşturan hücrelerdir [5] [11] [12]. Epidermisin en alt tabakasına yerleşmiş olan, uzun ömürlü epidermal kök hücrelerden meydana gelmektedirler [13]. Epidermisin mekanik bariyer olma özelliğine, epidermis içinde keratinositlerin, tabakalı olarak katmanlaşmasının katkısı vardır. En dıştan en içe doğru epidermisin tabakaları; *Stratum Corneum, Stratum Lusidum, Stratum Granulosum, Stratum Spinosum, Stratum Germinativum* (*Stratum basale*) dır. Keratinositler bu tabakalar içinden geçerek büyüme, yüzeye doğru hareket ve farklılaşma, ölüm ve atılma safhalarını gösterirler [11].

Stratum Germinativum (*Stratum basale*), mitotik olarak aktif sütun şeklindeki keratinositleri içermektedir. Bu tabakadaki keratotinositler, K5 ve K14 keratin filamentleri aracılığı ile hemidesmosomlardaki taban alanına, desmosomlar aracılığı ile de, çevredeki diğer hücrelere bağlanırlar. Keratinositler, *stratum basale* üzerindeki *stratum spinosum* tabakasına geçtiğinde farklılaşmaya ve keratin üretimine başlamaktadır [14]. Epidermiste bulunan diğer hücreler olan Langerhans hücreleri de, çoğunlukla bu tabaka içinde yer almaktadır. *Stratum spinosum* tabakasını geçen keratinosit hücreleri, *stratum granulosum* tabakasına geldiklerinde, keratin sentezine devam ederler ve yapısal olarak yassılaşmaya başlarlar [6] [14]. Ayrıca bu tabakada keratinosit hücreleri, tabakada bulunan enzimler yüzünden çekirdek ve bazı organellerini kaybederler. Keratinosit farklılaşması, *stratum corneum* tabakasında sonlanır. Bu tabaka, lipid matrikse gömülü olan ölü, çekirdeksiz ve keratince zengin keratinositler içermektedir. Keratinositlerin bu yapısı, vücudu tehlikeli maddelerden, su kaybından, ayrica derinin diğer tabakalarını da, dış etkenlerden korumaktadır [14].

Epidermisin içerdiği Langerhans hücreleri, vücudun immun sisteminin bir parçasıdır. Bu hücrelerin immun sistemdeki yabancı maddeleri saptama ve enfeksiyona karşı vücudu koruma görevlerinin yanısıra, deri alerjilerinin gelişiminde de önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Epidermisin içerdiği diğer bir hücre çeşidi ise, melanositlerdir. Melanositler, ürettikleri melanin pigmenti ile, güneş ışığından ultraviyole ışınlarını filtre ederler [6].



Şekil 2. Epidermisin Tabakaları [6]

2.1.2 Dermis

Epidermis ve dermis tabakaları birbirlerine, dermo-epitel bağlantı adı verilen, bir yapı ile bağlanırlar. Bu bağlantı, dışsal kayma kuvvelerine karşı direnç sağlamakla görevlidir.

Dermis, insan dokusunun büyük bir kısmını oluşturmakta, toplam vücut ağırlığının %15-20'sine karşılık gelmektedir. Dermis tabakasında kollajen sentezinden sorumlu fibroblastlar başta olmak üzere, elastik fiberler ve glikozaminoglikanlar vardır. Kuru deri ağırlığının yaklaşık %75'ini oluşturan kollajen

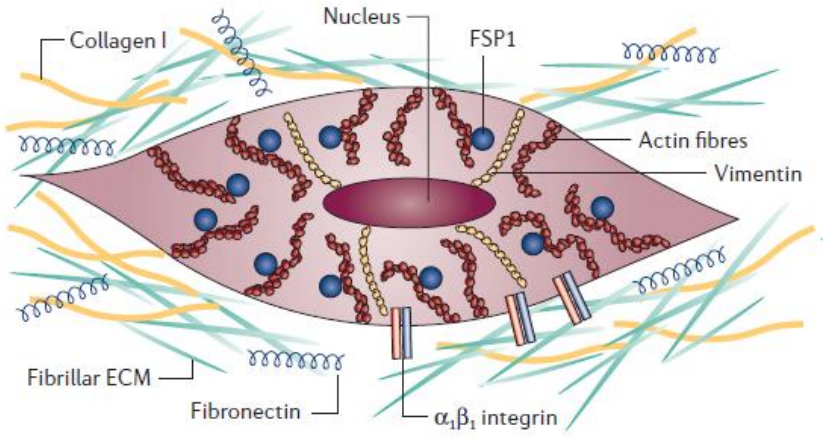
fibriller, deri dokusuna dayanıklılık ve gerilme kuvveti sağlamaktadır. Deri dokusunda, tip I kollajen (%80-90), tip III kollajen (%8-12) ve tip V kollajen (%5' den daha az) bulunmaktadır. Dermal matriks proteinlerinin yaklaşık %4'ünü oluşturan elastik fiberler de, deri dokusuna elastikiyet sağlamaktadır. Dermis tabakası bunların yanında kan damarları, lenf kanalları ile deri sinirleri ve reseptörleri içermektedir [6] [12].

2.1.3 Hipodermis

Deri altı dokusu olarak bilinen hipodermis tabakası, deri dokusunun altındaki bağlayıcı doku ile deri dokusunun birbirine bağlanmasına yardımcı olan, deri dokusunun en alt kısmında bulunan tabakadır. Yağ dokusu hücrelerince zengin olan hipodermis tabakası, altında bulunan yapıları ve organları darbelerden ve ısı değişimlerinden korur [9] [12].

2.2 Dermal Fibroblastlar

Fibroblastlar yüksek oranda tip I kollajen ve fibronektinden oluşan bağlayıcı ekstrasellülar matrikse gömülü olan hücrelerdir. $\alpha_1\beta_1$ gibi integrinler aracılığı ile, mikroçevre ile, bağlantı kurmaktadırlar (Şekil 2) [15].



Şekil 3. Fibroblastın Yapısı [15]

İnsan dermal fibroblastları, dokunun en önemli bileşeni olarak, dermis ekstrasüller matriks (ECM) üretiminden, organizasyonundan ve çözünebilir

mediyatörlerin sentezi ile, epidermis ve dermis arasındaki bağlantıyı desteklemekten sorumludur. Bunlara ek olarak, hücre fizyolojisini düzenleyen bu hücreler, birbirleri arasında da etkileşim halindedirler [12] [16].

Fibroblastlar, kollajen, elastin, proteoglikan, çeşitli büyüme faktörleri (Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β) gibi) ve sitokin (TNF-α gibi) üretiminden ve ekstrasüller matriksi parçalayan (MMP, matriks metalloproteinazlar) enzimlerin, sentezinden sorumludur. Bu yüzden fibroblastlar, dokuların yeniden modellenmesinde, yara iyileşmesi sürecinde önemli rol oynamakla beraber, bağlayıcı doku hastalıklarının patogenezinde de önemli rol oynayan hücrelerdir [17].

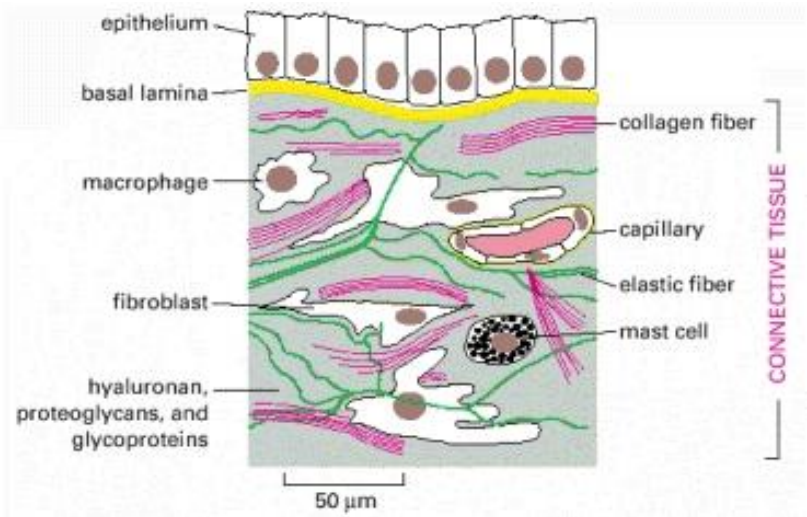
Dermal fibroblastlar, dokunun dermis tabakasına yerleşiktirler. Dermis tabakasında bulunan bu fibroblastlar ayrıca dermisin farklı bölgelerinde de bulunurlar. Dermisin farklı bölgelerine yayılan bu fibroblastların karakteristik özellikleri de, birbirlerinden farklıdır [16] [18]. Ayrıca dermal fibroblastların *in vitro* ortamlardaki karakteristik özellikleri de türe, yaşa, cinsiyete, doku orjininin ya da derinin tipi ve gelişimsel durumuna, kültür içindeki büyüme faktörlerinin uygunluğu ve hücre yoğunluğuna bağlı olarak da, değişim göstermektedir [19].

Fibroblastlar, mekanik güçlere cevap vermekle sorumlu olan temel hücre tipidir. ECM bileşenlerinin hücresel gen ekspresyonlarına da etkisi olan bu mekanik güç, tansiyon ise, sıkıştırma ve kayma kuvvetlerinden sorumludur [17].

2.3 Ekstrasellülar Matriks (ECM)

Hücrelerin, mikroçevresinin temel bileşeni olan ECM, sinyal yolaklarını aktive eden hücre yüzey reseptörlerine ve integrinlere bağlanan, yapısal ve fonksiyonel, çeşitli bileşenlerden oluşmaktadır. Bu bileşenler sayesinde ECM proliferasyon, adezyon ve migrasyon, farklılaşma, apoptoz gibi bir çok temel hücresel olayda görev alır [20] [21]. ECM komponentleri kapsamında, *proteinler, proteoglikanlar* ve *glikozaminoglikanlar (GAG)* sayılabilinir. ECM'de bulunan *kollagen, elastin* gibi dokuya gerilebilir dayanıklılık, viskoelastikiyet ve sıkıştırılabilirlik sağlayan proteinler,

aminoasit fibrillerinden oluşmuştur. ECM'nin diğer proteinleri *fibronektin, laminin ve nidojen* de, matriks ağını oluşturan, bağlayıcı proteinler olarak görevlidirler

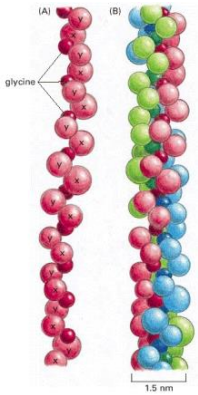


Şekil 4. Ekstrasellülar Matriks (ECM) Bileşenleri [20]

2.3.1 Kollajen

Dermiste en fazla bulunan protein kollajen tip I (80-85 %) ve tip III (8-11%)'tür. Her ikisi de dokuya gerilebilir dayanma gücü veren, mekanik olarak sert fibrillerin uzun kopolimerizasyonundan oluşmuştur [22].

Şekil 4B'de gösterildiği gibi kollajen molekülü uzun, sert, üç kollajen polipeptit zincirinin oluşturduğu helikal yapıdadır. Bu zincirler, 1000 aminoasit uzunluğunda olan, α zincirler olarak adlandırılmaktadır(Şekil 4A). Glisin ve prolin α zincirlerinin temel bileşenidir ve özellikleri sayesinde süper heliks yapısını stabilize ederler [23]



Şekil 5. A) Kollajen molekülü α zincirleri B) Kollajen molekülü [24]

2.3.2 Elastik Fiberler

Deri, kan damarları, akciğerler gibi birçok dokunun özellikleri ve fonksiyonları için, elastikiyet ve dayanıklılık gerekli özelliklerdir. ECM'deki elastik liflerin ağı, onlara gerekli olan direnci sağlamaktadır. Elastik fiberlerin ana komponenti yaklaşık 750 aminoasitten oluşan ve hidrofobik protein olan elastindir. Kollajene benzer şekilde elastin de, glisin ve prolin proteinlerince zengindir [23].

2.3.3 Glikozaminoglikan (GAG)

Glikozaminoglikanlar, tekrarlayan dissakkarit ünitelerinin uzun bir zincirinden oluşan, herhangi bir dallanma göstermeyen polisakkarit zinciridir. Disakkarit ünitesinin iki şekerinden biri, her zaman amino şeker (N-asetilglukozamin ya da N-asetilgalaktozamin) dir. Diğer şeker ise, genelikle glukoronik ya da iduronik asittir [23].

GAG'lar total deri ağırlığının %0,1-%0,3'ünü oluştururlar ve hem epidermis hem de dermiste bulunurlar. Deriye elastisite ve hacim sağlayan su tutma kapasitesine sahiplerdir. Fizikokimyasal özellikleri sayesinde GAGler, deri yenilenmesi ve gelişmesinde önemli bir role sahiplerdir [25].

2.4 Hücre İskeleti

Hücrenin şekli ve sitoplazmanın genel organizasyonunu belirleyerek, hücrenin yapısal çatısını oluşturan yapı, hücre iskeleti olarak tanımlanmaktadır. Hücreler, hücre göçü ve hücrelerin adhezyonu sırasında hücre iskeleti boyunca oluşan ve çevrelerindeki matrise yayılan, hücresel kuvvetler üretirler. Oluşturulan bu hücresel kuvvetler, hücre davranışlarını, hücresel sinyal yolaklarının düzenleyerek ile etkilerler. Oluşan sinyaller de, hücresel bir cevap olarak sonuçlanarak; gen ekspresyonun değişmesine neden olur, hücre iskeleti ve ekstrasellülar matris yapısının düzenlenmesi gibi olaylar için de üretilmeye devam ederler [26] [27] [28].

Hücre iskeleti aktin filamanları, ara filamanlar ve mikrotübüller olmak üzere üç temel, protein filaman tipinden oluşmaktadır. Bu üç protein filamanı bir arada

bulunurlar ve birçok aksesuar protein aracılığı ile hücre içi organeller ve plazma zarı ile bağlantılı kurarlar [24].

2.4.1 Aktin Filamanları

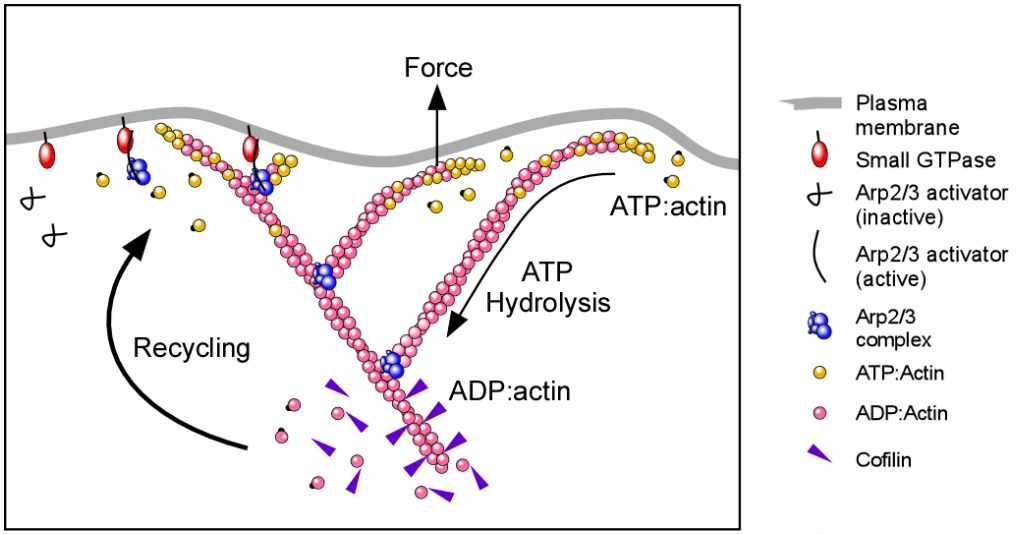
Aktin molekülü, ökaryot hücrelerde en yüksek oranda bulunan ve türler arasında korunmuş bir proteindir. Aktin molekülleri 375 aminoasitlik globüler bir proteindir. Her aktin monomeri, globüler G aktin olarak adlandırılır ve iki aktin monomeri arasında baş kuyruk etkileşimlerini düzenleyen, sıkı bağlantı bölgeleri oluşturur. Böylece aktin monomerleri filamanlar şeklinde polimerize olarak, filamentöz F aktin olarak adlandırılırlar [24].

Aktin polimerleşmesinde, aktin monomerleri aynı yönde eklendikleri için, aktin filamanlarının iki ucu birbirinden farklı yüktedir. Bunlar artı ve eksi uç olarak, adlandırılırlar. Polimerizasyon ise, üç aktin monomerinin birikimi ile başlamaktadır. Monomerler her iki uçtan ters olarak eklendiklerinde, aktin filamanları uzamaya başlar. Fakat artı uç, eksi uca göre, beş ila on kez daha hızlı uzar. ATP bağlı durumdaki aktin molekülü hızla polimerize olan artı uca bağlanır ve aktine bağlı ATP hidrolize olarak ADP'e dönüşür. ADP`e bağlı aktin, ATP`e bağlı aktine göre filamanlardan daha kolay ayrıştığı için, aktin monomerinin kritik konsantrasyonu, eksi uca eklenme bakımından, artı uca göre daha yüksektir. Aradaki bu konsantrasyon farkı, yürüme (treadmilling) adı verilen bir olay ile sonuçlanır ve ADP'ye bağlı formdaki monomerlerin eksi uçtan net ayrışması ile gerçekleşir. Bu durum ATP'ye bağlı formdaki monomerlerin, artı uca eklenmesi ile dengelenir [24].

Aktin polimerizasyonunun protrusiv kuvvetler ürettiği, 1980'li yıllarda konuşulmaya basamasina rağmen, deneysel olarak, 1999 yılında Miyata ve grubunun yaptığı deneylerle onaylanmıştır (Lit.). Bu kuvvet üretiminin mekanizması hala tartışmalıdır ve çeşitli bilim adamları tarafından mekanizmayı anlamak için, farklı modeller önerilmektedir [29].

Aktin proteini, hücre formu, hücre hareketi ve mekanik düzeyde hassaslık için gerekli olan dinamik hücre iskeletinin şekillenmesinde, büyük rol oynamaktadır.

.



Şekil 6. Aktin Polimerizasyonu [30]

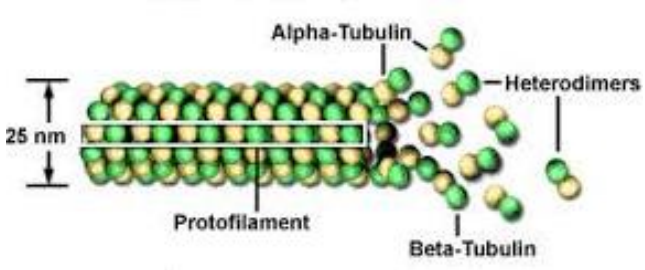
Aktin sitoskeleti, ekstrasellülar matriks veya diğer hücrelere, fiziksel olarak fokal adezyon olarak bilinen multiprotein kompleksleri ile bağlanırlar. İntegrin gibi yüzey molekülleri ile de, aktin sitoskeleti arasındaki bağlantılar iki yönlüdür ve aralarındaki bağlantıyı oluşturan, fokal adezyon kompleksidir. Aktin filamentleri ve aktin filamentleri ile ilişkili fokal adezyon kompleksleri, bilgi kullanma makinaları veya mekanosensörler olarak görev görürler. Bunlar, adezyon kuvvetlerini ve aktin filamentleri ağıyla bağlantılı olan gerilim kuvvetlerini, aktin uzamasını, hücre migrasyonunu etkilerler. Bu kontrolü de biyokimyasal sinyaller oluşturarak sağlarlar. Fokal adhezyonlar bu şekilde, devamlı olarak çekme kuvvetlerine ve eksternal gerilim yüzünden oluşan kuvvet farklılıklarına, maruz kalırlar [31].

2.4.2 Mikrotübüller

Mikrotübüller, 25 nm çapında sert, içi boş çubuklar şeklinde, aktin filamanları gibi hücre içinde devamlı olarak yapılanıp, ayrışabilen dinamik yapılardır. Hücre şeklinin belirlenmesinde, hücre yer değiştirmesnin bazı tiplerinde, organellerin hücre içindeki taşınması ve mitoz sırasında kromozomların ayrılmasını da içeren, çok çeşitli hücre hareketlerinde görev yaparlar [24].

Mikrotübüllerin monomerleri, tübülin denilen globüler bir proteindir. Tübülin, birbiri ile çok benzer 55 kd luk α tübülin ve β tübülin polipeptidinden oluşan bir

dimerdir. Bunlara ek olarak üçüncü bir tübülin olan γ tübülin, özellikli olarak sentrozomda yer alır ve mikrotübül yapılanmasında, kritik rol oynar [24].



Şekil 7. Mikrotübüllerin ikincil yapısı [24]

Mikrotübüllerin de, aktinler gibi hücresel kuvvetlere etkisi vardır ve mikrotübül dinamiği; hücre migrasyonunun koordinasyonununda gereklidir. Mikrotübül polimerizasyonu; hücrelerin çekme ve germesiyle stimule edilir. Mikrotübüllerin yıkılma veya polimerizasyonu; sıvı dinamiklerinin indüklediği morfolojik değişikleri; engeller. [32]

2.4.3 Ara Filamanlar

Sitoskeletal fiberlerin üçüncü bileşeni olan ara filamanlar; epidermal hücrelerde ve nöronların aksonlarında miktofilamentlere ve mikrotübüllere gore on kat daha fazla bulunmaktadır [33].

Ara filamanların organizasyonları ve plazma membranlarıyla ilişkileri; bu filamanların esas fonksiyonunun yapısal olduğunu düşündürmektedir. Ara filamanlar, hücreleri güçlendirirler ve dokuların içine doğru, hücrelerin düzenlenmesini sağlarlar. Ara filamanların en önemli görevleri, ekstrasellülar matriks aracılığı ile hücrelerin birbiri ile kontakt kurduğu plazma membranı bölgesine, mekanik destek sağlamaktır. Mikrofilamentlerin ve mikrotübüllerin aksine ara filamanlar ise, hücre hareketinde görev almazlar. Ara filamentlere bağlı hücre hareketi veya ara filamanlar üzerinde hareket eden motor proteinleri ile ilgili bilinen bir örnek yoktur [33].

2.5 Hücresel Bağlantılar

Monaleyer ve üç boyutlu hücrelerin mekanik özelliklerini anlamak amacıyla yapılan çalışmalarda hücresel bağlantılar büyük bir önem taşımaktadır [13].

2.5.1 İntegrinler

İntegrinler, α ve β olarak adlandırılan transmembran polipeptid zincirlerden oluşan ve hücrelerin hücre dışı matrikse tutunmalarını sağlayan, başlıca hücre yüzey reseptörleridir. α ve β zincirlerin bileşimi, ekstrasellülar bileşenlere karşı özgüllüğü belirlemektedir. İntegrinler, kollajen, fibronektin ve laminin gibi hücre dışı matrisin bir çok bileşenin de bulunan, kısa aminoasit dizilerine bağlanırlar [24] [34].

Hücreleri, hücre dışı matrise bağlamalarının yanında integrinler, hücre iskeleti için, çapa görevi yaparlar. Böylece, hücre iskeletini hücre dışı matrise bağlayarak, hücre matris bağlantılarından da sorumlu olurlar. Fokal adezyonlar ve hemidesmozomlar, integrinlerin yer aldığı, hücre hücre dışı matris bağlantılardır [24].

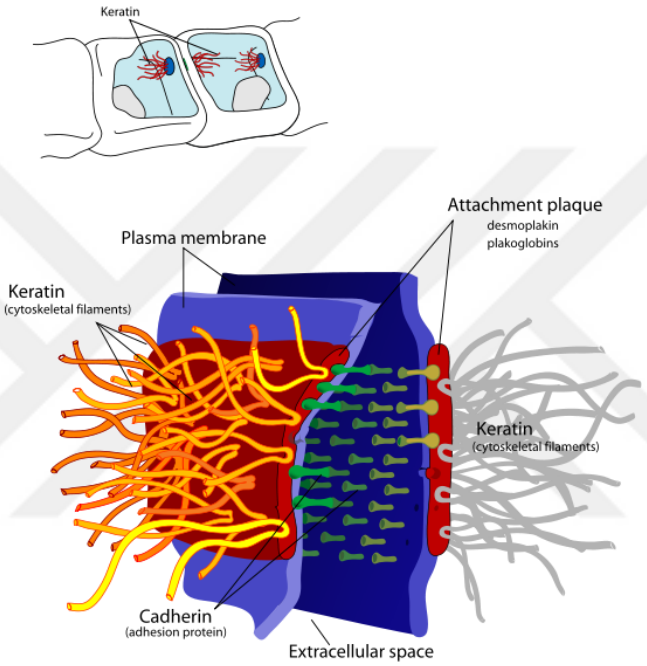
2.5.2 Kaderinler

Kaderinler, dokuları oluşturan hücreler arasında kalıcı bağlantıların oluşumundan sorumlu, moleküler ağırlıkları 120,000-140,000 arasında değişen, yapı ve fonksiyonları açısından Ca^{+2}'a bağımlı transmembran proteinlerdir [35]. Bitişik hücrelerin, hücre iskeletlerinin dahil olduğu kararlı adezyon bağlantıları, kaderinler ile gerçekleşmektedir. Bu hücre bağlantıları, iki tipte gözlenmektedir; Aderens bağlantılar ve desmozomlar. Kaderinlerin bu rolleri, integrinlerin hücrelerle hücre dışı matris arasındaki kararlı bağlantılar oluşturmasına, benzemektedir [24].

2.5.3 Aterens Bağlantılar ve Desmozomlar

Aterans bağlantılarda hücre etkileşimleri kaderinler aracılığı ile gerçekleştirilir. Kaderinlerde aktin demetlerinin bağlanma bölgeleri vardır. Epitelyal hücre tabakalarında, bu bağlantılar her bir hücre çevresinde sürekli bir aktin filaman kemeri oluşturur [24].

Desmozomlar, komşu hücreler arasındaki bağlantılardır ve bu hücre, hücre bağlantıları, kaderinler ile ilişkili transmembran proteinler aracılığı ile düzenlenir. Desmozomlar, sitoplazmadaki bölümleri ile, keratin filamanlarının da tutunduğu tipik bir hücre içi, protein plağı ile bağlantılıdır. Desmozomların her iki ucuna tutunan keratin filamanlarının, epitel hücre tabakasındaki komşu hücreler arasında bir mekanik bağlantı oluşturması, böylece tüm dokunun mekanik kararlılığının sağlanması önemlidir [24].



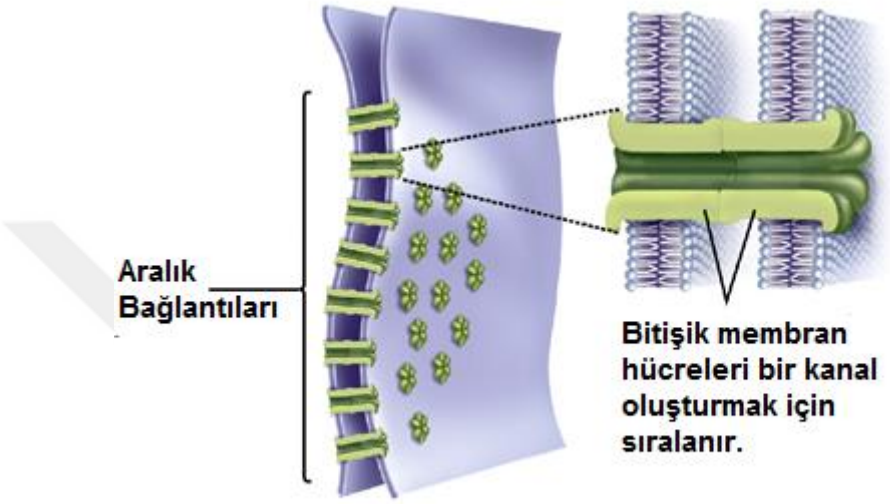
Şekil 8. Desmozomlar [4]

2.5.4 Aralık (gap) Bağlantıları

Aralık bağlantılar, hayvan dokularının çoğunda bulunan, bitişik hücrelerin sitoplazmaları arasındaki, doğrudan bağlantılardır. İyonların ve küçük moleküllerin komşu hücreler arasında serbestçe geçmesine olanak veren, ancak proteinlerin ve nükleik asitlerin geçişini engelleyen, plazma zarlarını kat eden, açık kanallar oluştururlar. Yani bu bağlantılar, birleştirdikleri hücrelerin hem metabolik aktivitelerini, hem de elektrik yanıtlarını eşlerler.

Sıkı bağlantılar, en az 13 farklı insan proteinini kapsayan, konneksin ailesinden, transmembran proteinlerle yapılmıştır. Altı konneksin molekülü, merkezinde sulu,

açık bir geçit bulunan bir silindir oluşturur. Bir hücrenin plazma zarındaki böyle bir konneksin grubu, bitişik hücrenin konneksinleri ile aynı hizaya gelerek, iki sitoplazma arasında, açık bir kanal oluşturur. Birçok hücre, konneksin ailesinin birden fazla üyesini ifade eder ve böylece farklı konneksin proteinlerinin birleşimleri ile, çeşitli nitelikte aralık bağlantıları ortaya çıkarabilir [24].

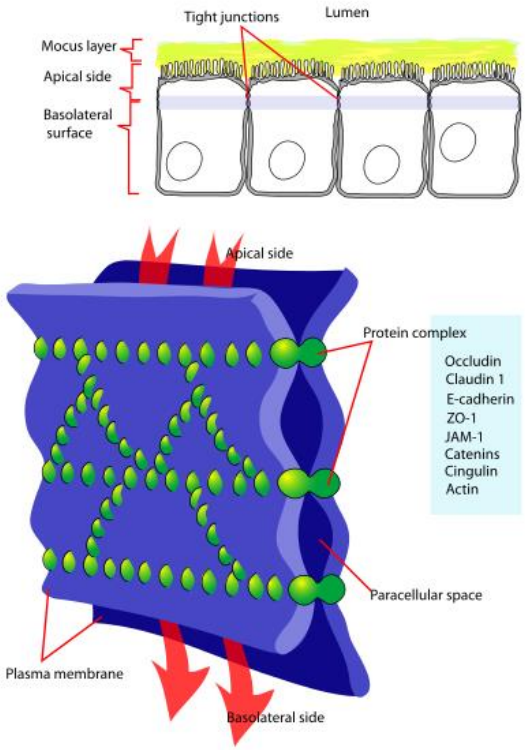


Şekil 9. Aralık (gap) Bağlantılar [4]

2.5.5 Sıkı Bağlantılar

Sıkı bağlantılar genellikle, aterans bağlantılar ve desmozomlar olarak, bağlantı bileşenlerini oluşturur ve epitel hücre tabakalarının sıvı bölmeleri arasındaki engelleyici görevi üstlenirler. Sıkı bağlantılar, epitellerin bu gibi engelleme işlevlerini yerine getirmesini sağlayan, iki rol oynar. Epitel tabakasının hücreleri arasından moleküllerin (iyonlar dahil) serbestçe geçmesini engelleyen contalar oluşturur ve hücrelerin aralarında lipidlerin ve zar proteinlerinin serbest difüzyonunu engelleyerek, plazma zarlarının apikal ve bazolateral bölümlerini ayırır.

Sıkı bağlantılar, bitişik hücreler arasında bilinen en yakın temastır. Hücrenin tüm çevresini dolanan, bir protein iplikleri ağından oluştuğu görülür [24].



Şekil 10. Sıkı Bağlantılar [4]

2.6 Deri Yaşlanması

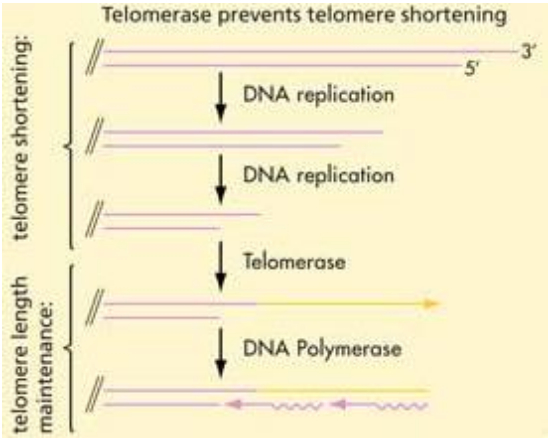
Yaşlanmaya bağlı deri değişikliklerinden, intrensek (genetik) ve ekstrensek (çevresel) olmak üzere, derinin fiziksel fonksiyonunu ve yapısal bütünlüğünün sürekli olarak azalmasını indükleyen, iki ayrı süreç sorumludur [36] [37]. İntrensek yaşlanma bireyden bireye farklı olan genetik faktörlerden, hormonal değişikliklerden ve metabolik süreçlerden etkilenmektedir. Yaşlanmanın doğal formu olan intrensek yaşlanma, kaçınılmaz bir süreçtir. Bunun aksine, ekstrensek yaşlanma sigara kullanımı, fazla alkol tüketimi, yetersiz beslenme, çevre kirliliği ve UV radyasyonuna maruz kalma gibi, dışsal faktörlerden kaynaklanmaktadır [13] [38]. Yaşlanmanın iki türü de, immun sistem fonksiyonları, yara iyileşmesi, vasküler reaktivite, bariyer fonksiyonu, vitamin D üretimi gibi birçok metabolik aktivenin azalması ile sonuçlanmaktadır. Deri uyum ve direncinin kaybolmasını, kırışıklık oluşumunu da indüklemektedir [22].

2.6.1 İntrensek Yaşlanma

İntrensek yaşlanma, zamana bağlıdır. Bu yaşlanma çeşidinin nedenleri telomerazların kısalması, mitokondriyal deoksiribonükleik asit (mDNA) hasarları, oksidatif stres, genetik mutasyonlar ve hormon seviyelerindeki azalmalardır [39].

İntrensek yaşlanma sürecinde, telomerazların büyük önemi vardır. Ökaryotik kromozomların uçlarında bulunan özelleşmiş yapılar olan telomerazlar, tekrarlayan kısa DNA dizilerinden (TTAGGG) oluşmuşlardır. Bu DNA dizisi, herhangi bir gen ürünü değildir. Telomerazlar kromozom uçlarını, degredasyon, yıkım gibi anormal durumlara karşı korur. Telomerlerin olmaması halinde kromozomlar füzyona uğrayabilir ve genetic instabilite oluşabilir [40] [41] [42]. Telomeraz enzimi ise, telomerlerin devamlılığından sorumlu olan enzimdir [37].

DNA polimerazın, ‘’son replikasyon problemi‘’ ve telomeraz ekspresyonunun baskılanması ile, yaşlanma sürecinde, periferal kan hücreleri, dermal fibroblastlar, mukozal keratinositler gibi birçok doku hücrelerinde telomer uzunluğu, azalmaktadir. Bu durumda, hücre döngüsü sırasının S safhası sırasında DNA polimeraz, yeni sentezlenen DNA ipliğinin 5 ucunu tam olarak replike edemez. Bu durumda, yaş arttıkça yani mitoz bölünme sayısı arttıkça, telomer kısalığı sorunu da ciddi bir şekilde artar. Böylece telomerazlar, kromozom ucundaki “capping” özelliklerini kaybederler ve bu durum 3' kolunda oluşan T-loop yapısının, yıkılmasını indükler. Bu süreç yüzünden apoptoz, hücre ölümü ya da hücre döngüsünün bloklanması gibi mekanizmalar indüklenir [43] [39]



Şekil 11. Telomer Kısalması ve Telomeraz Aktivitesi

İntrensek yaşlanma sebeplerinden digeri ise, oksidatif strestir. Reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) ve reaktif nitrojen ürünleri (RNÜ), mitokondrilerde üretilirler. Bu oksidan maddeler, hücrelerde oksidatif hasara neden olur. Yaşlanma ile birlikte üretilen oksidan maddelerin miktarı artar ve oluşturacakları hasarı engellemeye çalışan antioksidan sistemler, yetersiz kalır. Yaşlılık sürecinde hem faydalı hem de zararlı etkileri olan oksidan madde düzenlenmesinin bozuldugu düşünülmektedir. Yaşlanma ile ilişkili oksidatif streste en kritik hedeflerden biri, DNA'dır. Bir taraftan DNA bazları reaktif oksijen ürünü (ROÜ) tarafından modifiye edilirken, diğer taraftan DNA tamir enzimleri, bu lezyonları tamir etmeye çalışırlar; Ancak tamir edilemeyen lezyonlar, yaşla birlikte birikirler. Yaşlanma ile birlikte mitokondriyal DNA'da (mtDNA) görülen oksidasyon, nükleer DNA'dakine göre, çok daha ön plandadır. Bunun ana nedenleri mtDNA'nın nükleer DNA gibi histonlar tarafından korunmaması ve oksidan maddelerin temel üretim yerinin mitokondri olmasıdır. Bu durum, mtDNA'da mutasyonların, daha sık oluşmasına yol açar. mtDNA solunum zincirinin proteinlerini kodladığından, mtDNA mutasyonu sonucunda elektron transferinde azalmakta ROÜ üretimi artmakta, böylece kısır bir döngü oluşmaktadir [44].

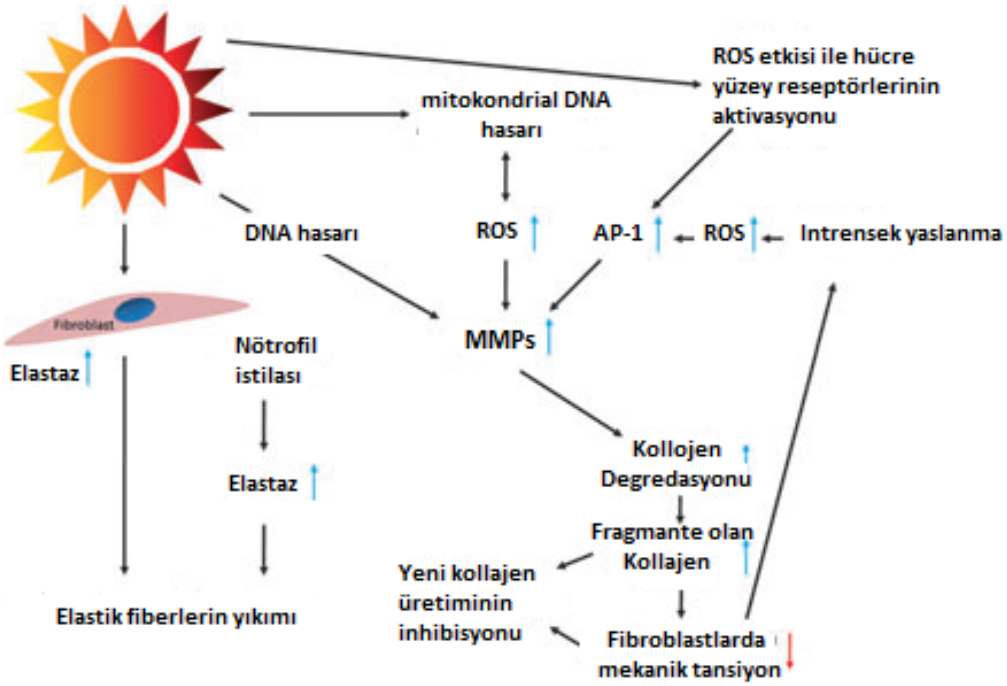
2.6.2 Ekstrensek Yaşlanma

Ekstrensek yaşlanma, çeşitli fiziksel ve psikolojik stress, alkol alımı, yetersiz beslenme, çevresel kirlilik, ultraviyole (UV) radyasyonuna maruz kalmak gibi, çeşitli faktörlere bağlıdır. Etkenlerin çeşitliliğine rağmen, ekstrensek yaşlanmanın temel sebebi olarak, ultraviyole ışınlarına maruz kalmak görülmektedir. UV ışınları, UVB (290–320 nm), UVA (320–400 nm) ve UVC (100–290 nm) olmak üzere, üç gruba ayrılmıştır. Ozon tabakası, UVC'nin deri üzerine olan etkisini, büyük oranda bloklamaktadır [45]. UVB, epidermisin içine penetre olarak keratinositler ve melanositlerde bulunan DNA hasarını, çözünebilir epidermal faktörlerin, UV'e maruz kalma sonrası dermiste bulunan proteolitik enzimlerin, üretimini arttırmaktadır. Bunlara ek olarak UVB, '' UV fingerprints '' olarak adlandırılan pirimidin dimerlerinin oluşumuna sebep olmaktadır. UVB'e maruz kalma sonrasında iki timinin arasında güçlü, yaşlanma ile kolayca çözülmeyen kovalent bağlar oluşur. Bu dimer yapısı yüzünden keratinosit ve melanositlerde, DNA mutasyonu birikimi gerçekleşir. UVA'nın penetrasyonu UVB'e gore daha derin olduğu için, UVA hem epidermis hem

de dermise zarar vermektedir. UVA'nın, "photoaging" (erken yaşlanma) sürecinde önemli bir rolü vardır [37].

Matrix metalloproteinazlar (MMP), dokunun yeniden modellenmesinde ve kollajen, elastin, jelatin, matriks glikoproteinleri ve protoglikan içeren ECM`nin degredasyonunda rol oynayan, çinko ve kalsiyum bağımlı endopeptidazlardır. Sınırlı sayıda MMP, tip 1 kollajenin degredasyonunu başlatmaktan sorumludur. Bunlar MMP-1, MMP-8, MMP-13, MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15) and MT3-MMP (MMP 16) dir. Her bir MMP, farklı dermal matriks proteinini degrede etmektedir. Örneğin MMP-1 kollajen tip I, II ve III'ü parçalamaktadır. Bu yüzden ECM degredasyonunda, MMP 1 çok önemlidir [39] [37].

UV ışınları ile indüklenen oksidatif stres, çeşitli hücre yüzey reseptörlerinin aktivasyonu ile sinyal kaskadını başlatmaktadır. Bu da, ECM'nin yıkılımı ve yeni kollajen oluşumu mekanizmasının düzenlenmesinin, azalmasına sebep olmaktadır. Reseptörlerin aktivasyonu MAP kinaz p38, JNK (c-Jun aminoterminal kinaz), ERK (ekstrasellülar sinyal düzenleyici kinaz) uyarılmasına ve transkripsiyon faktörü olan AP-1'in indüklenmesini etkilemektedir. AP-1'in indüklenmesi de MMP-1, MMP-3, MMP-9 düzenlenmesinin artması ile, kollajen degredasyonunu başlatmaktadır (Şekil 12). Buna ek olarak prokollogen sentezi ve kollajen üretimini arttıran sitokin olan TGF-ß etkisi de, AP-1 'in artan transkripsiyonu ile inhibe olmaktadır. Sonuç olarak, dokudaki MMPlerin üretimi, UV radyasyonu ile artar ve bu yüzden "photoaged" doku, MMP tarafından oluşturulan kollojenöz matriks fragmentleri ile tanımlanır. Yapılan çalışmalar sonucundaki bulgular, yaşlanan insan dokusundaki birikmiş kollajen hasarının ana sebebinin, MMP-1 fonksiyonu olduğunu önermektedir. MMP-1, MMP-3 ve MMP-9 ekspresyonu, hem epidermiste bulunan keratinositlerde, hem de fibroblastlarda gerçekleşmektedir. In vivo çalışmalar sonucunda UV'e maruz kalan dokudaki MMP'ler, ilk olarak epidermal keratinositlerden kaynaklanmaktadır ve MMP'ler epidermisten dermise difüze olarak, direk ECM'ye bağlanmaktadır [39] [45].

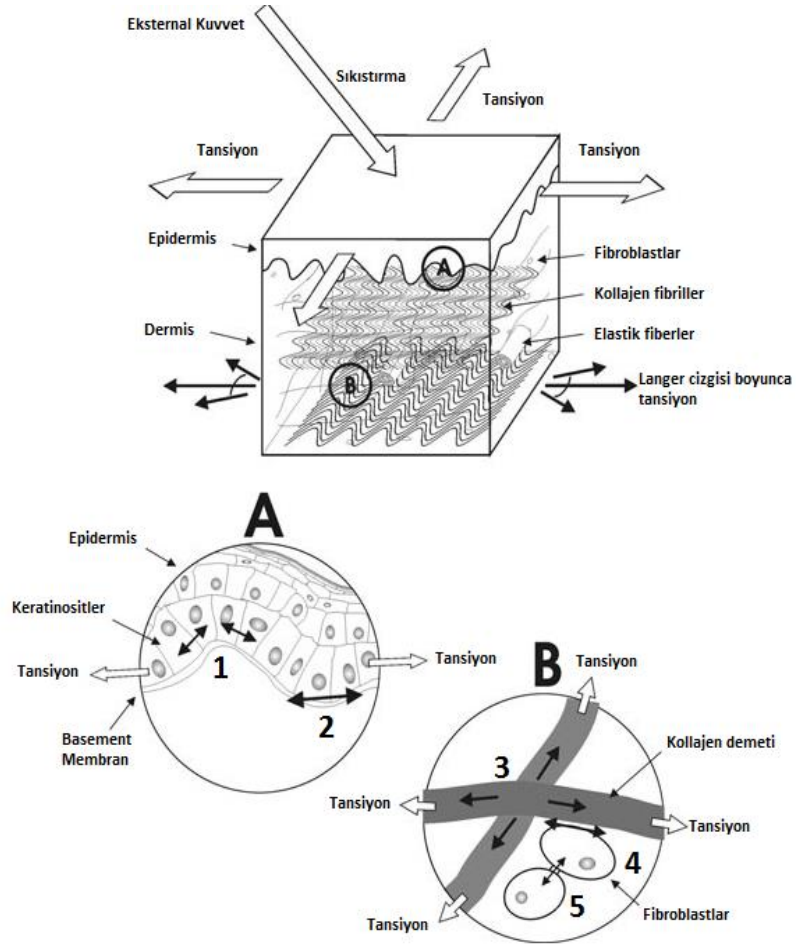


Şekil 12. Yaşlanmanın Moleküler Şeması [39]

2.7 Dermal Dokuda Mekanik Kuvvetler ve Tansiyon

Yara iyileşmesi, düzgün doku biçiminin korunması ve fizyolojik organ fonksiyonlarının yürütülmesi amacı ile hücreler, ekstrasellülar matriks ile biçimlendirilen adhesiv bağlantılara karşı, çeşitli kuvvetler üretirler. Bu bağlantılar, ECM ile beraber, hücre adhezyonu ve hücre ayrılmasında, birçok intrasellülar sinyal yolağını aktive ederler. ECM'nin biyokimyasal kompozisyonunun sinyal yolaklarını etkilemesi genel olarak kabul edilse de, son çalışmalar, hücrelerin de ECM'nin mekanik direngenliğine tepki verdiğini göstermiştir [46].

Hücre içindeki proliferasyon, sitoskeleton ekspresyonu ve gen aktivitesi gibi bir çok süreç, mekanik güçlerden etkilenmektedir [47]. İnternal kuvvetler dermisten epidermise doğru aktarılırken, eksternal kuvvetler epidermisten dermise ve altındaki subkütan doku boyunca aktarılırlar. Deri dokusundaki internal kuvvetler, dermiste bulunan kollajen fibrillerde Langer çizgisinde yönlenmiş olan, pasif gerilme olarak oluşurlar ve aktif sitoskeleton gerilmesi tarafından çoğaltılırlar. Aktif hücresel gerilme ekstrasellülar matriksde bulunan kollajen fibrillerinin fibroblastlarının kasılması ile oluşur ve bu gerilme da dermisdeki pasif gerilme gibi Langer çizgisinde yönlenmiştir (bkz Şekil 13) [48]

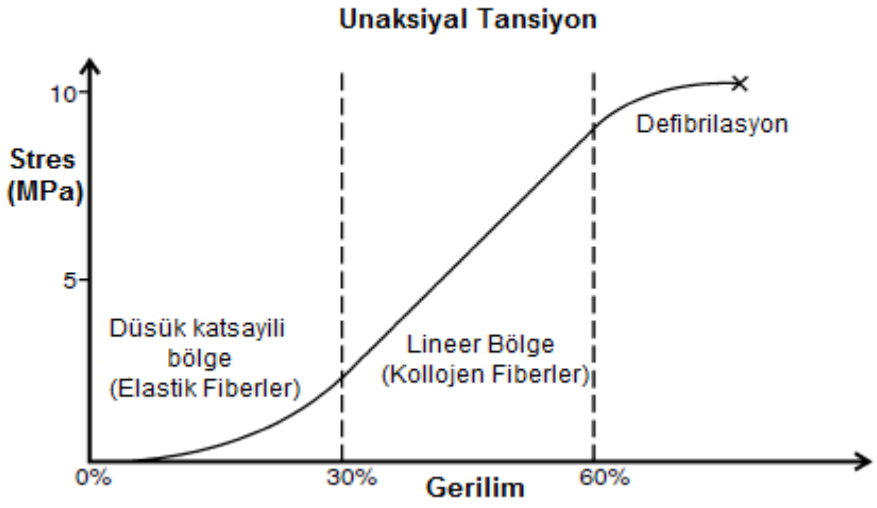


Şekil 13. Dokuya etki eden mekanik kuvvetler ve tansiyon [48]

Eksternal kuvvetlerin yokluğunda, dermisteki kollajen fibrillere etki eden internal gerilme, keratinosit-keratinosit hücresel bağlantılarının oluşması için, gerilmeye sebep olurlar. Deri dokusu üzerindeki hava ile etkileşimde olan epidermis yüzeyine eksternal kuvvelerin uygulanması, keratinosit-keratinosit hücre bağlantılarındaki gerilmenin arttırmasının yanı sıra, dermisteki stresi değiştirmektedir. Eksternal kuvvetlerin epidermisten dermise aktarılmaları, epidermisteki keratinosit-keratinosit etkileşimleri, dermal epidermal bağlantı bölgesindeki keratinosit ECM etkileşimleri, dermisteki makromolekül-makromolekül, makromolekül-fibroblast, fibroblast-fibroblast etkileşimlerinin dahil olduğu mekanizmalar ile meydana gelmektedir (Şekil 13) [48].

Dokunun mekanik davranışları, dermisteki elastik ve kollajen fiberlerin pasif davranışlarını ifade etmektedir. Kollajen fiberler, dokudaki mekanik hataları prematür olarak engellemesine rağmen, elastik fiberler dokudaki kollajen ağının iyileştirilmesine çok düşük oranda, katkı sağlamaktadır. Dokunun mekanik davranışları, yaşa, kollajen fibrillerinin çapraz bağlanma derecesine, elastik fiber ağının yıkılmasına ve proteoglikanlardaki yaşa bağlı değişiklerin etkilerine bağlıdır [48].

Dokunun pasif, unaksiyal (tek eksenli) tansiyon stres-gerilim davranışı, üç fazdan oluşmaktadır. Yüzde otuzun üzerindeki gerilimde, kollajen ağı deformasyona karşı çok az bir direnç göstermektedir ve durum elastik fiberler tarafından yönetilir. Yüzde otuz ve yüzde altmış arasındaki gerilimde, kolajen fibriller deformasyona karşı direnç göstermeye başlarlar. Stres gerilim eğrisindeki bu linear kısımda deformasyona direnç gösteren, kollajen fibrillerdir. Gerilimin yüzde altmışdan fazla olduğu bölgede ise, fibril uzaması ve kayması ile oluşan defibrilizasyon söz konusudur [48].



Şekil 14. Dokunun stres gerilim eğrisinde kollajen davranışı [48]

2.7.1 Fibroblastlar ve Hücresel Kuvvetler

Fibroblastlar, ECM komponentlerinin hücresel gen ekspresyonlarını da etkileyen, hücresel tansiyon, sıkıştırılabilirlik gibi mekanik özelliklerden sorumludur [49]. Fiziksel koşulların değişikliği ile dermal fibroblastlar, çevreden gelen eksternal mekanik kuvvetlere maruz kalmaktadır. Özellikle deri dokusundaki fibroblastlar, ligamentler ve tendonlar, yaklaşık %4-10 gerilimle karşılaşırlar. Tansiyona maruz kalmış hücreler, ECM üretiminin düzenlenmesi ile, doku homeostazının kontrolü prosesine, aktif olarak katılırlar.

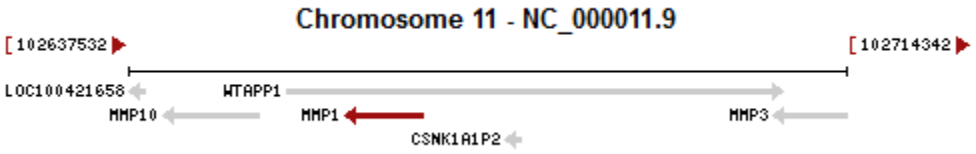
Mekanik tansiyon kaybı, yaşlanma görülen hücrelerde tespit edilebilir ve bu durum, moleküler değişiklikler olmasına katkıda bulunmaktadır. Fibroblastlardaki mekanik sitümülasyonun redüklenmesi, fibroblastların hücresel yaşlanma sürecinden öte, yeni kollajen üretimindeki azalma olarak da tanımlanabilir. Yaşlanan dokuda, fragmente olan kollajenin akümülasyonunun sebep olduğu mekanik tansiyon kaybı ve aynı zamanda kolajen ve fibroblastlar arasında bağlanma bölgesinde kayıp yüzünden, fibroblastlar çökmeye başlarlar. Bu süreçde MMPlerin, intrasellülar oksidatif seviyesi, protein oksidasyonu, transkripsiyon faktörü artışı ve kollajen üretiminin artışı rol oynamaktadir. Elastik fiberlerin degredasyonu ise, doku yaşlanma süreci ve özellikle kırışıklık oluşumu ile ilgilidir. Hayvanlarla yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular, tekrarlayan UVB maruziyetinin doku elastikisitesinin kaybı sonunda, kırışıklık oluşumunun sebebi olabilecegini önermiştir. Fibroblast elastaz ekspresyonu, keratinositlerdeki UVB ile indüklenen, sitokin üretimi ile stimüle edilir. Fibroblastlardaki elastaz aktivitesi artışı ise, elastik fiberlere zarar vererek kırışıklık oluşumunu kolaylaştırır [39].

Fiziksel değişimler hem de deri iyileşmesi, hipertropik yaraların geliştirilmesi ve fibrogenesis gibi patolojik olaylar boyunca, mekanik güç dengesi değişmektedir. Mekanik güç dengesindeki değişimler, fibroblastları etkilemektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonunda, mekanik stimülasyona bağlı olan fibroblast gen ekspresyonundaki değişiklikleri ve moleküler tepkiler tam olarak çözümlenememiş durumdadır [50].

2.8 Dermal Yaşlanmanın MMP1, CTFG ve COL1A1 Genleri ile İlişkisi

2.8.1 MMP 1 Gen Yapısı İşlevi ve Kromozom Yerleşimi

Matriks metalloproteinaz (MMP) ailesi proteinleri embriyonik gelişim, reprodüksiyon, doku yenilenmesi, arterit ve metastaz gibi hastalık süreçlerinde ekstrasellülar matriksin yıkılmasından sorumludurlar. MMP proteinlerinin büyük bir çoğunluğu, inaktif proteinler olarak sentezlenerek ekstrasellülar proteinazlar tarafından aktive edilirler. MMP1 geninin kodladığı enzim, dokular arasında bulunan tip I, II, ve III kolajenlerini parçalar. Bu gen, insanda MMP gen takımının 11. Kromozomun, q22.3 lokusuna lokalize olan parçasıdır. Alternatif splicing (kesim) birçok transkript varyantlarının oluşmasına sebep olur [51].

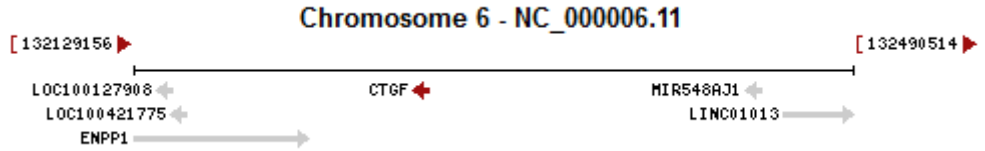


Şekil 15. MMP 1'in Kromozom 11 üzerinde yerleşimi [46]

2.8.2 CTGF Gen Yapısı İşlevi ve Kromozom Yerleşimi

Bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF), yüksek oranda fibroblastlar tarafından sentezlenen, sisteince zengin heparin bağlayıcı büyüme faktörüdür. CTGF, CCN ailesi olarak bilinen, korunmuş ve modüler proteinler ailesindendir. İnsanda, 6. kromozomun q23 lokusuna lokalize olmuştur. CTGF, matriks ilişkili bir protein olup, ECM üretimini arttırmaktadır. Ayrıca bu gen, ECM nin yeniden modellenmesinde ve yara iyileşmesinde önemli role sahiptir.

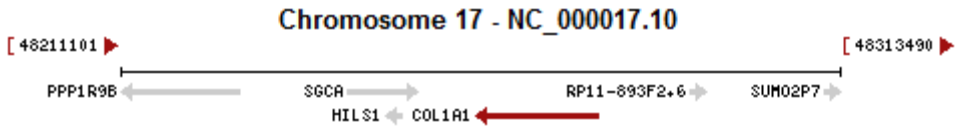
CTGF, ekstrasellülar matriks protein üretimini teşvik eden, fibroblast mitojenidir. Seçici olarak transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-ß) tarafından üretimi indüklenir. Doku tamiri sırasında ve aktivasyon ve koagülasyon kaskadlarıyla ilişkili fibrotik durumlarda, CTGF geni regülasyonu artmaktadır [52] [51]



Şekil 16. CTGF'nin Kromozom 11 üzerinde yerleşimi [46]

2.8.3 COL1A1 Gen Yapısı İşlevi ve Kromozom Yerleşimi

COL1A1 geni, iki tane alfa 1, bir tane alfa 2 zincirinden oluşan üçlü heliksin oluşturduğu kollajen tip 1 molekülünün pro-alfa 1 zincirini kodlar. Tip 1 bağlayıcı dokularda fazla oranlarda bulunan fibril formlu kollajendir ve kemik, kornea, dermis ve tendonlarda yüksek oranda bulunmaktadır. İnsanda 17 kromozomun q21.33 lokusuna lokalize olmuştur [51].

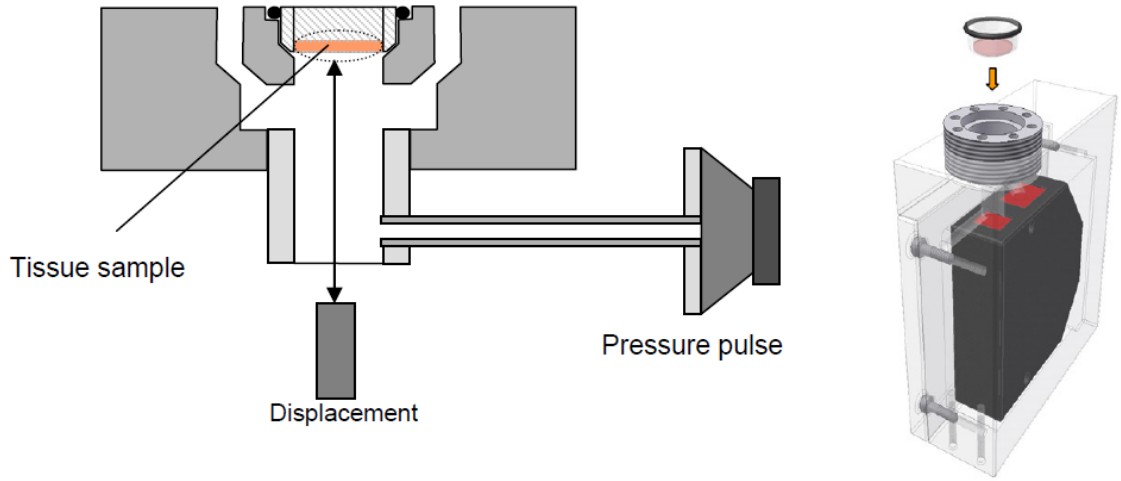


Şekil 17. COL1A1'in Kromozom 11 üzerinde yerleşimi [51]

2.9 HP Bioforce Ölçümü

2.9.1 Cell Drum™ Teknolojisi

CellDrum™, FH Aachen, University of Applied Sciences Hücre Biyofizik laboratuarlarında, Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerhard M. Artmann direktörlüğünde geliştirilmis bir teknolojidir [4]. Doku tansiyon analizör sistemi, HP Bioforce sisteminin, prokürsörü olarak düşünülebilir. Bu teknolojinin geliştirilmesinin amacı, in-vitro çevrelerde mekanik stimülasyon vasıtasıyla, doku ilişkili in vivo reaksiyonların analiz edilmesidir.



Şekil 18. Cell Drum Teknolojisi [4]

Sistemin temelini, “Cell Drum” olarak adlandırılan hücrelerin kültivasyonu için kullanılan kısım oluşturmaktadır. Cell Drumlar 16 mm çapında, biyouyumlu bir materyal olan, PMMA (polimetilmetakrilat) silindirden ve bu silindirin bir tarafını kaplayan biyouyumlu, ince (1 μm), esnek silikon membrandan oluşmaktadır

Silikon, reaktivitesi ve bağlanabilme özellikleri ile, yüz yılı geçgin bir süredir ilgi gören bir elementtir. Silikon membran, fibroblast hücreleri için, ya hücre monolayeri ya da kollajen matriks çalışmalarında, doku yapısı olarak görev görür. Bu sebeple, Cell Drum sistemi, ince hücre tabakalarının neredeyse tüm analizleri için yaygın olarak uygulanabilir ve kullanıma elverişlidir.

PMMA silindirin yerleştirildiği yuva, PMMA silindiri için kenetleme cihazının yanısıra, lazer mesafe sensörünü içermektedir. Membranda bel verme, pompa yardımı ile gerçekleştirilir. Bu pompa ile, basınç vuruşları ya da kalıcı bir sıkıştırma uygulanabilinir. Triangülasyon metodu yardımı ile, membrandaki bel verme (eğrime) tespit edilir. Uzaklık, basınç değişimleri ve titreşim davranışları oranları gözlemlerinden, hücre kuvvetleri ile ilgili bilgiler de elde edilebilir [4].

2.9.2 HP Bioforce Teknolojisi

HPBioforce sistemi, CellDrum^{TM} sistemi prensibine dayanmaktadır. Bu sistem, yüksek verimle ve otomatik olarak hücre kuvvet ölçümlerini gerçekleştiren, CellDrum^{TM} teknolojisinin, birçok örneğe aynı anda uygulanabilinir halidir.

HPBioforce sisteminin temel yapısını, modifiye inkübator oluşturmaktadır. Modifiye inkübator içine, ölçüm merkezi yerleştirilmiştir. Ölçüm merkezi, camdan yapılan 24 “well plate” ve “base frame” den oluşmuştur. “Plate”’in bir yüzü silikon membranla kaplanır ve böylece silikon membran “plate” de bulunan 24 silindir kanalın, bir yüzünü kaplar. Silikon membranlar, hücre monolayer kültivasyonu için, temel yapı işlevi görmektedir. Kültür ortamının değiştirilmesi ve aktif maddelerin eklenmesi, triaxial pipetleme robotu tarafından otomatik olarak gerçekleştirilmektedir. Mekanik situmülasyon, pompa ile üretilmektedir. Bu mekanik situmülasyon, silikon membranda bel verme durumunun oluşmasına sebep olmaktadır.

HP Bioforce sisteminde, silikon membrandaki eğrilme basınç sensörü kullanılarak saptanmaktadır. Bu proseste silikon membrana sabit bir akımda ve hacimde hava basılır ve tanımlanan son hacime kadar, bu hava akımı sürdürülür. Basınç, sistemdeki sensör yardımı ile ölçülür. Sistem, Lab View yazılımı ile oluşturulan programa bağlıdır ve dataların analizi ile, bel verme (eğrilme) – basınç eğrisi gösterilebilinir [4].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Proje, Amerika kaynaklı özel bir kozmetik firma ile ortak bir proje olup Promocell, Cell Application firmalarından satın alınan 6 farklı primer hücre hattı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Proje kapsamında yürütülen Cell Drum üretimi, hücre kültürü, RNA izolasyonu, cDNA sentezi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu deneyleri 01.06.2013 - 01.07.2014 tarihleri arasında FH Aachen, University of Applied Sciences, Biyofizik ve Moleküler Biyoloji Laboratuarı Jülich / Almanya' da yapılmıştır.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Proje kapsamında genç fibroblast olarak, 18, 23, 29 yaşlarındaki dermal fibroblast hücre hatları, yaşlı fibroblast olarak ise, 59, 73, 77 yaşlarındaki dermal fibroblast hücre hatları, kullanılmıştır.

3.4 Çalışma Materyali

Projenin amacı doğrultusunda, genç ve yaşlı olmak üzere iki farklı hücre hattına ihtiyaç duyulduğu için, firmadan genç ve yaşlı primer dermal fibroblast hücreleri ve kullanılacak olan maddeler Amerika'da bulunan firma tarafından 1 Temmuz 2013 -5 Temmuz 2013 arasında sağlanmıştır.

.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Hücresel kuvvetlerin ölçümünde bağımlı değişken, hücresel kuvvetlerdir. Bağımsız değişken ise thrombin ve TGF betadır.

Gen ekspresyonu değerlendirmesinde ise, bağımlı değişkenler CTFG, COL1A1 ve MMP1 genleridir.

.

3.6. Veri Toplama Araçları

Tablo 1. Projede kullanılan mevcut makine/malzeme-teçhizat listesi

Cihaz / Malzeme Adı	Marka	Model/Katalog No	Kullanımı
Biyogüvenlik Kabini (Sınıf 2)	Heraeus	Hera Safe	Hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.
İnkübator	Heraeus	Hera Cell	Hücrelerin 37° C, ve % 5 CO_2 içeren ortamda büyütülmesi amacıyla kullanılmıştır.
HP Bioforce İnkübator	HiTech Zang	-	HP Bioforce hücre kuvvetleri ölçümü sırasında kullanılmıştır.
Otoklav	Systec	2540EL	Hücre kültürü için kullanılan malzemelerin sterilizasyonu için kullanılmıştır.
Su Banyosu			Besi ortamı, PBS gibi hücre kültüründe kullanılan maddeleri ısıtmak için kullanılmıştır.
Real Time PCR Cihazı	Biorad		Gerçek zamanlı PCR analizi için kullanılmıştır.
Nanodrop1000 Spektrofotometre	Thermo		cDNA ve RNA miktarlarını ölçmek için kullanılmıştır.
Neubauer Sayım Lamı	Marienfeld	Cat.No.0640010	Hücre sayımında kullanılmıştır.
Biorad Cell Counter T20 Cihazı	Biorad		Hücre sayımında kullanılmıştır.
Santrifüj	Heraeus	Biofüge 15R	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Hücre Kültür Flaskları	Nunc	Cat.No.56367	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Santrifüj Tüpleri	Greiner Bioone		Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Pipet Uçları	Eppendorf	0030000.870 0030077.148 0030000.919 0030000.978	Hücre kültürü çalışmalarında ve gerçek zamanlı PCR çalışmalarında kullanılmıştır.
Serolojik Pipetler	Roth	N236.1 N239.1 N242.1 N245.2	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.

Tablo 2. Projede kullanılan sarf malzemeler ve diğer gereçler

Sarf Malzemeler	Marka	Lot No
Tripsin/EDTA	PAA The Cell Culture Company	Lot. L00311-3149
DPBS	Gibco by Life Technologies	Lot. 1378876
DMEM + GlutaMax	Gibco by Life Technologies	Lot.1349984
RNAeasy Mini Kiti	Qiagen	Cat. No: 74104
QuantiTect Rev. Transkripsiyon Kit	Qiagen	Cat. No : 205311
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen	Cat. No : 204141
Thrombin	Sigma	
TGF Beta	Sigma	

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi

Tablo 3. Araştırmanın öngörülen çalışma süresi

Ay	Şubat-Nisan 2013	Nisan-Haziran 2013	Haziran-Ağustos 2013	Ağustos-Ekim 2013	Ekim-Aralık 2013	Aralık 2013-Temmuz 2014
Literatür İzleme						
Hazırlık						
Deney Optimizasyonları						
VeriToplama						
Veri Analizi						
Çözümleme						
Makale ve Tez Yazımı						

3.8 Verilerin değerlendirilmesi

3.8.1 Hücre Kültüründe Kullanılan Methodlar

3.8.1.1 Hücre Hattı Seçimi

Homo sapiens fibroblast HDFa hücre hatları, yaş gruplarına göre seçilir.

Tablo 4. Kullanılan Hücre Hatları Listesi

Hücre Hattı	Lot Numarası	Firma
NHDF adult, 29 yaş, bayan	0102004	Promocell
NHDF adult, 59 yaş, bayan	1060701.2	Promocell
NHDF adult, 28 yaş, bayan	1619	Cell Applications
NHDF adult, 73 yaş, bayan	1503	Cell Applications
NHDF adult, 18 yaş, bayan	00967	LifelineCell Technology
NHDF adult, 77 yaş, bayan	1554	Cell Applications

3.8.1.2 Besi Ortamı Hazırlanması

- İstenilen hacimde besi ortamı, aşağıdaki oranlarda hazırlanır.
  - ✓ %90 Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)
  - ✓ %10 Fetal calf serum (FCS)

3.8.1.3 Hücrelerin Çözdürülmesi

- Çözdürülmek istenen kriyoprezervasyon tüpü, sıvı nitrojen tankından uygun korunma yöntemleri kullanılarak alınır.

- Sıvı nitrojenin, kriyoprezervasyon tüpünde hiç kalmadığına emin olmak için tüpün kapağı azıcık gevşetilir ve tekrar sıkıca kapatılır.

- Kriyoprezervasyon tüpü, önceden ayarlanmış 37 °C su banyosunda 1 dakika bekletilir.

- Tüp su banyosundan alınır, kurulanıp %70'lik alkol ile silinerek biyogüvenlik kabini içine alınır.

• Tüp içindeki hücreler resüspanse edilerek, 1 ml hücre süspansiyonu 15 ml besi ortamı (%90 DMEM +%10 FCS) içeren tüpe alınır.

• 15 ml hücre süspansiyonu ve besi ortamı içeren tüpten alınan 7,5 ml hacim, T-75 flaskına eklenir ve üzerine 7,5 ml besi ortamı eklenerek flask içindeki hacim 15 ml'e tamamlanır.

• Hazırlanan T-75 flaskları 37 °C, %5 CO_2 içeren inkübator içine alınır.

• 24 saat süresince flask, kültive edilir, 24 saat sonunda, besi ortamı değiştirilir.

3.8.1.4 Hücrelerin Pasajlanması

• Çözdürme işleminden sonra, 1 hafta boyunca inkübatör içinde kültive edilen hücreler, %80 konfuluent hale geldikleri anda, pasajlama işlemi yapılır.

• İnkübatörden alınan flask, öncelikle mikroskop altında incelenerek hücrelerin sağlıklı olup olmadığı, ne kadar konfuluent oldukları, herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı, kontrol edilir.

• Pasajlama için kullanılacak materyaller, önceden hazırlanmış 37 °C'deki su banyosuna alınır.

• Hücreleri yıkamak için, eğer T-75 flasklarla çalışıyorsak 15 ml ılık PBS kullanilir.

• PBS çekildikten sonra, hücreleri kaldırmak için, 3 ml Tripsin/EDTA solüsyonu monolayer hücre tabakası üzerine uygulanır ve 4 dakika 37 °C, %5 CO_2 içeren inkübator içinde, inkübe edilir. Tripsin/EDTA solüsyonu, hücrelerin monolayer tabaka ve birbirileri arasındaki bağlarını koparark, hücrelerin flask yüzeyinden kalkmasını sağlamaktadır.

• 4 dakika sonunda, inkübatörden alınan flask, önce mikroskop altında konularak, tüm hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı ve hücrelerin birbirinden ayrılıp ayrılmadığı, gözlenir.

• Mikroskop altından alınan flaskın içindeki Tripsin/EDTA solüsyonunu inibe etmek için, 15 ml besi ortamı flaska uygulanır ve flask içindeki hücreler süspanse edilerek, 50'lik ependorf tüplerine alınır.

• Ependorf tüpü içindeki hücre solüsyonundan besi ortamını uzaklaştırmak için tüp, santrifüje alınır ve 280 g'de 5 dakika santrifüj edilir.

• Santrifüjden alınan tüpte hücreler dibe çökmüş şekilde gözlenir ve üzerindeki besi ortamı, vakumla çekilir.

• Hücrelerin üzerine, 1ml besi ortamı eklenerek, hücreler resüspanse edilir.

3.8.1.5 Hücre Sayımı

Hücre sayımı için iki farklı yöntem kullanılmıştır.

Biorad Cell Counter T20 Cihazı ile Hücre Sayımı

• Pasajlama işlemleri sırasında, santrifügasyon aşamasından sonra, besi ortamı çekilerek, hücreler 1 ml besi ortamı ile resüspanse edilir.

• 10 µl trypan blue boyası ile, 10 µl hücre süspansiyonu karışıtırılır ve bu karışımdan 10 µl çekilerek, aşağıda görülen bu cihazın kullanımına uygun olarak tasarlanmış sayım slaytına, pipet yardımı ile eklenir. Sayım slaytı poligon plastikten yapılmış olup, boyutları 75 x 25 x18 mm'dir. Üzerinde bulunan iki tane sayım bölmesi, PMMA (polimetilmetakrilat) maddesi ile yapılmıştır ve derinliği 100 µm'dir. Kullanılan 10 µl hücre-"trypan blue" boyası süspansiyonunun 0.4 µl'lik kısmı, sayım için kullanılır. "Trypan blue" boyası ise, canlılık testi içindir . Ölü hücrelerin hücre zarı

zarar görmüş olduğu için, boya kolaylıkla hücre içine girer ve ölü hücreler mavi renge boyanır [53]

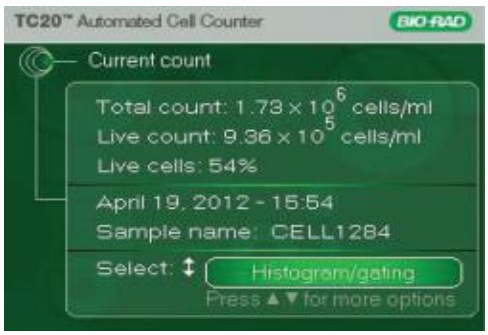


Şekil 19. BioRad Cell Counter Sayım Slaytı [53]

• Hazırlanan lam, cihaz üzerinde bulunan lam için özel tasarlanmış özel yuvaya yerleştirilir. Cihaza sayım komutu verilir ve sonuçlar alınır.



Şekil 20. Slaytın cihaz içine yerleştirilmesi [53]



Şekil 21. Alınan sonuçların ekranda gösterilmesi [53]

Neubauer Lamı ile Hücre Sayımı

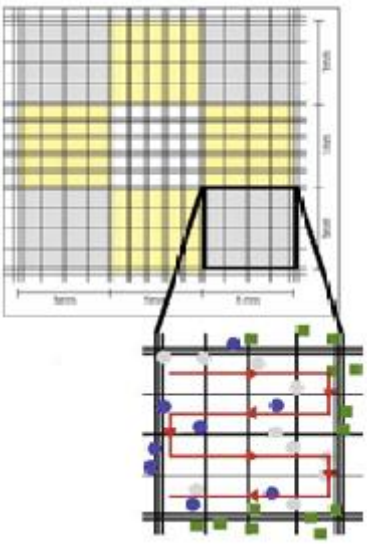
• Pasajlama işlemleri sırasında, santrifügasyon aşamasından sonra besi ortamı çekilerek, hücreler 1 ml besi ortamı ile resüspanse edilir.

• Resüspanse olan hücreden 10 µl alınarak, 90 µl “trypan blue” boyası ile karıştırılır. Böylece 1:10 oranında hücre ortamı, “trypan” ile seyreltilir. Bu seyreltme oranı, istenilen oranlarda değiştirilebilir. Elde edilen bu karışımdan çekilen 30 µl hacim, aşağıda resmini gördüğümüz Neubauer olarak adlandırılan sayım slaytına eklenir. Neubauer lamının esası 0,1 mm^3 hacimde sayım yapılmasına dayanmaktadır. Lamın çukur bir kısmı vardır. Hücreler iletrypan blue karışımı, bu kısım üzerine aktarılıp, lamel kapatıldığında bu çukurda 0,1 mm yüksekliğinde bir sıvı kalır. Lam üzerinde, iki farklı sayma alanı vardır [54].



Şekil 22. Neubauer Lamı [4]

• Hazırlanan lam, mikroskop altına alındığında ilk sayma alanı aşağıdaki şekildeki gibi (Sekil 23) gözlenir. İki sayma alanı da, aynıdır. Bu alanda, köşelerde bulunan 25 tane küçük kare içeren, 4 kare sayılır. Sayım, aşağıda gösterildiği gibi kırmızı ok yönünde olur. Gri olarak görülen noktalar, sayılan canlı hücreler, mavi olarak görülen noktalar ise, “trypan” ile boyanmış olan ölü hücrelerdir. Yeşil ile gösterilen noktalar da, sayım alanı dışında veya çizgisinde kalan, sayılmaması gereken hücrelerdir. İkinci sayma alanı için de, bu sayım yapılır.



Şekil 23. Neubauer Lamı Sayım Alanı ve Sayım Sistemi [4]

- Sayım sonucunda ;

  ml'deki hücre sayısı (X) :

  $$X = \frac{Xi.10000}{8} \times Seyreltme\ Faktörü\ x\ [ml]\ resüspanse\ edilen\ hacim$$

  formülü kullanılarak, ml'deki hücre sayısı hesaplanır.

3.8.1.6 Hücre Dondurma

• Hücre dondurma işlemi basamakları, pasajlama işlemi ile aynıdır.

• Hücrelerin sayım basamağından sonra, dondurulmak istenilen sayıda hücre, %10 DMSO (Dimethyl sulfoxide) ile %90 FCS Gold içeren, dondurma ortamının bulunduğu kriyoprezervasyon tüpüne eklenir.

• Kriyoprezervasyon tüpleri, her dakikada sıcaklığı -1°C düşürmeyi sağlayan isopropanol kutusuna alınarak, -80 °C'de bir gece bekletilir. Bir sonraki gün tüpler, sıvı nitrojen içine alınır.

3.8.2 HP Bioforce Ölçümleri için Kullanılan Metodlar

3.8.2.1 Silikon Membran ‘’ Well ‘’ Üretimi

• Silikon membran için gerekli olan silikon materyali, belirlenen oranlarda karıştırılır.

• 24’lük membran well’leri hazırlanır ve gerekli çalışma düzeni kurulduktan sonra, silikon maddesi 24’lük membran “well”’in bulunduğu sıvı ortama eklenir ve silikonun kuruması için beklenir.

• Silikonun kurumasından sonra, sıvı ortamdan bir kısım uzaklaştırılarak, silikonun 24’lük membran “well” ile teması sağlanır ve yapışma için bir süre beklenir.



Şekil 24. 24’lük silikon membran ‘’ well ‘’ (FH Aachen, University of Applied Sciences, Biyofizik ve Moleküler Biyoloji Laboratuarı)

3.8.2.2 Membran Fonksiyonelleştirilmesi

• İlk aşama oksidasyon aşamasıdır. H_2O, H_2O_2 ve HCl bileşenlerinin belirli hacimleri ile hazırlanan oksidasyon solüsyonundan, her Cell Drum’a 500 µl eklenir ve bir süre oda sıcaklığında bekletilir. Oksidasyon solüsyonu eklenmesinin amacı, hibrofobik olan membranı, hidrofilik hale getirmektedir. Hidrofilik hale gelen silikon

membran yüzeyinde bulunan –OH grupları, ikinci aşamada kullanılan silan molekülündeki silan gruplarınının, silikon membrana bağlanması için önemlidir [51].

• İkinci aşama silanizasyondur. Bu aşamada silanizasyon solüsyonu hazırlanır. Her Cell Drum'a 200 µl eklenir ve bir süre oda sıcaklığında bekletilir.

• Fonksiyonelleştirmenin son aşaması ise, fibronektin ile membran yüzeyinin kaplanmasıdır. Belirlenen oranda hazırlanan fibronektin solüsyonunundan 500 µl, her Cell Drumdaki, silikon membran yüzeyine eklenir. Hazırlanan Cell Drumlar bir gece 37 °C, %5 CO_2 ortaminda bekletilir. Bekleme süresi, bir iki haftaya kadar çıkarılabilir. Bu aşamada fibronektinin kullanılmasının amacı, hücrede bulunan hücre matris bağlantılarını sağlayan integrinlerin, fibronektin ile bağlanabilme kapasitesidir. Bu yüzden silikon membran yüzeyi fibronektin ile kaplanarak, hücrelerin yüzeye tutunma oranı arttırılmıştır [9].

3.8.2.3 Hücrelerin Membranlara Ekimi

• Hücrelerin Cell Drum'lara ekilmesi sırasında, elimizde olan 18, 23, 29 yaşlarındaki dermal fibroblast hücre hatlarının her birinden 1/3 alınarak, üç farklı hücre hattı karıştırılır. Aynı işlem, 59, 73, 77 yaşlarındaki dermal fibroblast hücre hatları için de yapılır. Bu yüzden, öncelikle her bir hücre hattının bulunduğu hücre kültürü flaskına, 3.1.3 bölümünde anlatılan hücre pasajlama işlemleri uygulanır.

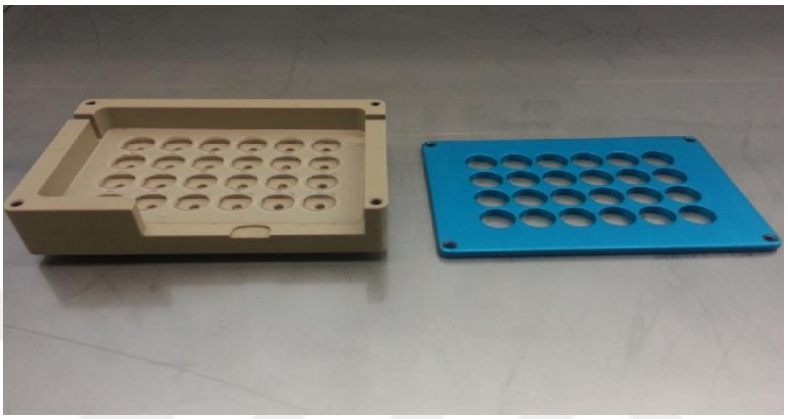
• 3.1.4 bölümünde anlatılan hücre sayım tekniklerinden biri ile hücre sayımı yapıldıktan sonra, Cell Drum'da hücrelerin hangi madde ile ve ne kadar süre 37 °C, %5 CO_2 inkübatörde inkübe edileceği göz önüne alinanarak, eklenecek hücre miktarı belirlenir. Bu miktara göre, her bir hücre süspansiyonunda çekilecek hacim hesaplanır.

3.8.2.4 Hücrelerin Cell Drum'da Kültivasyonu ve Kuvvet Ölçümü

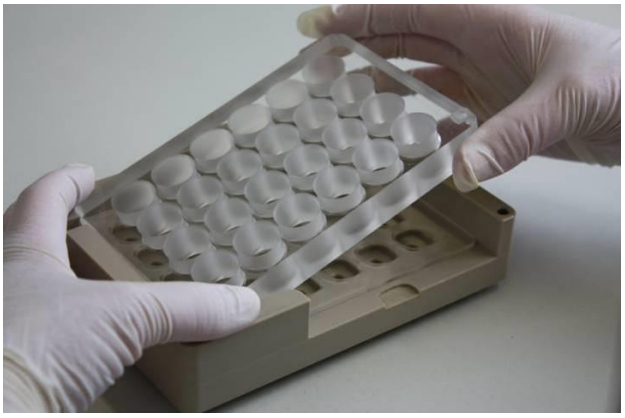
• Hücre ekiminden sonra hücreler 37 °C, %5 CO_2 inkübatörde iki gün süre ile inkübe edilir. Bu süre içinde hücre besi ortamı, her gün değiştirilir.

• Ölçümden 24 saat önce, TGF beta ve firmadan gelen içerikler, hücrelerin üzerine belirlenen konsantrasyonda eklenir.

• 24 saat sonunda, 24 well silikon membrandaki hücreler aşağıda, sağda gösterilen hazneye yerleştirilir ve üzeri, soldaki kapak ile kapatılarak haznenin dört köşesinde bulunan yerlerden, vida ile sıkıştırma yapılir. Bu sekilde, silikon membran yüzeyinin, tam olarak hazne tabanına oturtulması sağlanır.



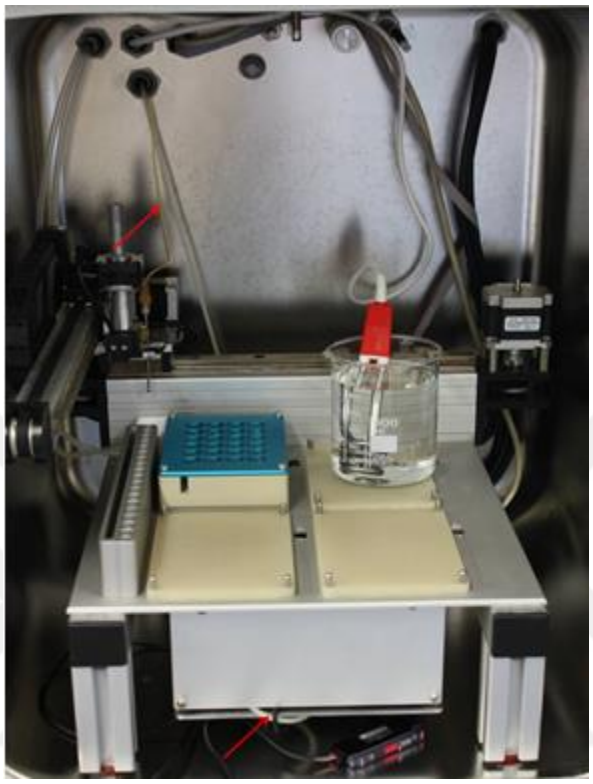
Şekil 25. Ölçüm haznesi ve haznenin kapağı (FH Aachen, University of Applied Sciences, Biyofizik ve Moleküler Biyoloji Laboratuarı)



Şekil 26. Silikon membran plakanın ölçüm haznesine yerleştirilmesi (FH Aachen, University of Applied Sciences, Biyofizik ve Moleküler Biyoloji Laboratuarı)

• Ölçüm haznesi, şekil 25'de görülen HP Bioforce için tasarlanmış inkübatöre yerleştirilir. Resim üzerinde, kırmızı ok ile gösterilen plastik borudan hava basıncı gelmektedir. Hava basıncının hızı, şekil 27' de gösterilen pompa sistemi ile sağlanmıştır. Bu pompa sistemi,, şekilde de görüldüğü gibi bir şırınga ile kombine edilmiştir. Ayrıca bu pompa sistemi, "HP Bioforce" inkübatörü ve "LabView" arayüzü

ile, kombine edilmiş durumdadır. Şırınganın hava akımı, her saniyde 20 µl olarak ayarlanmıştır. Sistemin açılmasını takiben 20 saniye boyunca, ölçüm haznesinde görülen siyah deliklerden, silikon membrana hava akımı verilmektedir.



Şekil 27. HP Bioforce İnkübatör düzeneği (FH Aachen, University of Applied Sciences, Biyofizik ve Moleküler Biyoloji Laboratuarı)

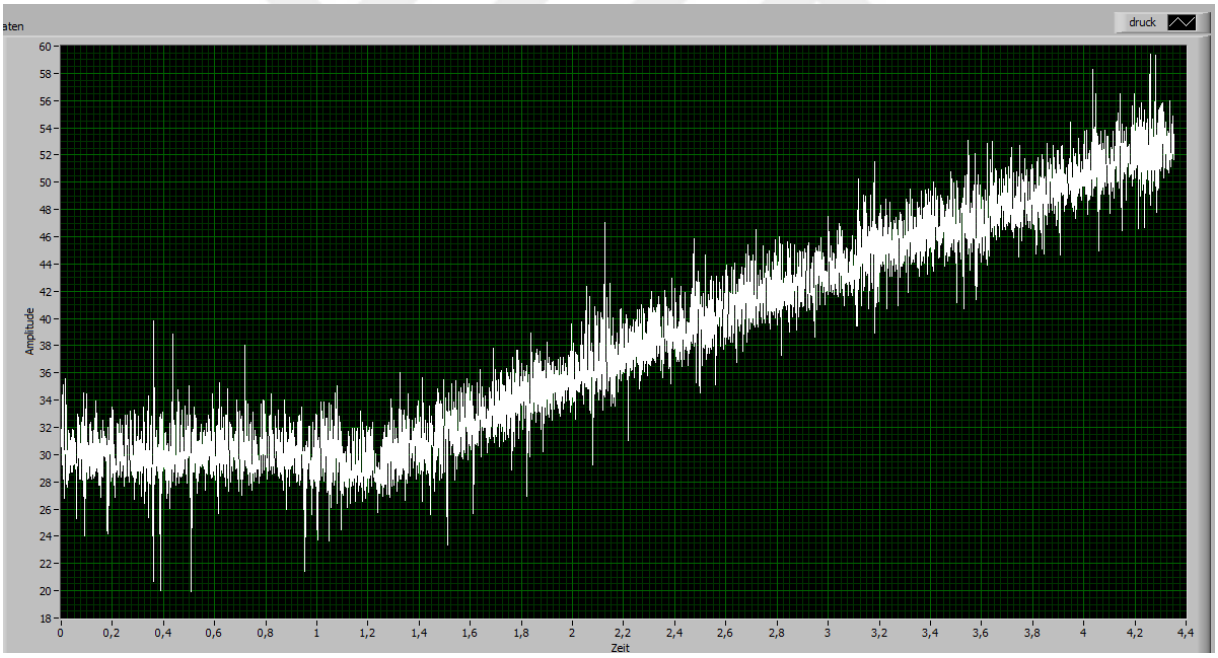


Şekil 28. HP Bioforce Sisteminde kullanılan pompa (FH Aachen, University of Applied Sciences, Biyofizik ve Moleküler Biyoloji Laboratuarı)

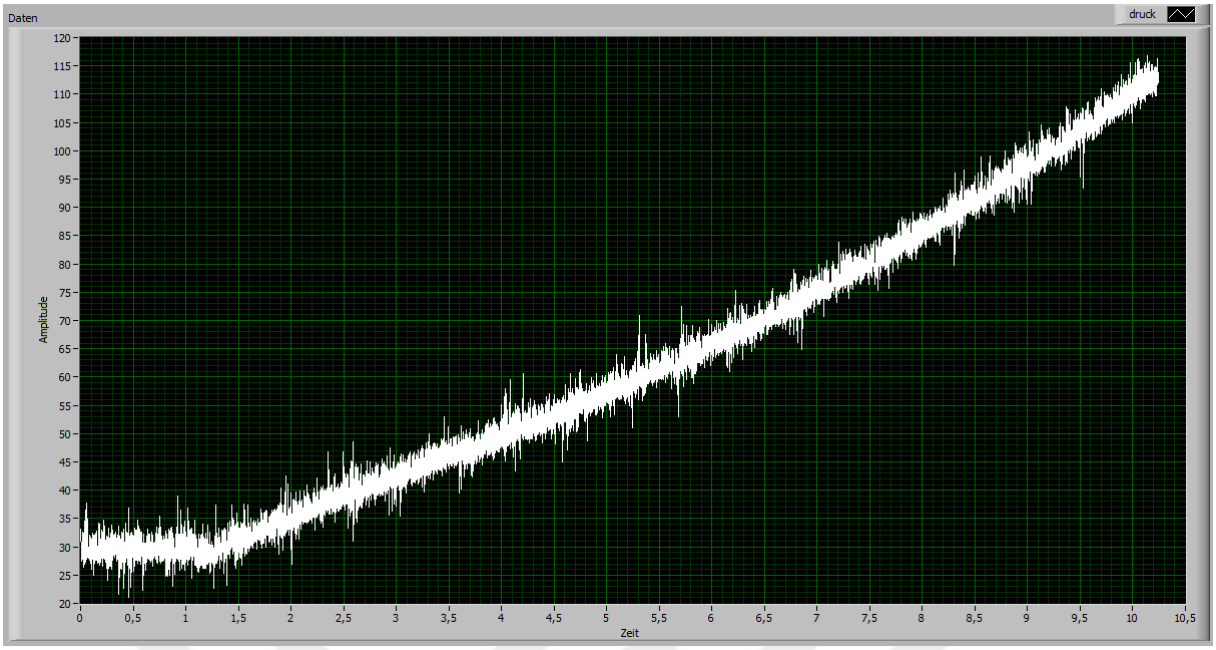
• Membrana hava uygulanma öncesinde membran altındaki ve üstündeki basınç dengesini sağlamak için, sistem bir süreliğine atmosfere açılır.

• Sistem atmosfere açılır, pompadan hava akımı ile silikon membrana, 20 saniye süreli basınç uygulanır.

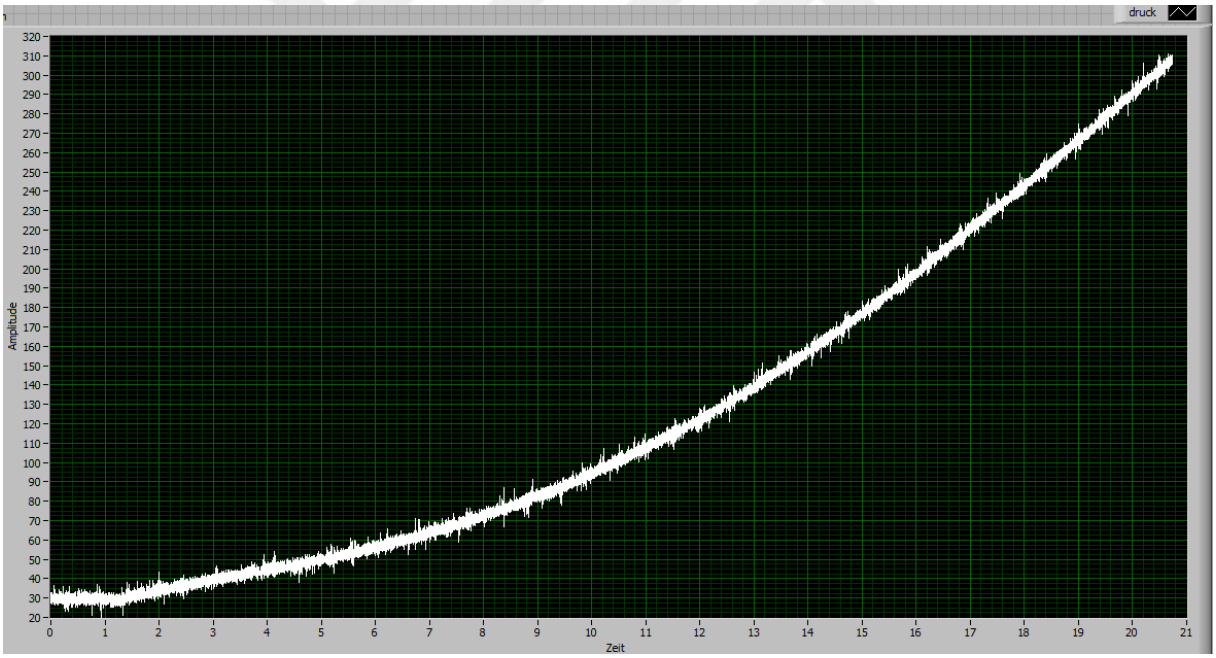
• 20 saniyeyi takiben, aşağıdaki grafiğe benzer şekilde, 24lü “well”’deki her bir cell druma ait grafik elde edilir. Her cell drum ölçümü öncesinde, plastik borunun giriş kısmı değiştirilerek, ölçülmek istenen “cell druma” getirilir.



(I)



(II)



(III)

Şekil 29. (I) Ölçümün ilk 4 saniyesinde alınan grafik (II) Ölçümün ilk 10 saniyesinde alınan grafik (III)Ölçüm sonucunda elde edilen grafik (FH Aachen,University of Applied Sciences, Biyofizik ve Moleküler Biyoloji Laboratuarı)

- Ölçümler sonucu elde edilen grafikler, “LabView” yazılımında oluşturulmuş programla değerlendirilmektedir. Bu değerlendirmede, grafiğin eğim gösterdiği andan

başlayarak yedinci saniyeye kadar elde edilmiş eğrinin eğimi hesaplanır ve bulunan bu değer, hücre kuvveti olarak alınır.

.

3.8.2.5 Trombin Konsantrasyonu Belirlenmesi ve Cell Drum'a Uygulanması

- "Cell Drum" lara hücreler ekildikten bir gün sonra, Sigma firmasından alınan ve stok solüsyondaki konsantrasyonu 1U/µl olan trombin maddesi, 29 ve 59 yaş hücrelerin kültive olduğu "cell drum" lara sırasıyla, 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 5 µl, 6 µl hacimlerinde, hücrelerin yüzeyine gelecek sekilde uygulanır.

- Uygulama sonrasında, bir dakika ve dört dakika sonra ölçüm yapılır. Her ölçüm, 20 saniye sürecek şekilde ayarlanır. 20 saniye süren bu ölçümler 3 kez tekrar edilir.

3.8.2.6 TGF Beta'nın Cell Drum'a uygulanması

- "Cell Drum" lara hücreler ekildikten bir gün sonra, Sigma firmasından alınan TGF beta maddesi, 29 ve 59 yaş hücrelerin kültive olduğu "cell drum" lara, 20 ng/ml konsantrasyonunda uygulanmaktadır.

- Uygulama sonrasında, bir gün daha "Cell Drum"'lar inkübatörde bırakılır ve 24 saat sonra ölçüm yapılır. Her ölçüm, 20 saniye sürecek şekilde ayarlanır. 20 saniye süren bu ölçümler, 3 kez tekrarlanır.

3.8.2.7 Firmadan gelen İçeriklerin Cell Drum'a Uygulanması

- "Cell Drum" lara hücreler ekildikten bir gün sonra, projede birlikte calisilan firmadan gelen içerikler, aşağıdaki konstantrasyonlarda "cell drum"lara uygulanır.

• Bu içerikler sadece, 59,73 ve 77 yaşlarındaki hücrelere uygulanmıştır ve referans olarak da, TGF beta alınmıştır.

Firma tarafından gönderilmiş olan madde içerikleri A1-5 arasında isimlendirilmiştir.

Tablo 5. Yaşlı hücre hatlarına uygulanan içerikler ve konsantrasyonları

İÇERİKLER	BAŞLANGIÇ KONSANTRASYONU	SON KONSANTRASYON
A-1	%1	%0.0005 A-1 %0.005 A-2 %0.01 A-3 %0.005 A-5
A-2	%1	%0.010
A-3	%1	%0.01
A-4	%1	%0.002
A-5	%1	%0.01

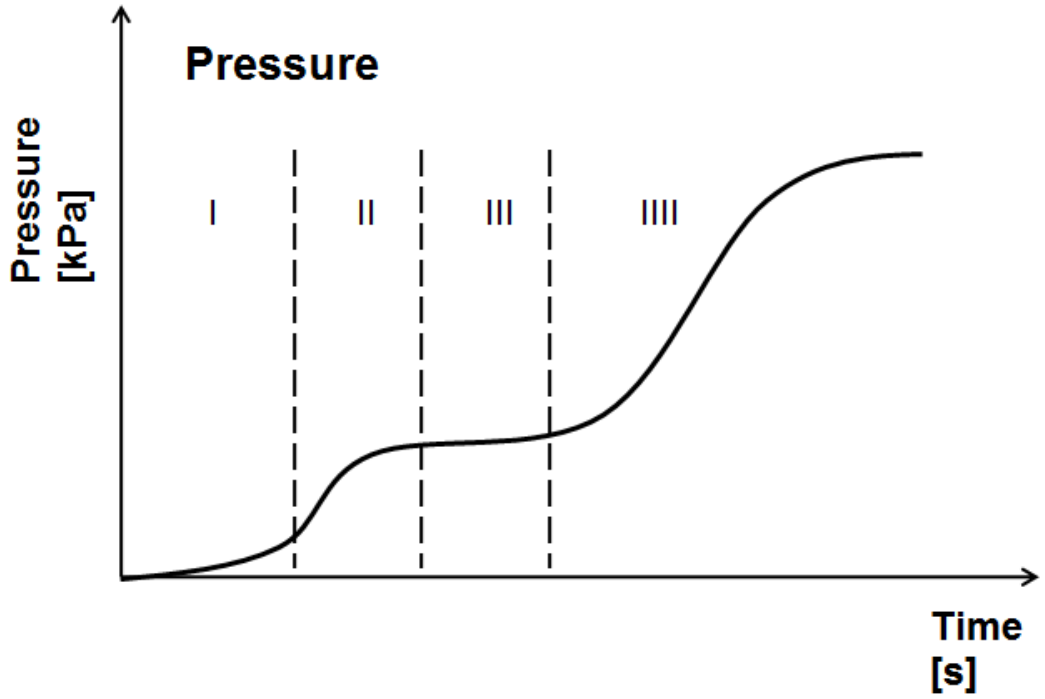
3.8.3 HP Bioforce Ölçüm Metodu

3.8.3.1 Basınç Eğrisi Kaydı

Ölçümler sırasında membranlara, 500 µl besi ortamı eklenir. Böylece membranlar, kolayca eğilme gösterir. Membrana hava uygulanma öncesinde membran altındaki ve üstündeki basınç dengesini sağlamak için, sistem bir süreliğine atmosfere açılır. Membrana hava uygulanmasından sonra, şırınga pompası sabit hacimde akımı, membranın aşağısındaki kaviteye doğru indükler. Artan basınç, silikonda şişkinlik yaratır.

Kaydedilen eğri, bu süre boyunca elde eilen basıncı gösterir ve kaydedile egri, 4 karakteristik kısma ayrılabilir;

I. Bazal basınç uygulaması
II. Hidrostatik basıncın aşılması
III. Eğrilme noktasının geçilmesi
IV. Membranın esneklik doyumuna ulaşılması



Şekil 30. Silikon membrana uygulanan basıncın zamanla değişimi grafiği [4]

İlk kısımda, sistem içindeki hava pompadan sabit miktarda gelen akım tarafından, komprese edilir. Bu basamaktan sonra, eğrinin en düşük değeri kaydedilir; çünkü medyumun basıncı, uygulanan basınca karşı koyar.

Membran üzerindeki hücreler, kültivasyon sürecinden geçtikleri için, hücrelerin ekstrasellülar matriksleri, eğriyen membran üzerine adapte edilmiştir. Ölçüm süresince membran, farklı bir yöne eğilme gösterecektir. Bu yüzden, üçüncü faz olan ‘’sıfır eğilim noktasının aşılması’’ aşamasında akım, eğriyen membranı membran üzerindeki büyüyen monolayer hücrelerin kuvvetlerine karşı itecektir. Hidrostatik basıncın etkisizleştirildiği bu aşama, ölçümün kritik noktasıdır.

Son aşama süresince, hücre monolayer tabakası ve membranın gerilimi akıma ve dolayısıyla uygulanan basınca karşı koyar. Bu da eğri de, tekrar bir azalmaya sebep olmaktadır [13].

3.8.4 Gerçek Zamanlı PCR

3.8.4.1 Hücrelerden RNA İzolasyonu

• Hücre besi ortamı uzaklaştırılarak, hücreler 15 ml PBS ile yıkanır.

• PBS hücreler üzerinden çekilir ve 3 ml tripsin/EDTA hücreler üzerine eklenir. Hücrelerin bulunduğu flask inkübatöre alınarak, 4 dakika boyunca inkübe edilir.

• Hücrelerin flask yüzeyinden kalkıp kalkmadığı, mikroskop altında kontrol edilir. Hücreler yüzeyden kalktıysa, 15 ml besi ortamı ile tripsin inaktive edilir ve hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne alınır.

• Santrifüj tüpüne alınan hücreler, 280 x g de 5 dakika santrifüj edilirler.

• Santrifüj sonrası besi ortamı çekilir ve 1 ml besi ortamı ile tüpün dibindeki hücre peleti resüspanse edilir. Hücre sayısı saptanır.

• RNA izolasyonu için hücreler RNase içermeyen 1,5 ml'lik polipropleп santrifüj tüpüne alınır ve 10000 x g'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonunda süpernatant alınarak hücreler tüp dibinde bırakılır.

• Hazırlanan hücreler üzerine, kit bileşeni olan RLT Buffer ve betamerkaptoetanol karışımından 350 µl eklenir ve karışması vorteksleyerek veya pipetlenerek sağlanır. Bu buffer hücrelerin lizisine sebep olmaktadır.

• Bu şekilde hazırlanan lizat direk olarak QIAshredder olarak adlandırılan kolona alınır ve bu kolon da 2 ml'lik toplama tüpü üzerine yerleştirilerek 10 000 x g'de ve 4 °C'de 2 dakika santrifüj edilir.

• Homojene olan lizat gDNA elimine eden kolona alınır ve bu kolon da 2 ml'lik toplama tüpü üzerine yerleştirilerek ≥8000 x g'de (≥10 000 rpm) ve 4 °C'de 30 saniye santrifüj edilir. (Bu aşamada kolondaki membranın kuru olduğuna ve üzerinde bir sıvı kalmadığına dikkat edilmelidir. Eğer sıvı kaldıysa tüm sıvı membrandan uzaklaştırılana kadar santrifüj işlemi tekrarlanır.)

• Toplama tüpünde birikmiş olan lizat üzerine 350 µl 70% EtOH eklenir ve pipetleyerek tam olarak karışma sağlanır.

• Tüp içinde karışmış halde bulunan ve herhangi bir kalıntı içermeyen örnekten 700 µl alınarak Rneasy spin kolonuna transfer edilir ve bu kolon yine toplama tüpü üzerine yerleştirilir. Kolonun kapağı kapatılarak 15 saniye boyunca spin kolon membranın yıkamak için ≥8000 g'de (≥10 000 rpm) santrifüj edilir. Toplama tüpündeki biriken sıvı uzaklaştırılır.

• Rneasy kolon bir önceki basamakta kullanılmış toplama tüpüne yerleştirilir ve üzerine kit içeriği olan ve yıkama için gerekli olan 500 µl Buffer RPE eklenir. Kolonun kapağı kapatılır ve 15 saniye boyunca spin kolon membranın yıkamak için ≥8000 g'de (≥10 000 rpm) santrifüj edilir. Toplama tüpündeki biriken sıvı uzaklaştırılır.

• Rneasy kolon bir önceki basamakta kullanılmış toplama tüpüne yerleştirilir ve üzerine kit içeriği olan ve yıkama için gerekli olan 500 µl Buffer RPE eklenir. Kolonun kapağı kapatılır ve 30 saniye boyunca spin kolon membranın yıkamak için ≥8000 g'de (≥10 000 rpm) santrifüj edilir. Toplama tüpündeki biriken sıvı uzaklaştırılır.

• Opsiyonel olarak Rneasy spin kolonu yeni 2 ml'lik toplama tüpüne alınarak en yüksek hıza 3 dakika santrifüj edilir. Bu aşama sayesinde Rneasy spin kolonunda herhangi bir Buffer RPE kalmadığından emin olunur.

• Son aşamada RNeasy spin kolonu yeni 1,5'lik toplama tüpüne alınır ve 30-50 µl RNase-free su direk olarak kolon membranına eklenir. Kolonun kapağı kapatılır bir dakika bekleme süresinden sonra 1 dakika boyunca ≥8000 g'de (≥10 000 rpm)

santrifüj edilir. Bu işlem sayesinde kolonda takılmış olan RNA'lar toplama tüpünde su sayesinde iner.

3.8.4.2 RNA Konsantrasyonunun Spektrofotometre ile Ölçümü

- Cihaz başlatılır ve RNA ölçüm seçeneği seçilir.

- Cihazın küvet konulacak kısmı açılır ve RNA izolasyonunun en son basamağında RNA'nın çözdürüldüğü '' Rnase free water '' solüsyonundan 50 ml alınarak temiz küvete eklenir.

- Cihazda '' blank '' seçeneği seçilerek '' Rnase free water '' solüsyonunun ölçümü yapılır. Böylece içinde RNA olmadığından emin olunan solüsyon referans ölçüm olarak alınır.

- RNA içeren 4 farklı örnekten 5 ml alınarak 45 ml '' Rnase free water '' solüsyonunda seyreltilir.

- RNA içeren örneklerin dilüsyonlarını içeren küvetlerin ölçümü yapılır.

- Alınan konsantrasyon, 260/230 ve 260/280 oranları kaydedilir.

3.8.4.3 cDNA Sentezi

- Kullanılacak olan RNA -80 °C'den alınır eritilir ve tekrar buz üzerine yerleştirilir.

- Kit içerikleri eritilir ve oda sıcaklığına getirilir. Her tüpteki içerik eritildikten sonra kısa bir süre santrifüj edilir ve buz üzerine alınır.

- Genomik DNA eliminasyonu reaksiyonu için buz üzerinde aşağıdaki karışım hazırlanır.

Tablo 6. cDNA sentezinin ilk basamağı birleşenleri

Bileşen	Hacim / Reaksiyon	Son Konsantrasyon
gDNA Wipeout Buffer	2 µl	1X
RNA	Değişken	0.5 µg (1 µg kadar)
Rnase-Free su	Değişken	
Toplam Hacim	**14 µl**	

• Bu karışım 42 °C'de 2 dakika inkübasyondan sonra, direk olarak buz üzerine alınır.

• Reverse-transkripsiyon master karışımı, aşağıdaki tabloya göre hazırlanır. Bu karışımdaki bileşenler first-strand cDNA sentezi için gerekli bileşenlerdir. Bileşenler eklendikten sonra RNA eklenir.

Tablo 7. cDNA sentezinin ikinci basamağı birleşenleri

Bileşen	Hacim / Reaksiyon	Son Konsantrasyon
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl	
Quantiscript RT Buffer	4 µl	1X
RT Primer Mix	1 µl	
Kalıp RNA	14 µl	
Toplam Hacim	**20 µl**	

3.8.4.4 Primer Dizaynı ve Real Time PCR

- Referans geni olarak ACTB geni seçilmiştir.

Tablo 8. İfadesi Araştırılan Genler ve Primerleri

GEN ISIMLERI	Alınan Baz Uzunluğu	Forward ve Reverse Primerler
MMP1	775+1044 270bp	**F;**CGTTCCCAAAATCCTGTCCA **R;**AACAGCCCAGTACTTATTCCCTTT
CTGF	617+850 234bp	**F;**CAGCATGGACGTTCGTCTG **R;**ATCCCACAGGTCTTGGAACAG
COL1A1	2789+2960 172bp	**F;**CCTCTGGAAATGCTGGACC **R;**GCACCAGCAGGACCATCA
ACTB	34+207 174bp	**F;**AGCCTCGCCTTTGCCGA **R;**CTGGTGCCTGGGGCG

- Primerler primer ile birlikte gelen bilgi kağıtlarına göre sulandırılmıştır.

- Aşağıdaki tabloya göre gerçek zamanlı PCR bileşenleri hazırlanır.

Tablo 9. Gerçek zamanlı PCR için oluşturulan karışım birleşenleri ve miktarları

Bileşen	Hacim / Reaksiyon	Son Konsantrasyon
2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix	12.5 µL	1x
Primer forward	Değişken (2.5 µL)	0.5 µM
Primer reverse	Değişken (2.5 µL)	0.5 µM
Kalıp cDNA	Değişken	≤100ng/reaction
RNase-free water	Değişken	
Toplam Hacim	**25 µL**	

- Yukarıda belirlenen hacimler karıştırılır PCR tüpleri içinde karıştırılır.
- Kalıp cDNA hazırlanan karışım üzerine eklenir.
- PCR tüpleri cihaz içine alınır ve aşağıdaki programa göre cihazın çalışması başlatılır.

Tablo 10. Gerçek zamanlı PCR reaksiyon basamakları

Basamaklar	Sıcaklık - Zaman
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C – 05:00
Amplifikasyon (35 kere)	95 °C – 00:13
Bağlanma (35 kere)	60 °C – 00:30
Erime eğrisi (116 kere)	40 °C – 00:03
Bekleme	40 °C

- Yapılan ilk PCR sonuçlarına göre CTFG geni de hücrelerde yok denecek kadar az ifade edilmiştir. Bunun nedeni CTFG geni için seçilen primerlerin hatalı olması ya da bu genin kullanılan hücrelerde ifade edilmesinin çok az olmasıdır. İlk ihtimal değerlendirilerek primerler değiştirilmiştir.

Tablo 11. CTFG'nin yeni primerleri

GEN İSİMİ	Forward ve Reverse Primerler
CTGF	**F;**CCCAGACCCAACTATGATTAGAGC **R;**TTTGCCCTTCTTAATGTTCTCTTC

3.8.5 Verilerin İstatiksel Analizleri

3.8.5.1 Wilcoxon Testi

Bir grubun veya örneğin iki bağımlı değişkene ilişkin ortalamalarının karşılaştırılması ve bu ortalamalar arasındaki farkın belirli bir güven düzeyinde anlamlı olup olmadığının test edilmesi için kullanılan istatiksel metodtur. Tezin ilk

kısmını oluşturan hücre kuvvetlerinin ölçülmesinde, yaşlı ve genç hücre gruplarının ayrı ayrı thrombin ve TGF beta bağımlı değişkenlerine bağlı olarak değerlendirilmesinde, sonuçların anlamlı olup olmadığı bu yöntem ile tespit edilmiştir.

3.8.5.2 GraphPad Programı

Gerçek zamanlı PCR sonucunda elde edilen Ct değerlerinin ortalaması ve standart sapmasını bulmak ve gruplar arasındaki sonuçların anlamlı olup olmadığını değerlendirmek amacıyla, p değerlerinin bulunması bu program yardımı ile bulunmuştur.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Gerçek zamanlı PCR çalışmaları için daha fazla hücre hattı ile çalışılabilirdi, böylece bu araştırma popülasyonu daha iyi yansıtabilirdi.

3.10 Etik Kurul Onayı

Etik kurul onayı Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurulu'dan DEU.HSI.MSc-2011970099 numarası 06.11.2013 tarihinde alınmıştır (Ek 1).

4. BULGULAR

4.1 Trombin Konsantrasyonu Belirlenmesi

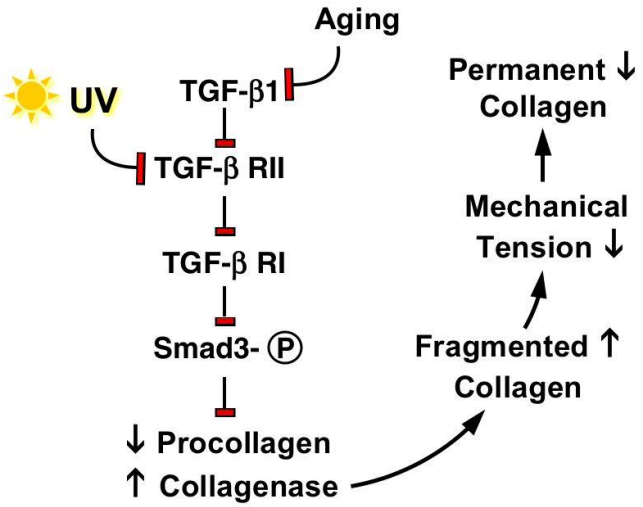
Thrombinin stok solüsyonu konsantrasyonu 1U/µl dir. 1 µl ile 6 µl arası thrombin hacmi hücrelerin yüzeyine uygulanmıştır. Mikroskop altında yapılan incelemelere göre ve önceki çalışmalar da göz önüne alınarak uygun thrombin miktarı 1 U olarak bulunmuştur. Thrombin miktarı arttıkça, hücrelerin membran yüzeyinden koptuğu gözlenmiştir. Hücrelerin membran yüzeyinden kopması hücresel kuvvetlerin doğru bir şekilde ölçülememesine sebep olmaktadır.

4.2 Trombin ve TGF Beta'nın Hücresel Kuvvetlere Etkisi

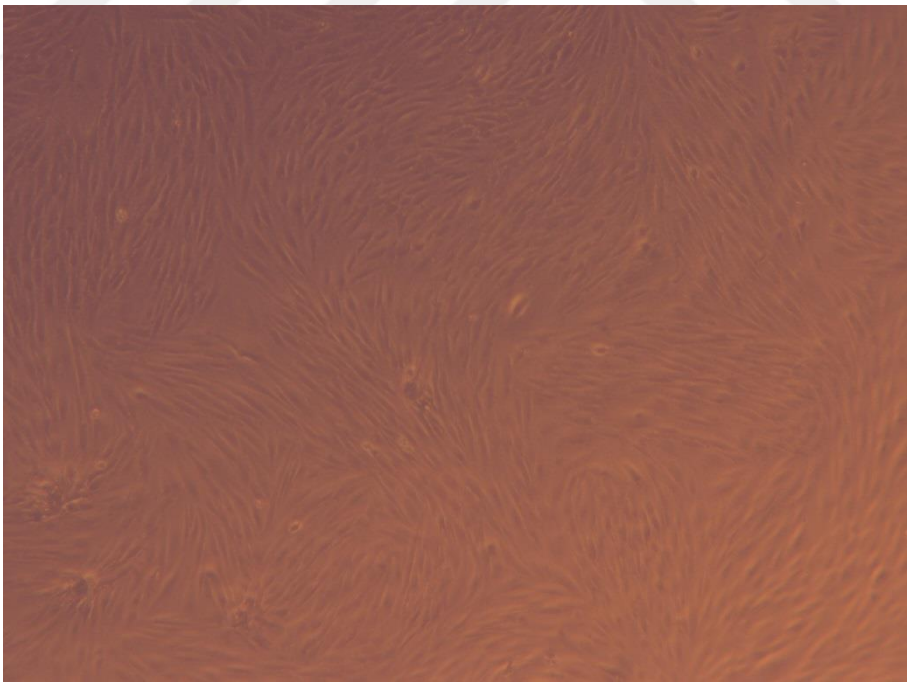
Thrombin, hücrelerdeki birçok görevine ek olarak ekstraselülar matriks proteinlerinin üretimini ve sentezini başlatmaktadır. Ayrıca bağlayıcı dokunun yeniden modellenmesi proseslerini de etkilemektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda thrombinin doku yenilenme sürecinde önemli bir rolü olduğu bulunmuştur. Rachel C. Chambers, Patricia Leoni'in yaptıkları araştırma sonucunda thrombinin fibroblast CTGF ekspresyonunu potansiyel indükleyicisi olduğunu deneyleri ile göstermişlerdir. Thrombinin de CTGF ekspresyonunu arttırdığı iyi bilinen TGF beta gibi bir etkisi bulunmasına rağmen thrombin ve TGF betanın bu ekspresyonu arttırması moleküler düzeylerde farklılık göstermektedir [52]. Ayrıca thrombinin, endotel hücrelerde ve stres fiberlerinde tansiyonu arttıran bir faktördür olduğu bilinmektedir. Thrombin hücre kontraktil tansiyonunu arttıran bir biyolojik faktör olduğu için trombin Eylem K.D. ve ark.'nın yaptığı çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır [3].

TGF beta yolağı deri bağ dokusunda ekstrasellülar matriks üretiminin ana düzenleyicisidir. Kollajen biyosentezine katkıda bulunan bir sitokinindir ve kollajen biyosentezi de yaşlanma ile ilişkili kırışık formasyonunda rol oynayan ana düzenleyicidir. TGF beta yolağının bozulması kollajen üretiminin redüklenmesine sebep olur. Kollajen redüklenmesi yaşlanan insan derisinde gözlenmektedir. TGF

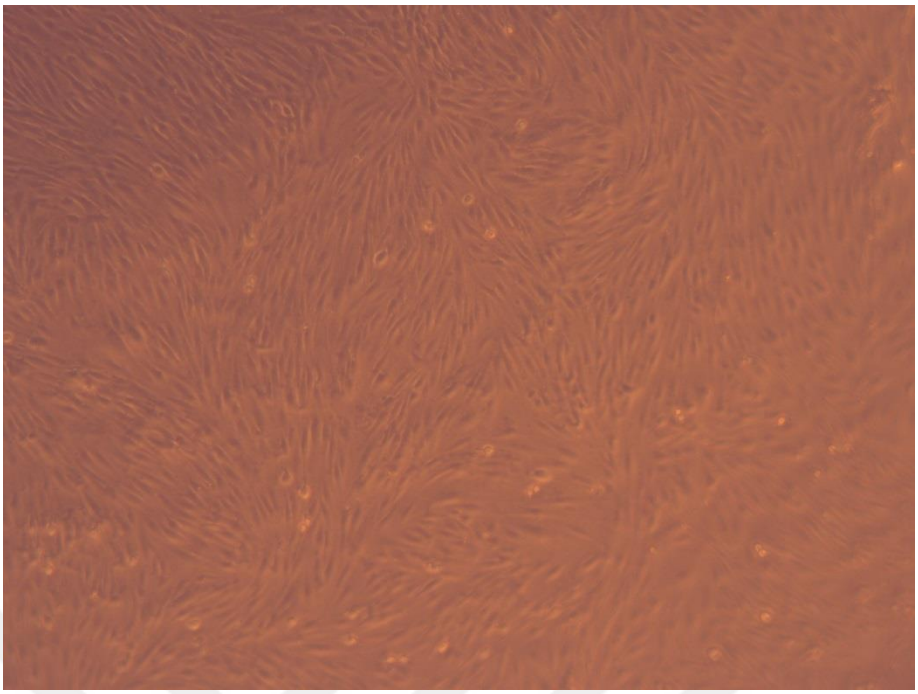
beta yolağının bozulması düşen gen ekspresyonu sayesinde tip II TGF beta reseptörünün düşen regülasyonu sebebiyle gerçekleşmektedir.



Şekil 31. TGF Beta'nın yaşlanma sürecine etki mekanizması



Şekil 32. 29 yaş hücrelerinin cell drum üzerindeki görüntüsü (FH Aachen, University of Applied Sciences, Biyofizik ve Moleküler Biyoloji Laboratuarı)

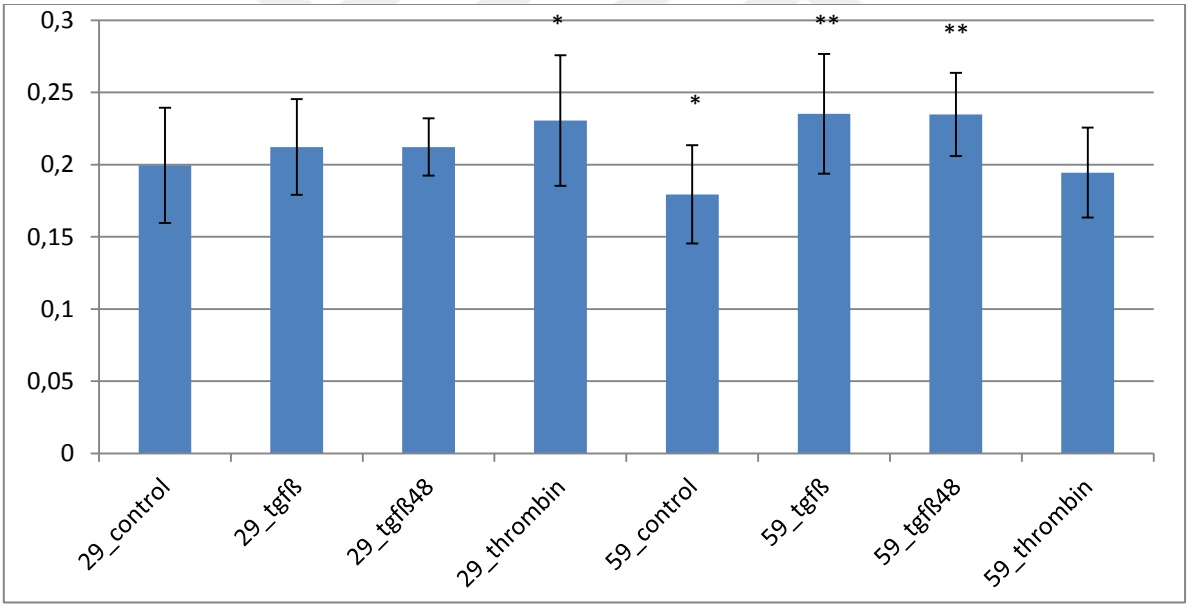


Şekil 33. 59 yaş hücrelerinin cell drum üzerindeki görüntüsü (FH Aachen, University of Applied Sciences, Biyofizik ve Moleküler Biyoloji Laboratuarı)

Thrombinin hücre kuvvetlerini arttırıcı etkisi bilindiği için TGF beta thrombin ile karşılaştıralarak hücre kuvvetlerine etkisi incelenmiştir. Ölçümler 4 farklı set olarak yapılmıştır. 4 farklı sette de aynı thrombin konstanrasyonu (1U/mL) ve TGF beta (20ng/mL) konsantrasyonu kullanışmıştır. TGF beta için belirlenen inkübasyon süreleri 24 saat ve 48 saattir. Deneyler sonucunda aşağıdaki tabloda gösterilen sonuç elde edilmiştir ve sonuçlar Microsoft Excel programı kullanılarak aşağıda kullanılan grafiğe yansıtılmıştır.

Tablo 12. 29 ve 59 yaş arasındaki hücresel kuvvetlerin ölçümü sonucunda elde edilen bulgular

Hücreler ve Substanslar	Ortalama	Standart Sapma	N
29_yaş	0,19953788	0,03993042	26
29_tgfß	0,21227421	0,0331026	26
29_tgfß48	0,2122162	0,01983151	26
29_thrombin	0,23060619	0,04521055	26
59_yaş	0,17940016	0,0339895	26
59_tgfß	0,23531178	0,04144199	26
59_tgfß48	0,23476179	0,02874848	26
59_thrombin	0,19453862	0,03117261	26



Şekil 34. 29 Yaş ve 59 Yaş arasındaki hücresel kuvvetlerin trombin ve TGF beta uygulamaları(24 sa ve 48 sa)ile değişiminin kendi aralarında ve kontrol grubuyla karşılaştırılması

Alınan sonuçlar *Wilcoxon* testine göre değerlendirilip p değerleri arasındaki farklar bulunmuştur.

	29_yas	29_tgfß	29_tgfß48	29_thrombin	59_yas	59_tgfß	59_tgfß48	59_thrombin
29_yas	x	0,1182	0,1662	0,02723	0,05652	0,009422	0,00417	0,6193
29_tgfß	x	x	0,7208	0,1364	0,002758	x	x	x
29_tgfß48	x	x	x	0,2136	0,004001	x	x	x
29_thrombin	x	x	x	x	0,0009156	x	x	x
59_yas	x	x	x	x	x	0,00005595	0,00002561	0,1525
59_tgfß	x	x	x	x	x	x	0,6106	0,006911
59_tgfß48	x	x	x	x	x	x	x	0,0009375
59_thrombin	x	x	x	x	x	x	x	x

Şekil 35. Wilcoxon Testi sonucunda elde edilen p değerleri

29 yaş (genç) kontrol grubu ile 59 yaş (yaşlı) kontrol grubu değerlendirildiğinde genç hücrelerin yaşlı hücrelere karşı daha yüksek hücre kuvveti gösterdiği gözlenmiştir. İki grup sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. (p=0,05652)

29 yaş kontrol grubu ile TGF beta (24 sa) ile inkübe edilen 29 yaş grubu sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. (p=0, 1182)

29 yaş kontrol grubu ile TGF beta (48 sa) ile inkübe edilen 29 yaş grubu sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. (p=0, 1662)

29 yaş kontrol grubu ile thrombin uygulanan 29 yaş grubu sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. (p=0,02723) 1U/mL thrombinin hücresel kuvvetleri önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir.

59 yaş kontrol grubu ile TGF beta (24 sa) ile inkübe edilen 59 yaş grubu sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. (p=0,00005) 20 ng/mL TGF beta'nın 24 saat inkübasyon sonucu hücresel kuvvetleri önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir.

59 yaş kontrol grubu ile TGF beta (48 sa) ile inkübe edilen 59 yaş grubu sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. (p=0,000026) 20 ng/mL TGF beta'nın 48 saat inkübasyon sonucu hücresel kuvvetleri önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir.
TGF beta (24 sa) ile inkübe edilen 59 yaş grubu ve TGF beta (48 sa) ile inkübe edilen 59 yaş grubu sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. (p=0, 6106)

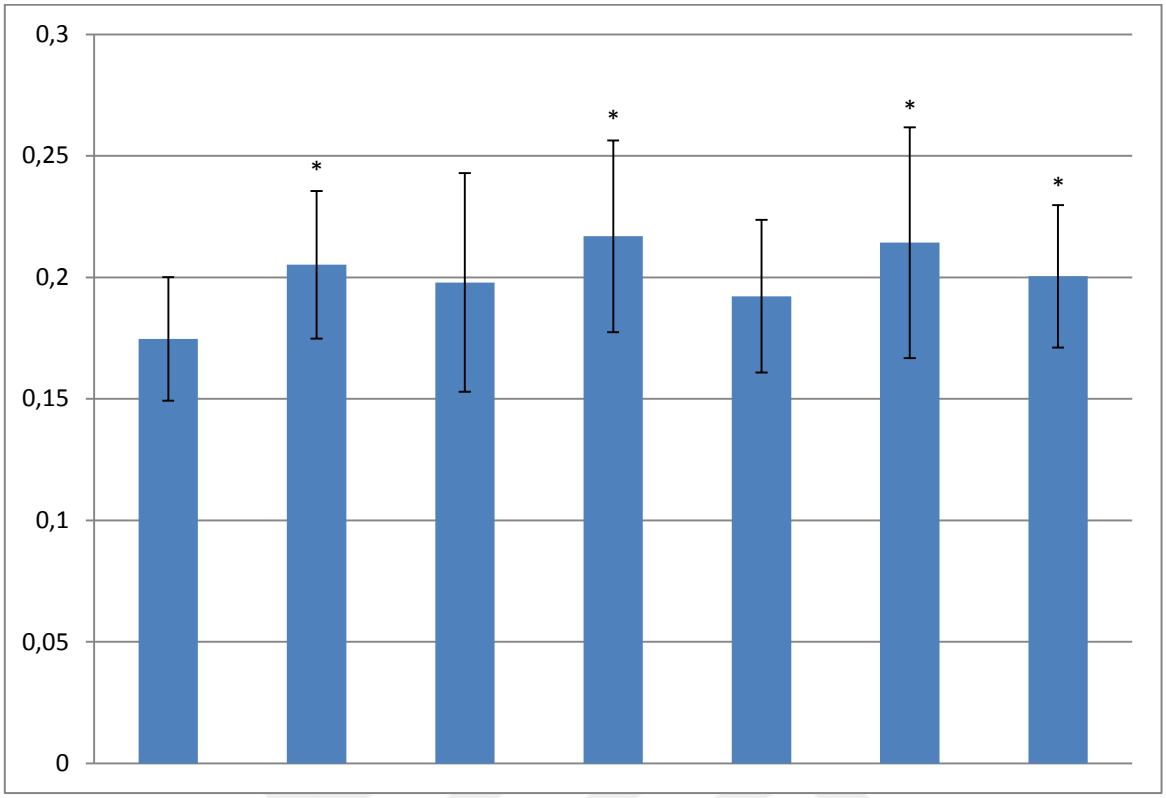
59 yaş kontrol grubu ile thrombin uygulanan 59 yaş grubu sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.(p=0,1525) 1U/mL thrombinin yaşlı hücrelerin hücresel kuvvetlerinde önemli bir değişime sebep olmadığı gözlenmiştir.

4.3 İçeriklerin Hücresel Kuvvetlere Etkisi

Thrombin ve TGF β denemeleri sonucunda, TGF β'nın yaşlı hücre hatlarında thrombin gibi hücresel kuvvetleri arttırıcı etkisi olduğu önceki deney çalışmalarında gözlenmiştir. Buna paralel olarak içerik denemelerinde TGF β referans madde olarak alınmıştır. İçeriklerin hücresel kuvvetlere olan etkisi TGF β etkisi ile kıyaslanmıştır. Önceki deneylerde TGF β'nin hücre kuvvetlerine etkisi önce 24 saat sonra 48 saat sonunda ölçülmüş ve bu iki değer arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu yüzden içereiklerin hücresel kuvvetlere etkisinin TGF β'nın etkisi ile karşılaştırılması çalışmasında TGF β'nın ve tüm içeriklerin etki süresi 24 saat olarak alınmıştır.

Tablo 13. 59, 73 Ve 77 Yaşlarından Oluşan Hücrelere TGF beta ve Beş Farklı İçerikle İnkübasyonu Sonucu Hücresel Kuvvetlerin Ölçümü Sonuçları Ve Standart Sapma Değerleri

İçerik	Ortalama	Standart Sapma	n
Kontrol	0,17466287	0,02546111	16
Tgf_β	0,20516619	0,03037278	18
A-1	0,19790308	0,04501215	13
A-2	0,21689712	0,03949488	17
A-3	0,19220754	0,03143776	13
A-4	0,21426707	0,04746415	14
A-5	0,20043219	0,02928914	15



Şekil 36. 59, 73 Ve 77 Yaşlarından Oluşan Beş Farklı İçerikle ve TGF beta ile İnkübasyonu Sonucunda Hücresel Kuvvet Değişimlerinin Karşılaştırılması

	Kontrol	TGF Beta	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5
Kontrol	x	0,01	0,252	0,05	0,196	0,043	0,02
TGF Beta	x	x	0,643	0,45	0,51	0,747	0,836
A-1	x	x	x	0,319	0,977	0,463	0,864
A-2	x	x	x	x	0,106	1	0,345
A-3	x	x	x	x	x	0,289	0,421
A-4	x	x	x	x	x	x	0,381
A-5	x	x	x	x	x	x	x

Şekil 37. Wilcoxon Testi sonucunda elde edilen p değerleri

Kontrol grubu ile TGF beta ile 24 saat inkübe edilen grubun sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur.(p=0,01) 20 ng/mL TGF beta'nın 24 saat inkübasyon sonucu hücresel kuvvetleri arttırdığı gözlenmiştir.

Kontrol grubu ile A-1 içeriği ile 24 saat inkübe edilen grubun sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.(p=0,252)

Kontrol grubu ile A-2 içeriği ile 24 saat inkübe edilen grubun sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur.(p=0,05)

Kontrol grubu ile A-3 içeriği ile 24 saat inkübe edilen grubun sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.(p=0,196)

Kontrol grubu ile A-4 içeriği ile 24 saat inkübe edilen grubun sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur.(p=0,043)

Kontrol grubu ile A-5 içeriği ile 24 saat inkübe edilen grubun sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur.(p=0,02)

4.4 Gerçek Zamanlı PCR

4.4.1 RNA Konsantrasyonu Ölçüm Sonuçları

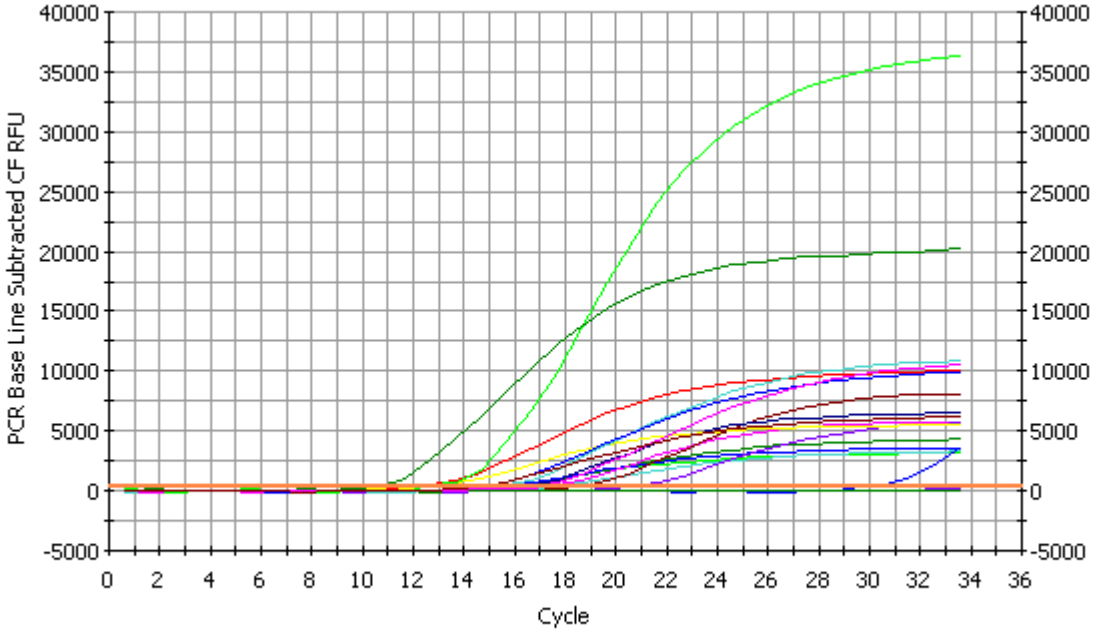
Spektrofotometre'de ölçülen RNA solüsyonları 1:10 oranında dilüsyon olduğu için konsantrasyonlar 10 ile çarpılarak elde edilmiştir.

Tablo 14. RNA Konsantrasyon Ölçüm Sonuçları

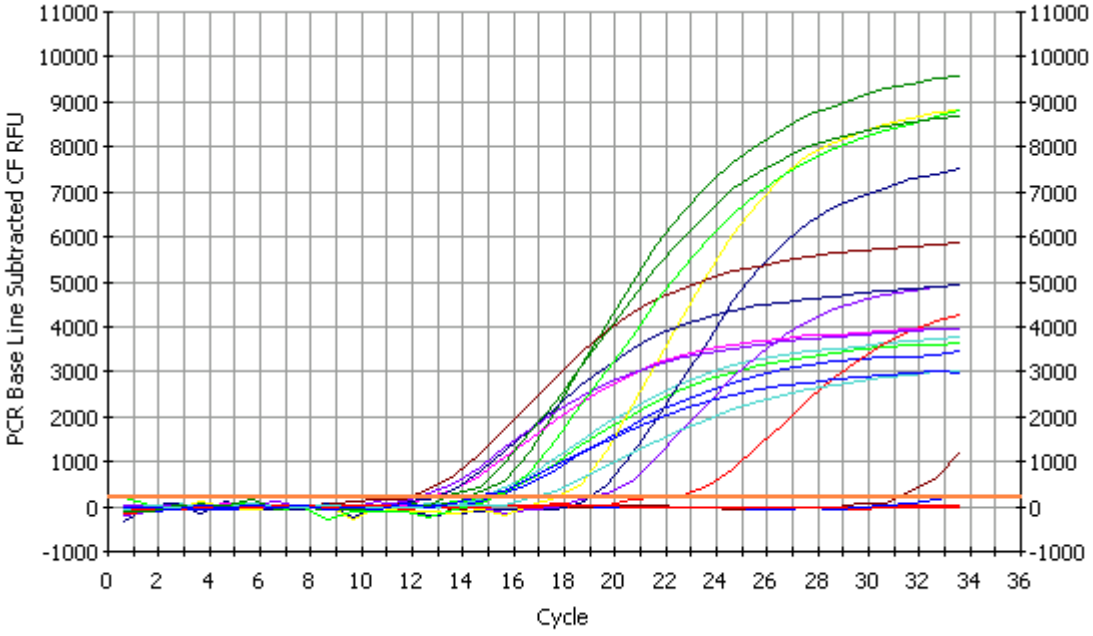
Hücre Hattı	Konsantrasyon	260/280	260/230
18 Yaş	830 ug/ml	2.00	2.30
29 Yaş	770 ug/ml	1.89	2.08
59 Yaş	280 ug/ml	1.90	1.99
73 Yaş	340 ug/ml	1.88	2.05

4.4.2 Gerçek Zamanlı PCR Sonucu Elde Edilen Ct Değerleri

Gerçek zamanlı PCR aynı reaksiyon basamakları ile dublike olarak gerçekleştirilmiştir. Alınan grafikler aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 38. PCR Amplifikasyon / Döngü Grafiği (ilk deneme)



Şekil 39. PCR Amplifikasyon / Döngü Grafiği (ikinci Deneme)

Tablo 15. Gerçek zamanlı PCR sonucu alınan Ct değerlerinin ortalaması ve standart sapmalarının gösterilmesi

	ACTB CT Ort ±SD	**MMP1 CT Ort ±SD**	**COL1A1 CT Ort ±SD**	**CTFG CT Ort ±SD**
Genç Hücreler Grubu (18 yaş ve 26 yaş)	15,325 ± 1,00 (n=2)	18,575 ± 0,80 (n=2)	12,5 ± 0,46 (n=2)	14,675 ± 0,87 (n=2)
Yaşlı Hücreler Grubu (59 yaş ve 73 yaş)	15,8 ± 1,2 (n=2)	19,2 ± 2,61 (n=2)	12,075 ± 0,95 (n=2)	15,8 ± 1,32 (n=2)

Yaşlı ve genç hücrelerde ACTB geni Ct değerleri arasında istatiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır (p=0.4125).

Yaşlı ve genç hücrelerde MMP1 geni Ct değerleri arasında istatiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır (p= 0.6271).

Yaşlı ve genç hücrelerde COL1A1 geni Ct değerleri arasında istatiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır (p= 0.4530).

Yaşlı ve genç hücrelerde CTFG geni Ct değerleri arasında istatiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır (p= 0.4061).

Ct değerlerinin yaşlar arasında değerlendirilmesi sırasında, 2-ΔΔCt methodu kullanılmıştır. Bu method, gerçek zamanlı PCR sonuçlarının göreceli olarak değerlendirilmesi sırasında sık kullanılır. Bu methoda gör, iki farklı grup arasında aynı genin değerlendirmesi yapılırken; önce araştırılan genin Ct değeri referans olarak alınan genin Ct değeri ile normalize edilir. İki gruba da bu normalizasyon işlemi uygulanır ve ΔCt değerleri bulunur. İki grup arasındaki gen ifadeleri farkı ise bu bulunan ΔCt değerlerinin farkı alınarak ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ işlemi uygulanarak bulunur.

Tablo 16. Gerçek zamanlı PCR sonucunda MMP1, COL1A1 ve CTFG genlerinin Ct değerlerinin ACTB Ct değeri ile normalizasyonu

	ACTB Ct	**MMP1 ΔCt**	**COL1A1 ΔCt**	**CTFG ΔCt**
Genç Hücreler Grubu (18 yaş ve 26 yaş)	15,325 (n=2)	3,25 (n=2)	-2,825 (n=2)	-0,65 (n=2)
Yaşlı Hücreler Grubu (59 yaş ve 73 yaş)	15,8 (n=2)	3,475 (n=2)	-3,725 (n=2)	0 (n=2)

Tablo 17. Genç ve yaşlı hücreler arasındaki ΔCt farklarından elde edilen ΔΔCt değerleri

	MMP1 ΔΔCt	**COL1A1 ΔΔCt**	**CTFG ΔΔCt**
ΔCt (yaşlı hücre) – ΔCt (genç hücre)	3,25	-2,825	-0,65

Tablo 18. Genç ve Yaşlı Hücreler Arasındaki Ekspresyon Değişimi farklarının Saptanması

	MMP1 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	**COL1A1** $2^{-\Delta\Delta Ct}$	**CTFG** $2^{-\Delta\Delta Ct}$
Genç Ve Yaşlı Hücreler Arasında Ekspresyon Değişimi Farkı	-1,17	2,9	-1,53

Alınan sonuçlara göre genç ve yaşlı hücrelerde MMP1 gen ifadelerinin arasında 1,17 bir kat değişimi olduğu bulunmuştur. Bu yaşlı hücrelerde MMP1 ifadesinin, genç hücrelere göre 1,17 kat azaldığını gösterir fakat bu anlamlı bir azalma değildir.

COL1A1 gen ifadelerinin arasında 2,9 oranında bir kat değişimi gözlenmiştir.Bu yaşlı hücrelerde COL1A1 ifadesinin, genç hücrelere göre 2,9 kat arttığını gösterir. CTFG gen ifadelerinin arasında 1,53 oranında bir kat değişimi gözlenmiştir.Bu yaşlı hücrelerde CTFG ifadesinin, genç hücrelere göre 1,53 azaldığını gösterir fakat bu anlamlı bir azalma değildir.

5. TARTIŞMA

Yaşlanmanın artması ile hücreler intrensek ve ekstrensek olarak yaşlanma sürecine girmektedir. Yaşlanmaya başlayan hücrelerde, zamanla hücresel ve dış etkenler sebebiyle kolajen fiberlerinde fragmantasyon gözlenmektedir. Hücrelerde kollajen miktarı zamanla %70 oranına kadar azalmaktadır ve bununla beraber kollajenaz (MMP1) gen ifadesi de 4 kata kadar artmaktadır. Yaşlanmakta olan hücrelerde, bu kolajen fiberlerindeki artış mekanik tansiyonun azalmasına sebep olur. [55]. Bu sebeple, yaşlı dermal fibroblast hücrelerinde, genç dermal fibroblast hücrelerine göre hücresel kuvvetlerin daha az olması beklenmektedir. Bu çalışmada gerçekleştirilen hücre mekanik kuvvet ölçümlerinden alınan sonuçlara göre de, yaşlı dermal fibroblast hücresel kuvvetleri ve genç dermal fibroblast hücresel kuvvetleri arasında genç dermal fibroblast hücrelerinde hücresel kuvvetlerin daha fazla olmasına ilişkin anlamlı bir sonuç bulunmuştur ($p=0,05652$). Bu sonuç, kurduğumuz hipotez ile alınan sonuçların paralel olduğunu göstermektedir.

Daha önce de söylediğimiz gibi, yaşlanmakta olan hücrelerde tip I prokollagen üretiminin redüklendiği gözlenmektedir. Dermal kollajen miktarındaki bu kayıp, yaşlı hücrelerde doku kırılganlığının artmasına ve yara iyileşme mekanizmasının zarar görmesine sebep olmaktadır. Artan yaşla beraber, deri dokusunda kollajen biyosentezindeki bu azalışının altında yatan temel mekanizma, tam olarak bilinmemektedir. TGF ß ise fibroblastlarda otokrin sinyal aktivatörüdür. Ayrıca deri dokusunda ekstrasellülar matriks proteinlerinin ve en alt tabakadaki fibronektin laminin ve kollajen IV/VII gibi membran komponentlerinin üretimini arttırmaktadır [56]. Thrombin hücrelerdeki birçok görevine ek olarak, ekstraselülar matriks proteinlerinin üretimini ve sentezini başlatmaktadır. Ayrıca, bağlayıcı dokunun yeniden modellenmesi proseslerini de etkilemektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, thrombinin doku yenilenme sürecinde önemli bir rolü olduğu bulunmuştur. Rachel C. Chambers, Patricia Leoni'in yaptıkları araştırma sonucunda thrombinin fibroblast CTGF ekspresyonunu potansiyel indükleyicisi olduğunu deneyleri ile göstermişlerdir. Thrombin de CTGF ekspresyonunu arttırdığı iyi bilinen TGF beta gibi bir etkisi bulunmasına rağmen thrombin ve TGF betanın bu ekspresyonu arttırması moleküler düzeylerde farklılık göstermektedir [52]

Yapılan hücresel kuvvet ölçüm sonuçlarına göre hücrelere 1 dakika ve 3 dakika boyunca uygulanan 1 U/ ml thrombinin genç dermal hücrelerde yaşlı dermal hücrelere göre hücresel kuvvetleri önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir. (p=0,02723) Thrombin etkisi genç hücrelerde daha belirgin olmasının nedeni genç hücrelerin ECM ve birbiriyle olan kontaktlarının daha güçlü olması olabilir. Yaşlı dermal hücrelerde ise 1 dakika ve 3 dakika boyunca uygulanan 1 U/ ml thrombin uygulamasının hücresel kuvvetlerde önemli bir değişime sebep olmadığı gözlenmiştir. (p=0,1525) Yaşlı hücrelerde genç hücrelere göre, ECM ve birbiriyle olan kontaktlarının daha zayıf olmasının sebebi olabilir. arasındaDeri yaşlanması ile ilişkili olan kırışmanın ana düzenyicisi kollajenin biyosentezine katkısı olan TGF beta'nın thrombin gibi hücrelerde mekanik kuvvetleri arttırıcı bir etkisi olduğu hipotezinde, HP Bioforce sistemi kullanılarak yapılan hücre kuvvetleri ölçümünde alınan sonuçlarda yaşlı hücrelerde TGF beta'nın hücre kuvvetlerini daha fazla arttırdığı gözlenmiştir (p=0,00005). Genç hücrelerde ise TGF beta uygulamasının hücresel kuvvetlerde önemli bir değişime sebep olmadığı gözlenmiştir. (p=0, 1182) Bu sonuca göre, TGF beta uygulamasının, genç hücrelerde hücre kuvvetlerini azalttığını söyleyememekle beraber arttırılan deneme ölçümleriyle, genç hücrelerde de TGF beta'nın hücresel kuvvetleri anlamlı ölçüde arttırabileceği ihtimalini göz önünde bulundurabiliriz.

Hücresel kuvvetlerin yaşlı dermal fibroblast hücrelerinde ölçümü, firmadan gelen beş farklı madde uygulaması ile de yapılmıştır. Fakat bu maddelerin içerikleri bilinmediği için değerlendirilme yapılması mümkün değildir. İleriki yıllarda bu maddelerin içeriklerin ne olduğu öğrenildiği zaman bir yorum yapmak mümkün olacaktır. Fakat çalışmanın bu kısmında da yaşlı dermal hücre kontrol grubu ile TGF beta ile 24 saat inkübe edilen yaşlı dermal hücre sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (p=0,01). 20 ng/mL TGF beta'nın 24 saat inkübasyon sonucu hücresel kuvvetleri arttırdığı gözlenmiştir.

Yapılan gerçek zamanlı PCR deneylerinde, sonuçlar kısmında da görüldüğü gibi anlamlı sonuçlara ulaşılamamıştır. Tip I prokollajen dermal ECM'nin ana komponentidir ve prokollajen mRNA seviyeleri de yaşlı dermal hücrelerde daha azalmıştır [57]. İnsan dermal hücrelerinde daha önce de açıkladığımız gibi MMP1 kollajen fragmantasyonundan sorumludur ve UV ışığı tarafından üretimi indüklenmektedir. Artan MMP1 seviyesi artan yaşla ilişkilidir. 30 yaş dermal hücreleri

ile 80 yaş dermal hücreleri karşılaştırıldığında artan MMP1 seviyelerine rastlanmaktadır [55]. Bu bilgiler ışığında kurduğumuz hipotez, MMP1 gen ifadelerinin yaşlı hücrelerde genç hücrelere göre artmış olmasının gözlenmesidir. Fakat deney sonuçlarında MMP1 geninde genç hücrelerinde Ct değeri ortalama (18,575 ± 0,80) ve yaşlı hücrelerin Ct değeri ortalama (19,2 ± 2,61) değerleri arasında Ct değerlerinin farklılığı bakımından anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (p= 0.6271). Buna ek olarak 2-ΔΔCt metodu ile gen ifadelerinin göreceli olarak değerlendirilmesi sonucunda yaşlı hücrelerde genç hücrelere göre MMP1 gen ifadesinin göre 1,17 kat azaldığı bulunmuştur. Bu sonuç, MMP1 geni ile ilgili kurulan hipotez ile ters orantılıdır ve bu ters orantıyı destekleyecek güçte bir sonuç değildir.

COL1A1 geni de dermal fibroblast hücrelerinde kollajen tip 1 molekülünün pro-alfa 1 zincirini kodlamaktadır. Bu sebeple MMP1 aktivitesi ile ters orantılı olarak COL1A1 geninin yaşlı dermal fibroblast hücrelerde gençlere göre daha az ifade edilmesi hipotezi kurulmuştur. Alınan sonuçlar doğrultusunda COL1A1 MMP1 geninde genç hücrelerinde Ct değeri ortalama (12,5 ± 0,46) ve yaşlı hücrelerin Ct değeri ortalama (12,075 ± 0,95) değerleri arasında Ct değerlerinin farklılığı bakımından anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (p= 0.4530). Buna ek olarak 2-ΔΔCt metodu ile gen ifadelerinin göreceli olarak değerlendirilmesi sonucunda yaşlı hücrelerde genç hücrelere göre COL1A1 gen ifadesinin 2,9 oranında arttığı bulunmuştur. Bu sonuç, kurulan hipotezle tamamen ters orantılı olarak gözlenen bir sonuç olmuştur.

TaiHao Quan ve arkadaşları yaptığı in vivo ortamda yaptığı araştırmalar sonucunda, TGFß, CTFG ve tip I prokollagenin insan deri dokusundaki fibroblastlarda yaşla beraber önemli ölçüde azaldığını rapor etmişlerdir. CTFG mRNA seviyesinin yaşlı dermiste genç dermise göre %50 oranında redüklendiği deney sonuçlarında gösterilmiştir. CTFG mRNA seviyesine benzer şekilde CTFG protein ekspresyonu da yaşlı dermiste genç dermise göre redüklenmiştir [57]. Bu çalışma göz önünde bulundurularak CTFG gen ifadesinin yaşlı hücrelerde genç hücrelere göre daha az olacağı hipotezi kurulmuştur. Yapılan gen ifadesi deney sonuçlarında CTFG geni ifadesinde genç hücrelerde Ct değeri ortalama (14,675 ± 0,87) ve yaşlı hücrelerde Ct değeri ortalama (15,8 ± 1,32) değerleri arasında Ct değerlerinin farklılığı bakımından anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (p=0.4061). Buna ek olarak 2-

ΔΔCt metodu ile gen ifadelerinin göreceli olarak değerlendirilmesi sonucunda yaşlı hücrelerde genç hücrelere göre CTFG gen ifadesinin 1,53 oranında azaldığı bulunmuştur. Bu CTFG geni ile ilgili kurulan hipotezi destekleyecek güçte bir sonuç değildir.

Önceden de bahsedildiği gibi dermal fibroblastların *in vitro* ortamlardaki karakteristik özellikleri de türe, yaşa, cinsiyete, doku orjininin ya da derinin tipi ve gelişimsel durumuna, kültür içindeki büyüme faktörlerinin uygunluğu ve hücre yoğunluğuna bağlı olarak da değişim göstermektedir [19]. Deneylerimizde kullanılan dermal fibroblast hücreleri sadece iki farklı tip genç ve iki farklı tip yaşlı dermal fibroblast hücresi olduğu için, gerçek zamanlı PCR sonuçlarında anlamlı sonuçların çıkmamasının sebebi bu olabilir. Daha fazla fibroblast hücresi ile çalışmak sonuçların daha anlamlı çıkmasını sağlayabilir. Buna ek olarak yaşlı hücrelerin yaşlanma sürecinde hangi dış etkilere maruz kaldığı bilinmemektedir. Daha öncede söylendiği gibi MMP1 geni UV ışınları gibi dış etkenlerden de etkilenerek ifadesini değiştirmektedir. Elimizdeki yaşlı hücrelerin elde edidiği donorlerin yaşlanma sürecinde ne derecede dış etkenlere maruz kaldığını kestirmek güçtür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın birinci basamağında HP Bioforce sistemi ile gerçekleştirilen hücresel kuvvet ölçümleri, iki boyutlu hücre kültürü kullanılarak yapılmıştır. Hücrelerin kollajen jel ve buna benzer yapılarda üç boyutlu olarak kültüre edilmesi, hücrelerin in vivo mikro çevrelerine benzer ortamda büyümesini ve hücresel özelliklerini daha düzgün bir şekilde ifade etmesini sağlamaktadır. Üç boyutlu hücre kültürleri, hücre biyolojisinde (tümör, hücre migrasyonu, gen ekspresyonu çalışmalarında) çeşitli ilaç testleri çalışmalarında kullanılmaktadır. Hücre kuvvetlerinin ölçümü çalışmalarında, HP Bioforce sisteminde üç boyutlu ortamda kültüre edilen hücrelerin kullanılması, alınan sonuçların geliştirilmesini sağlayabilir.

Hücre kültürü yönteminin değiştirilmesine ek olarak, hücresel kuvvetlerin ölçümü ile ilgili ilerleyen çalışmalarda, sistemdeki basınç farklılığı ve membran eğrilmesinin saptanması HP Bioforce sistemine farklı sensörler eklenerek gerçekleştirilebilir. Sensör değişimi sistemin hassasiyetini ve güvenilirliğini arttırabilir. Sensör değişimi için FH Aachen, University of Applied Sciences, Biyofizik ve Moleküler Biyoloji Laboratuarı'nda kullanılmakta olan patentli ürün olan '' Cell Tissue Analyser '' cihazındaki lazer triangülasyon veya kapasitif sensör kullanılabilir.

Gerçek zamanlı PCR denemeleri sadece 4 farklı donörden alınan dermal fibroblast hücrelerinin kültüre edilmesi sonucu elde edilen hücreler ile gerçekleştirilmiştir. Bu durumda deneyin evreni sadece 4 kişiden oluşmaktadır. Karşılaştırma yapılan gruplarda ise, kişi sayısı her grupta iki kişidir. Çalışmaların daha büyük bir evrende yapılması, sonuçların daha anlamlı çıkmasını sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca gerçek zamanlı PCR tekniğinde kullanılan referans genlerin sayısı arttırılması PCR sonuçlarının güvenilirliğini arttırabilir.

7. KAYNAKLAR

[1] G. J. Fisher, T. Quan, T. Purohit, Y. Shao, M. K. Cho, T. He, J. Varani, S. Kang ve J. J. Voorhees, « Collagen Fragmentation Promotes Oxidative Stress and Elevates Matrix Metalloproteinase-1 in Fibroblasts in Aged Human Skin.,» *The American Journey of Pathology,* 2009.

[2] I. Digel, E. Kurulgan, P. Linder, P. Kayser, D. Porst, G. J. Braem, K. Zerlin, G. M. Artmann ve A. T. Artmann., «Decrease in extracellular collagen crosslinking after NMR magnetic field application in skin fibroblasts.,» *Med Bio Eng Comput.,* 3. January 2007.

[3] E. K. Demirci, T. Demirci ve P. Linder, «rhAPC reduces the endothelial cell permeability via a decrease of contractile,» *Journal of Bioscience and Bioengineering,* cilt 114 , no. 2, p. 212e219, 2012.

[4] C. M. Wilhelms, «HPBioforce Cell Force Measurements and Development of a SOP,» *Master Tezi,* pp. 1-81, 2011.

[5] K.-A. Hwang, B.-R. Yi ve K.-C. Choi, «Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging,» *Laboratory Animal Research,* 2011.

[6] D. J. Gawkrodger, Dermatology, Philadelphia: Elvesier Science , 2003.

[7] S. MacNeil, "Progress and opportunities for tissue-engineered skin," *Nature,* vol. 445, pp. 874-880, 2007.

[8] F. Groebe, M. Holeiter, M. Hampel, S. Hinderer and K. Schenke-Layland, "Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications," *Advanced Drug Delivery Reviews,* vol. 128, p. 352–366, 2011.

[9] S. Jain, Dermatology, New York: Springer, 2011.

[10] M. F. Denning, «Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms,» *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,* cilt 36, p. 1141–1146, 2004.

[11] C. Hwa, E. A. Bauer ve D. E. Cohen, «Skin biology,» *Dermatologic Therapy,* cilt 24, p. 464–470, 2011.

[12] D. H. Chu, «Overview of Biology, Development, And Structure Of Skin,» %1 içinde *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, United States of America,

McGraw-Hill Education, 2012.

[13] M. Goßmann, «Optimisation of The Cellular Tension Analyser from the Silicone Membrane Model to a High-Throughput System,» *Diploma Thesis,* 2010.

[14] A. C. Williams, Transdermal and topical drug delivery, London: Pharmaceutical Press , 2003.

[15] R. Kalluri ve M. Zeisberg, «Fibroblasts in Cancer,» *Nature Publishing Group,* 2006.

[16] J. M. Sorrell ve A. I. Caplan, «Fibroblast heterogeneity: more than skin deep,» *Journal of Cell Science,* cilt 117, pp. 667-675, 2004.

[17] J. H.-C. Wang, B. P. Thampatty, J.-S. Lin ve H.-J. Im, «Mechanoregulation of gene expression in fibroblasts,» *Gene,* cilt 391, pp. 1-15, 2007.

[18] H. P. Rodemann ve H.-O. Rennekampff, «Functional Diversity of Fibroblasts,» %1 içinde *Tumor-Associated Fibroblasts and their Matrix*, London / Newyork, Springer, 2011, pp. 23-37.

[19] C. S. Eleftheriou, N. B. Trakas ve S. J. Tzartos, «Cellular ageing related proteins secreted by human fibroblasts,» *Mutation Research,* cilt 256, pp. 127-138, 1991.

[20] P. Lu, K. Takai, V. M. Weaver ve a. Z. Werb2, «ExtracellularMatrix Degradation and Remodeling,» *Cold Spring Harb Perspect Biology,* pp. 1-24, 2011.

[21] J. A. Davies, «Extracellular Matrix,» %1 içinde *Encyclopedia Of Life Sciences*, Wiley, 2011, pp. 1-7.

[22] E. C. Naylora, R. E. Watson ve M. J. Sherratt, «Molecular aspects of skin ageing,» *Maturitas,* cilt 69, p. 249– 256, 2011.

[23] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts ve P. Walter, Molecular Biology of The Cell, cilt 4, New York : Garland Science , 2002.

[24] R. E. H. Geoffey M. Cooper, The Cell: A Molecular Approach, cilt Third Edition , Boston: İzmir Tıp Kitapevi, 2006.

[25] J. Salbach, T. D. Rachner, M. Rauner, U. Hempel, U. Anderegg, S. Franz ve J.-C. Simon, «Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone,» *J Mol Med,* cilt 90, p. 625–635, 2012.

[26] C. M. Kraning-Rush, S. P. Carey, J. P. Califano ve B. N. Smith, «The role of the cytoskeleton in cellular force generation in 2D and 3D environments,» *Phys Biol.,*

p. 1, 2011.

[27] I. DE, «Mechanical control of tissue growth: function follows form,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* pp. 11571-2, 2005.

[28] W. N. &. S. Z, «Long-distance propagation of forces in a cell,» *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* cilt 328(4), pp. 1133-8, 2005.

[29] A. Mogilner ve G. Oster, «Force Generation by Actin Polymerization II: The Elastic Ratchet and Tethered Filaments,» *Biophysical Journa,* cilt Volume 84 , p. 591–1605, 2003 .

[30] «Dayel.com,» [Çevrimiçi]. Available: http://www.dayel.com/research/arp23-complex/.

[31] G. JG, «Bidirectional control of the inner dynamics of focal adhesions promotes cell migration,» *Cell Adh Migr,* cilt 3(2), pp. 185-90.

[32] 1. P. K. J. P. S. Alexandra M Goldyn ve C. Ballestrem, «The Kinetics of Force-Induced Cell Reorganization Depend on Microtubules and Actin,» *Cytoskeleton (Hoboken),* cilt 67(4), p. 241–250, 2010 .

[33] H. Lodish, A. Berk ve S. L. Zipursky, «Cell Motility and Shape II: Microtubules and Intermediate Filaments,» %1 içinde *Molecular Cell Biology, 4th edition*, New York, W. H. Freeman and Company, 2000..

[34] S. Johansson, G. Svineng, K. Wennerberg ve A. Armulik, «Fibronectin-Integrin Interactions,» *Frontiers in Bioscience 2,* pp. 126-146, 1997.

[35] D. Güç, «Adezyon molekülleri,» *ANKEM Dergi,* no. 18, pp. 58-163., 2004.

[36] M. A. Farage, K. W. Miller, P. Elsner ve H. I. Maibach, «Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing,» *International Journal of Cosmetic Science, 2008, 30, 87–95,* no. 30, pp. 87-95, 2008.

[37] N.Puizina-Ivic, «Skin Ageing,» *Acta Dermatoven,* cilt 17, pp. 47-54, 2008.

[38] L. Baumann, «Skin ageing and its treatment,» *Journal of Pathology,* no. 211, p. 241–251, 2007.

[39] E. Kohl, J. Steinbauer, †. M. Landthaler ve R.-M. Szeimies, «Skin ageing,» *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology,* no. 25, p. 873–884, 2011.

[40] M. A. Blasco, «Telomere length, stem cells and aging,» *Nature Chemical*

Biology, no. 3, 2007 .

[41] M. I. Zvereva, D. M. Shcherbakova ve O. A. Dontsova, «Telomerase: Structure, Functions, and Activity Regulation,» *Biochemistry (Moscow),* no. 75, pp. 1563-1583, 2010.

[42] E. M. Buckingham ve A. J. Klingelhutz, «The role of telomeres in the ageing of human skin,» *Experimental Dermatology,* no. 20, p. 297–302, 2011.

[43] H. Jiang, Z. Ju ve K. L. Rudolph, «Telomere shortening and ageing,» *Z Gerontol Geriat ,* cilt 40, p. 314–324, 2007.

[44] K. M. A ve T. F, «Yaşlanma Mekanizmaları,» *Ege Journal of Medicine ,* cilt 49(3), pp. 11-17, 2010 .

[45] K. W. M. P. E. a. H. I. M. M. A. Farage, "Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review," *International Journal of Cosmetic Science,* vol. 30, p. 87–95, 2008.

[46] C. G. Galbraith ve M. P. Sheetz, «Forces on Adhesive Contacts Affect Cell Function,» *Current Opinion in Cell Biology,* cilt 10, pp. 566-571, 1998.

[47] J. A. Phillips, C. A. Vacanti ve L. J. Bonassar, «Fibroblasts regulate contractile force independent of MMP activity in 3D-collagen,» *Biochemical and Biophysical Research Communications,* p. 725–732, 2003.

[48] F. H.Silver, L. M.Siperko ve G. P.Seehra, «Mechanobiology of Force Transduction In Dermal Tissue,» *Skin Research and Technology,* cilt 9, pp. 3-23, 2003.

[49] L. Wang ve J. L. a. S. He, «Induction of MMP-9 release from human dermal fibroblasts by thrombin: involvement of JAK/STAT3 signaling pathway in MMP-9 release,» *BioMed Central Cell Biology,* 2007.

[50] D. Kessler, S. Dethlefsen, I. Haase ve M. Plomann, «Fibroblasts in Mechanically Stressed Collagen Lattices Assume a Synthetic Phenotype,» *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,* p. 36575–36585, 2001.

[51] «NCBI,» 1 Jan 2014. [Çevrimiçi]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4312.

[52] R. C. Chambers ve P. Leoni, «Thrombin Is a Potent Inducer of Connective Tissue Growth Factor,» *The Journal Of Biological Chemistry,* cilt 275, p. 35584–

35591, 2000.

[53] Biorad , «Biorad Company,» [Çevrimiçi]. Available: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10024423.pdf. [%1 tarihinde erişilmiştir25 Ağustos 2013].

[54] A. K. H. Velittin GÜRGÜN, «Mikroskobik Sayım Yöntemleri,» *Orlab Net,* pp. 1-2, 2005.

[55] D. sachs, Y. Helfrich ve J. Voorhees, «Molecular Mechanisms in Skin Aging,» *Cosmetic Dermatology,* pp. 291-295, 2010.

[56] *. M. K. a. M. B. Irwin M. Freedberg Marjana Tomic-Canic, «Keratins and the Keratinocyte Activation Cycle,» *The Journal Of Investigative Dermatology,* cilt VOL. 116, 2001.

[57] T. Quan, Y. Shao ve T. He, « Reduced Expression of Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2),» *Journal of Investigative Dermatology,* pp. 1-10, 2009.

[58] J. Calleja-Agius, Y. Muscat-Baron ve M. P. Brincat, «Skin ageing,» *Menopause International,* no. 13, p. 60–64, 2007.

[59] A. S. Dupre, «The roles of silanes as coupling reagents and in deoxygenative alkylations,» *Master Thesis, Graduate Faculty of the Louisiana State Universit,* p. 1, 2003 .

[60] H.-L. Li, Y. Zhu, D. Xu, Y. Wan ve L. Xia, «Vapor-phase silanization of oxidized porous silicon for stabilizing composition and photoluminescence,» *Journal of Applied Physics,* cilt 105, 2009.

8. EKLER

EK 1: Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**etikkurul@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	1164-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Genç ve Yaşlı Deri Fibroblast Hücrelerarası Kuvvetlerinin, HP (High Throughput) Bioforce Sistem ile, Biyofiziksel ve Ultrastrüktürel Düzeyde Değerlendirilmesi ve CTFG, COY1A1, MMP1 Gen İfadelerinin Karşılaştırılması**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Ayşegül (Temiz) Artmann	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2013/37-24**	**Tarih: 10.10.2013**
	Prof.Dr.Ayşegül (Temiz) Artmann'ın sorumlusu olduğu **"Genç ve Yaşlı Deri Fibroblast Hücrelerarası Kuvvetlerinin, HP (High Throughput) Bioforce Sistem ile, Biyofiziksel ve Ultrastrüktürel Düzeyde Değerlendirilmesi ve CTFG, COY1A1, MMP1 Gen İfadelerinin Karşılaştırılması "** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Psikiyatri Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	katılmadı
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	katılmadı
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	katılmadı
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Işıl TEKMEN	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	katılmadı
Doç.Dr.Müge KİRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	

EK 2: ÖZGEÇMİŞ

Gözde DURSUN

TC Kimlik No / Pasaport No:	49564287656
Doğum Yılı:	1987
Yazışma Adresi :	
Telefon :	0 505 362 47 76 / 0049 176 64732649
Faks :	
e-posta :	gzdursun@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TÜRKİYE	EGE ÜNİVERSİTESİ	MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ	BİYOMÜHENDİSLİK		2010

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
FH Aachen	Almanya	Jülich	Biyomedikal Mühendisliği	Öğrenci	Eylül 2012-Şubat 2014
				.	

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı	

Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		**Tamamlanan**	**Devam Eden**
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	**Alındığı Kuruluş**	**Yılı**
☐			

YAYINLARI
SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar
