

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE BLEOMİSİN İLE  
OLUŞTURULMUŞ SKLERODERMA  
MODELİNDE EPİGALLOKATEŞİN 3  
GALLAT'IN FİBROZİS ÜZERİNE  
OLASI KORUYUCU ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

AYŞE KOÇAK

**MOLEKÜLER TIP**

**DOKTORA TEZİ**

**İZMİR-2018**

TEZ KODU: DEU.HSI.-PhD-2011970127

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE BLEOMİSİN İLE  
OLUŞTURULMUŞ SKLERODERMA  
MODELİNDE EPİGALLOKATEŞİN 3  
GALLAT'IN FİBROZİS ÜZERİNE OLASI  
KORUYUCU ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**MOLEKÜLER TIP**

**DOKTORA TEZİ**

**AYŞE KOÇAK**

**Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. GÜL GÜNER AKDOĞAN**

(Bu araştırma, DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2014. KB. SAG. 024 sayı ile desteklenmiştir.)

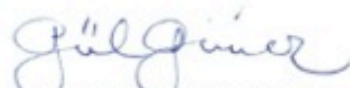
(Bu araştırma, TÜBİTAK, BİDEB, 2211-C Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.-PhD-2011970127

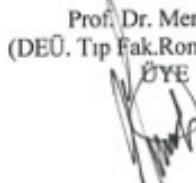
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp doktora programı öğrencisi Ayşe KOÇAK'ın, "Farelerde Bleomisin ile Oluşturulmuş Skleroderma Modelinde Epigallocateşin 3 Gallat'ın Fibrozis Üzerine Olası Koruyucu Etkilerinin Araştırılması" konulu Yüksek Lisans tezini 17.05.2018 tarihinde başarı ile tamamlamıştır.



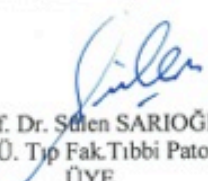
Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL  
(DEÜ SBE Moleküler Tıp AD)  
BAŞKAN



Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN  
(İzmir Ekonomi Üniv Tıp Fak.)  
(DANIŞMAN Oy kullanmıyor)



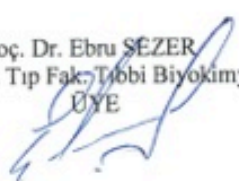
Prof. Dr. Merih BİRLİK  
(DEÜ. Tıp Fak. Romatoloji-İmm.AD)  
ÜYE



Prof. Dr. Selen SARIOĞLU  
(DEÜ. Tıp Fak. Tıbbi Patoloji AD)  
ÜYE



Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI  
(Ankara Y.B.Üni.Tıp Fak.T.Biyokimya AD)  
ÜYE



Doç. Dr. Ebru SEZER  
(Ege.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AD.)  
ÜYE

Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR  
(DEÜ SBE Moleküler Tıp AD)  
YEDEK ÜYE



Dr. Öğr. Üy. Melis Kartal YANDIM  
(İzmir Ekonomi Üniv. Tıp Fak.)  
YEDEK ÜYE

## İÇİNDEKİLER

|                                                                           |      |
|---------------------------------------------------------------------------|------|
| TABLO DİZİNİ .....                                                        | v    |
| ŞEKİL DİZİNİ .....                                                        | vi   |
| KISALTMA DİZİNİ .....                                                     | viii |
| TEŞEKKÜR .....                                                            | ix   |
| ÖZET .....                                                                | 1    |
| ABSTRACT.....                                                             | 3    |
| <b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....                                             | 5    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....                                            | 7    |
| 2.1. Skleroderma ve Fibrozis.....                                         | 7    |
| 2.2.Epigallo-kateşin-3-Gallat (EGCG) .....                                | 8    |
| 2.3.EGCG ve Skleroderma İlişkisi .....                                    | 10   |
| 2.4.Bleomisinle Oluşturulmuş Skleroderma Modeli .....                     | 10   |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....                                           | 13   |
| 3.1. Araştırmanın Tipi .....                                              | 13   |
| 3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı .....                                    | 13   |
| 3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi .....                               | 13   |
| 3.4. Araştırmanın Materyali .....                                         | 13   |
| 3.5. Araştırmanın Değişkenleri .....                                      | 13   |
| 3.6. Veri Toplama Araçları .....                                          | 13   |
| 3.6.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Araç ve Gereçler .....                 | 13   |
| 3.6.2. Kullanılan Sarf Malzemeler .....                                   | 16   |
| 3.6.3. Yöntemler .....                                                    | 16   |
| 3.6.3.1. Bleomisin ile Skleroderma Hayvan Modeli Oluşturma Deneyleri..... | 16   |
| 3.6.3.1.1. Amaç ve Genel İlke.....                                        | 16   |



|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6.3.1.2. Bleomisin ile Skleroderma Hayvan Modeli Oluşturma Deneyleri .....                                   | 17 |
| 3.6.3.1.3. Bleomisin ve EGCG Uygulamaları .....                                                                | 17 |
| 3.6.3.2. Hematoksilen Eozin ve Masson Trikrom Histokimya Boyamaları .....                                      | 19 |
| 3.6.3.2.1. Amaç ve Genel İlke.....                                                                             | 19 |
| 3.6.3.2.2. Uygulama Basamakları .....                                                                          | 20 |
| 3.6.3.3. Alfa Düz Kas Aktin Antikoru ile İmmunhistokimya Boyamaları .....                                      | 21 |
| 3.6.3.3.1. Amaç ve Genel İlke.....                                                                             | 21 |
| 3.6.3.3.2. Uygulama Basamakları .....                                                                          | 21 |
| 3.6.3.4. MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve p-SMAD 2/3 Protein Ekspresyonlarının<br>Western Blot Yöntemi ile Analizi..... | 22 |
| 3.6.3.4.1. Amaç ve Genel İlke .....                                                                            | 22 |
| 3.6.3.4.2. Protein Saflaştırılması .....                                                                       | 22 |
| 3.6.3.4.3. Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması .....                                                        | 23 |
| 3.6.3.4.4. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE)<br>Jelin Hazırlanması .....         | 24 |
| 3.6.3.4.5. Örnek Hazırlanması .....                                                                            | 25 |
| 3.6.3.4.6. Jelin Yüklenmesi .....                                                                              | 25 |
| 3.6.3.4.7. Elektroforetik Yürütme .....                                                                        | 25 |
| 3.6.3.4.8. Proteinlerin Membrana Transferi .....                                                               | 26 |
| 3.6.3.4.9. Jelde Proteinlerin Görüntülemesinin Coomassie Blue Boyası ile Yapılması .....                       | 27 |
| 3.6.3.4.10. Bloklama .....                                                                                     | 27 |
| 3.6.3.4.11. Primer Antikor ile İnkübasyon .....                                                                | 27 |
| 3.6.3.4.12. Sekonder Antikor ile İnkübasyon .....                                                              | 28 |
| 3.6.3.4.13. Görüntüleme .....                                                                                  | 28 |
| 3.6.3.4.14. Dansitometrik Analiz .....                                                                         | 28 |

|                                                                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6.3.5. Deney Gruplarında TGF-Beta Gen Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR) ile belirlenmesi ..... | 29        |
| 3.6.4.1. Amaç ve Genel İlke .....                                                                                                                            | 28        |
| 3.6.4.2. Dermal Dokulardan Total RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini .....                                                                                       | 29        |
| 3.6.4.3. Total RNA'lerden cDNA Sentezlenmesi .....                                                                                                           | 29        |
| 3.6.4.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR) .....                                                                               | 30        |
| 3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi .....                                                                                                                     | 31        |
| 3.8. Verilerin Değerlendirilmesi .....                                                                                                                       | 32        |
| 3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları .....                                                                                                                       | 32        |
| 3.10. Etik Kurul Onayı .....                                                                                                                                 | 32        |
| 3.11. Araştırmanın Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Kabulü.....                                                       | 32        |
| <b>4. BULGULAR</b> .....                                                                                                                                     | <b>33</b> |
| 4.1. EGCG'nin Skleroderma Oluşumunda Fibroze Etkilerinin Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi .....                                                          | 33        |
| 4.1.1. Histokimyasal Boyama Analizleri.....                                                                                                                  | 33        |
| 4.1.2. İmmünohistokimya Boyama Analizleri .....                                                                                                              | 37        |
| 4.2. MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve p-SMAD 2/3 Protein Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi ile Analizi .....                                                     | 39        |
| 4.2.1. Kontrol ve Deney Gruplarında MMP-1 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Gösterilmesi .....                                                      | 39        |
| 4.2.2. Kontrol ve Deney Gruplarında MMP-8 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Gösterilmesi .....                                                      | 40        |
| 4.2.3. Kontrol ve Deney Gruplarında MMP-13 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Gösterilmesi .....                                                     | 41        |

|                                                                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.4. Kontrol ve Deney Gruplarında p-SMAD 2/3 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Gösterilmesi .....       | 42        |
| 4.3. TGF-Beta Gen Ekspresyonunun Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR) ile Analizi ..... | 44        |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>                                                                                           | <b>46</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>                                                                                  | <b>51</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR .....</b>                                                                                          | <b>52</b> |
| <b>8. EKLER .....</b>                                                                                              | <b>61</b> |
| 8.1. Etik Kurul Raporu (EK 1) .....                                                                                | 61        |
| 8.2. Özgeçmiş (EK 2) .....                                                                                         | 62        |
| 8.3. Tez ve Tezle İlişkili Konularda Yayımlanmış Makaleler (EK 3) .....                                            | 70        |
| 8.4. Tezle İlişkili Konuda Yayıma Gönderilen Makale .....                                                          | 98        |
| 8.5. Deney Hayvanı Deneyleri Takip Formları (EK 4) .....                                                           | 107       |

## **1. TABLO, ŞEKİL VE KISALTMA DİZİNİ**

### **1.1. Tablo Dizini**

**Tablo 1.** Skleroderma Deneysel Hayvan Modelleri

**Tablo 2.** Araştırma Sırasında Kullanılan Araç ve Gereçler

**Tablo 3.** Deney Hayvanı Araştırma Protokolü

**Tablo 4.** SDS–PAGE Yönteminde Ayırıcı Jelin (%12) İçeriği

**Tablo 5.** SDS–PAGE Yönteminde Paketleyici Jelin (%4) İçeriği

**Tablo 6.** RT-qPZR Reaksiyon Karışım İçerikleri

**Tablo 7.** Araştırma Takvimi

## 1.2. Şekil Dizini

**Şekil 1.** Fibrozis Oluşumunda TGF- $\beta$  ve SMAD Sinyalizasyonu

**Şekil 2.** EGCG'ın Yapısı

**Şekil 3.** Çalışma Gruplarında Dermal İnflamasyon Skorları. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. **a)** Deri Derin Tabaka İnflamasyon Skorları, **b)** Deri Yüzeysel Tabaka İnflamasyon Skorları. İnflamasyon skorları, beş alanın ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

**Şekil 4.** Çalışma Gruplarında Masson Trikrom Boyama ile Elde Edilmiş Dermis Kalınlıkları. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. **a)** Üst Dermis Kalınlıkları, **b)** Alt Dermis Kalınlıkları. Dermal kalınlık,  $\mu\text{m}$  olarak verilmiştir.

**Şekil 5.** Çalışma Gruplarında Masson Trikrom Boyamaları. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. Yeşil boyama alanları kollajeni ifade etmektedir.

**Şekil 6.** Çalışma Gruplarında  $\alpha$ -SMA+ Hücre Sayıları. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. 5 farklı alanda  $\alpha$ -SMA+ hücre sayısı ortalaması verilmektedir.

**Şekil 7.** Çalışma Gruplarında  $\alpha$ -SMA+ Boyamaları. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu

**Şekil 8.** Çalışma Gruplarında MMP-1 Protein Ekspresyon Düzeyleri. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. MMP-1/  $\beta$ -Aktin bant yoğunluk oranları verilmektedir.

**Şekil 9.** Çalışma Gruplarında MMP-8 Protein Ekspresyon Düzeyleri Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. MMP-8/  $\beta$ -Aktin bant yoğunluk oranları verilmektedir.

**Şekil 10.** Çalışma Gruplarında MMP-13 Protein Ekspresyon Düzeyleri. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. MMP-13/  $\beta$ -Aktin bant yoğunluk oranları verilmektedir.

**Şekil 11.** Çalışma Gruplarında p-SMAD 2-3/ total SMAD 2-3 Protein Ekspresyon Oranları. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. p-Smad 2/Total-Smad 2, p-Smad 3/Total-Smad 3 bant yoğunluk oranları verilmektedir.

**Şekil 12.** Çalışma Gruplarında Western Blot Yöntemi ile Elde Edilen MMP-1, MMP-8, MMP-13, p-SMAD 2/3 Protein Bant Görüntüleri. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu

**Şekil 13.** Çalışma Gruplarında RT-qPCR yöntemi ile elde edilen TGF-  $\beta$ 1 mRNA' larının değişimleri. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu (\* p:0,002). Bulgular,  $\Delta\Delta$ CT hesaplama sonuçlarına göre, ekspresyon katsayısı olarak verilmiştir.

### 1.3. Kısaltma Dizini

**$\alpha$ -SMA:** Alfa Düz Kas Aktin

**BLM:** Bleomisin

**CTGF:** Bağ Doku Büyüme Faktörü

**EGCG:** Epigallo-kateşin-3-gallat

**ESM:** Ekstrasellüler Matriks

**MMP-1:** Matriks Metalloproteinaz-1

**MMP-8:** Matriks Metalloproteinaz-8

**MMP-13:** Matriks Metalloproteinaz-13

**NF- $\kappa$ B:** Nüklear Faktör Kappa B

**ROS:** Reaktif Oksijen Türleri

**RT-qPZR:** Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**SDS-PAGE:** Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforez

**SSc:** Sistemik Skleroz ya da Skleroderma

**TEMED :** Tetrametiletildiamin

**TGF- $\beta$ :** Transforme Edici Büyüme Faktörü- $\beta$

**TIMP:** Doku MMP İnhibitörü

## TEŞEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalına adım attığım 7 Şubat 2012 tarihinden itibaren eğitim sürem boyunca katkısını gördüğüm, teorik ve pratik olarak ders aldığım tüm hocalarıma,

Tez, proje ve makale hazırlığında, yazım ve düzeltme aşamalarında yardımını hiçbir zaman esirgememiş olan, daima sabırla ve güleryüzüyle her türlü soruma cevap veren, kendisinden doktora eğitimim boyunca çok şey öğrendiğim, fikirleri ile yol gösteren ve her zaman örnek alacağım çok değerli danışman hocam **Prof. Dr. Gül Güner Akdoğan**’ a,

Vizyonumu genişleten ve destek sağlayan Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Hüray İşlekel**’e, ayrıca Anabilim Dalının tüm değerli hoca ve öğrencilerine,

Her türlü problemime yetişen, kapısını her zaman çalabildiğim, iyi niyetli yaklaşımlarıyla her zaman umut ve cesaret veren **Doç. Dr. Zahide Çavdar**’ a,

Bu araştırmanın oluşturulmasında ve yürütülmesinde katkı ve desteğini eksik etmeyen değerli hocalarım **Prof. Dr. Merih Birlik**’e, **Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu**’ na ve **Prof. Dr. Osman Yılmaz**’a,

Bu süreçte en büyük kazanımlarım olan ve hayat boyu dostluklarından emin olacağım **Duygu Harmancı**’ ya, **Cemre Ural**’ a, **Yeliz Yılmaz**’ a, **Hande Topel**’ e ve **Aslı Çelik**’ e,

Sadece doktora eğitimi süresinde değil hayata gözümü açtığım ilk andan itibaren sevgisini, desteğini ve güvenini her zaman yanımda hissettiğim, başarabildiğim her türlü işte emeği herkesten fazla olan sevgili annem **Gülderen Koçak**’a ve babam **Yaşar Koçak**’ a, ilgi ve desteğini eksik etmeyen sevgili kardeşlerim **Halit Koçak**’a ve **Fausta Kalinauskaite Koçak**’ a, büyük fedakarlığını ve desteğini gördüğüm sevgili eşim, hayat arkadaşım, **Mutlu Sezgin**’ e teşekkür ederim.

Yalnızca bir teşekkürle bunca güzelliğin hakkını veremem, bilirim...

**Ayşe KOÇAK**

**Nisan, 2018**



**ÖZET**

**FARELERDE BLEOMİSİN İLE OLUŞTURULMUŞ SKLERODERMA MODELİNDE  
EPİGALLOKATEŞİN 3 GALLAT'IN FİBROZİS ÜZERİNE OLASI KORUYUCU  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ayşe Koçak**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı**

**35340, Balçova-İzmir**

**[kocak.ayse@gmail.com](mailto:kocak.ayse@gmail.com)**

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, bleomisinle (BLM) oluşturulmuş skleroderma modelinde epigallokateşin-3-gallat'ın (EGCG) fibrozis üzerine olası koruyucu etkilerinin değerlendirilmesidir.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada; skleroderma deney hayvanı modelinde EGCG'nin fibrozise olası etkileri araştırıldı. Ortalama vücut ağırlığı  $22 \pm 5$  g olan 32 adet sağlıklı dişi Balb-c fare kullanıldı. Fareler rastgele olarak; kontrol (n = 8), Bleomisin (n = 8), Bleomisin + EGCG (n = 8) ve EGCG (n = 8) olmak üzere dört gruba ayrıldı. p-SMAD 2/3, SMAD 2/3 ve matriks metalloproteinaz (MMP-1, MMP-8, MMP-13) proteinlerinin western blotting tayini için dermal doku örnekleri toplandı. TGF- $\beta$ 1 mRNA ekspresyonu qPCR ile belirlendi. Deri dokularında immünohistopatolojik ve histopatolojik incelemeler yapıldı.

**Bulgular:** Masson Trikrom boyama sonuçlarına göre, EGCG uygulanan grupta fibrozisin azaldığı gözlemlendi. Hematoksilen-eozin boyama sonuçlarına göre, Bleomisin + EGCG grubu ile BLM grubu karşılaştırıldığında EGCG uygulanan grupta fibrozis anlamlı ölçüde azaldı. EGCG uygulanan grupta MMP-1, MMP-8 protein düzeylerinin arttığı ve p-SMAD 2/3 protein düzeyinin azaldığı western blot yöntemi ile belirlendi. BLM ve BLM + EGCG grupları karşılaştırıldığında TGF- $\beta$  mRNA ekspresyonunun EGCG uygulanan grupta azaldığı RT-qPCR yöntemi ile gözlemlendi.

**Sonuç:** Tüm bulgular birbirini destekleyici özellikte olup, araştırma koşullarında EGCG'nin sklerodermada fibrozis oluşumuna koruyucu etki gösterdiğine işaret etmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarının sklerodermada fibrozis oluşumunun önlenmesinde kullanılabilircek yeni terapötik yaklaşımlara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar sözcükler:** BLM ile oluşturulmuş skleroderma, EGCG, fibrozis, TGF- $\beta$ , MMP'ler



**ABSTRACT**  
**THE OF INVESTIGATION POSSIBLE PROTECTIVE EFFECTS OF**  
**EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE ON THE BLEOMYCIN INDUCED**  
**SCLERODERMA MODEL OF FIBROSIS**

**Ayşe Koçak**

**Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Molecular Medicine**  
**35340, Balçova-İzmir**  
[kocak.ayse@gmail.com](mailto:kocak.ayse@gmail.com)

**Objective:** The aim of the present study was to evaluate the potential protective effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on fibrosis in bleomycin induced scleroderma model.

**Materials and Methods:** Thirty-two healthy female Balb-c mice with the average body weight of 22±5 g were used in this study. The mice were randomly divided into four groups as control (n=8), Bleomycin (n=8), Bleomycin + EGCG (n=8) and EGCG (n=8). Skin tissue samples were collected to quantify matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), p-SMAD 2/3 and SMAD 2/3 in protein homogenates by western blotting. TGF-β1 expression was determined by real-time PCR. Immunohistopathological and histopathological examinations of skin tissues were also done.

**Results:** EGCG treatment was found to decrease fibrosis in connective tissue compared to the BLM injected control, using measurements with Masson. Trichrome. Bleomycin + EGCG group showed a significant reduction in fibrosis at the dermal surface area, compared with the BLM Group, using hematoxylin measurement. MMP-1 and MMP-8 protein levels were increased and p-SMAD 2/3 protein level was decreased, using the western blotting method. The results of the qPCR method showed that TGF-β mRNA expression was decreased in the EGCG+BLM group compared with the BLM group.

**Conclusion:** All findings agree that EGCG has a protective effect against fibrosis in scleroderma. This study is meant to reveal some novel therapeutic approaches for the cause of scleroderma and prevent of fibrosis.

**Key words:** BLM induced Scleroderma, EGCG, fibrosis, TGF- $\beta$ , MMPs



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Skleroderma, ekstrasellüler matriks (ESM) artışı, damar hasarı ve inflamasyon ile karakterize olan otoimmün bir hastalıktır [1]. İç organ ve deriyi etkileyen sklerodermanın henüz bilinen bir nedeni yoktur. [2]. Kadınlarda daha çok görülen skleroderma, milyonda 50-300 arasında görülür, bu sebeple nadir hastalıklar sınıfına girmektedir [3-5].

Kollajen'in ESM'de anormal birikmesiyle oluşan fibrozis ile ilgili çalışmalarda, bleomisinle oluşturulmuş skleroderma modelleri oldukça fazla kullanılmaktadır ve bu zamana kadar en iyi model olarak kabul edilmektedir [6]. Sklerodermada, deri ve iç organ fibrozunun etkilerini azaltmaya yönelik herhangi bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. TGF- $\beta$  / Smad 2-3, sklerodermadaki en önemli sinyal ileti yollarından biridir. TGF- $\beta$ , tip I kollajen veya fibronektin gibi ekstrasellüler matriks (ESM) proteinlerinin sentezini değiştirir ve proteolitik aktivite ile ilgili proteinlerin üretimini modüle eder [7]. Sklerodermada TGF- $\beta$  sinyalizasyonu fibroproliferatif ve inflamatuvar yolları etkinleştirir ESM'nin progresif artışına ve fibroze neden olur [8]. Hücre proliferasyonunun artışında ve fibroblastların myofibroblastlara dönüşmesinde  $\alpha$ -düz aktin ( $\alpha$ -SMA) artışı oldukça önemlidir [9].  $\alpha$ -SMA, artan fibroz için belirteç olarak kullanılmaktadır.

ESM'nin regülasyonunda ve içeriğindeki birçok proteinin yıkımında matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) rol oynar. MMP'ler, kollajenazlar (MMP-1, -8, -13, -18), stromelizinler (MMP-3, -7, -10, -11, -12), jelatinazlar (MMP-2, -9) ve membran tip MMP'ler (MT-MMP-14, -15, -16, -17) olmak üzere dört farklı gruptan oluşmaktadır [10]. MMP-8 (kollajenaz-2 ya da nötrofil kollajenaz), ESM proteinlerinden olan kollajen tip 1'in yıkımından sorumludur [11]. MMP-13 (kollajenaz-3), pulmoner fibroz ile yüksek korelasyon gösteren interstisyel kollajenazdır [12].

Epigallokateşin-3-gallat (EGCG), yeşil çayın içeriğinde en çok bulunan kateşindir ve cilde faydalı olan etkileri bulunmuştur [13, 14]. EGCG'nin karaciğer fibrozunda fibroblastların proliferasyonunu ve kollajen birikimini azalttığı bildirilmiştir [15].

Skleroderma patogenezinin ilişkin araştırmalar sürmektedir ancak hastalığa ait henüz etkin bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır. Skleroderma, nadir bir hastalıktır. Hastalar, Romatoloji & İmmunoloji polikliniklerine hastalığın çeşitli evrelerinde başvurmaktadır. Bu

sebeple, yeterli sayıda ve homojen bir hasta popülasyonu sağlanamamaktadır. Skleroderma çalışmaları için bu durum bir kısıtlılık oluşturmakta ve deneysel hayvan modellerinin önemini arttırmaktadır. Günümüze kadar birçok deneysel skleroderma modeli tanımlanmıştır. Tanımlanmış olan modellerden, uygulama kolaylığı ve insana benzer immünolojik ve histopatolojik özellikler göstermesi nedeniyle bleomisin ile uyarılmış dermal fibroz/skleroz *Balb/c* dişi fare modeli tercih edilmektedir. Bleomisin, *Streptomyces verticillus* olarak adlandırılan bir mantardan izole edilir, günümüzde bir çok kanser için anti-tümör ajanı olarak kullanılır [16]. Son yıllardaki araştırmalar, bleomisinin *in vivo* modellerde insan akciğerinde veya dermal fibroblastlarda kollajenin mRNA ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir [17,18]. Yamamoto ve ark. 21 gün boyunca *subkutanöz (sc)* bleomisin enjeksiyonu ile skleroderma fare modeli oluşturmuştur [19-24].

Yukarıdaki çalışmaların değerlendirilmesinde ortaya çıkan önemli bir araştırma sorusu: EGCG, Sklerodermada antifibrotik etki göstermekte midir?

Araştırmanın hipotezi, Bleomisinle oluşturulmuş deneysel skleroderma fare modelinde EGCG fibrozu baskılar ve antifibrotik etkileri vardır.

Bu noktadan yola çıkarak, planladığımız bu araştırmanın amacı bleomisinle (BLM) oluşturulmuş skleroderma modelinde epigallokateşin-3-gallat'ın (EGCG) fibrozis üzerine olası koruyucu etkilerinin değerlendirilmesidir.

Bu amaç doğrultusunda hedeflerimiz aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur:

1. EGCG'nin MMP-1, MMP-8, MMP-13 üzerine etkisinin incelenmesi,
2. EGCG'nin dermal fibrozu TGF- $\beta$ -SMAD 2/3 yoluyla üzerinden etkileyip-etkilemediğinin belirlenmesi,
3. EGCG'nin kollajen birikimindeki rolünün histokimyasal yöntemlerle açığa çıkarılmasıdır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

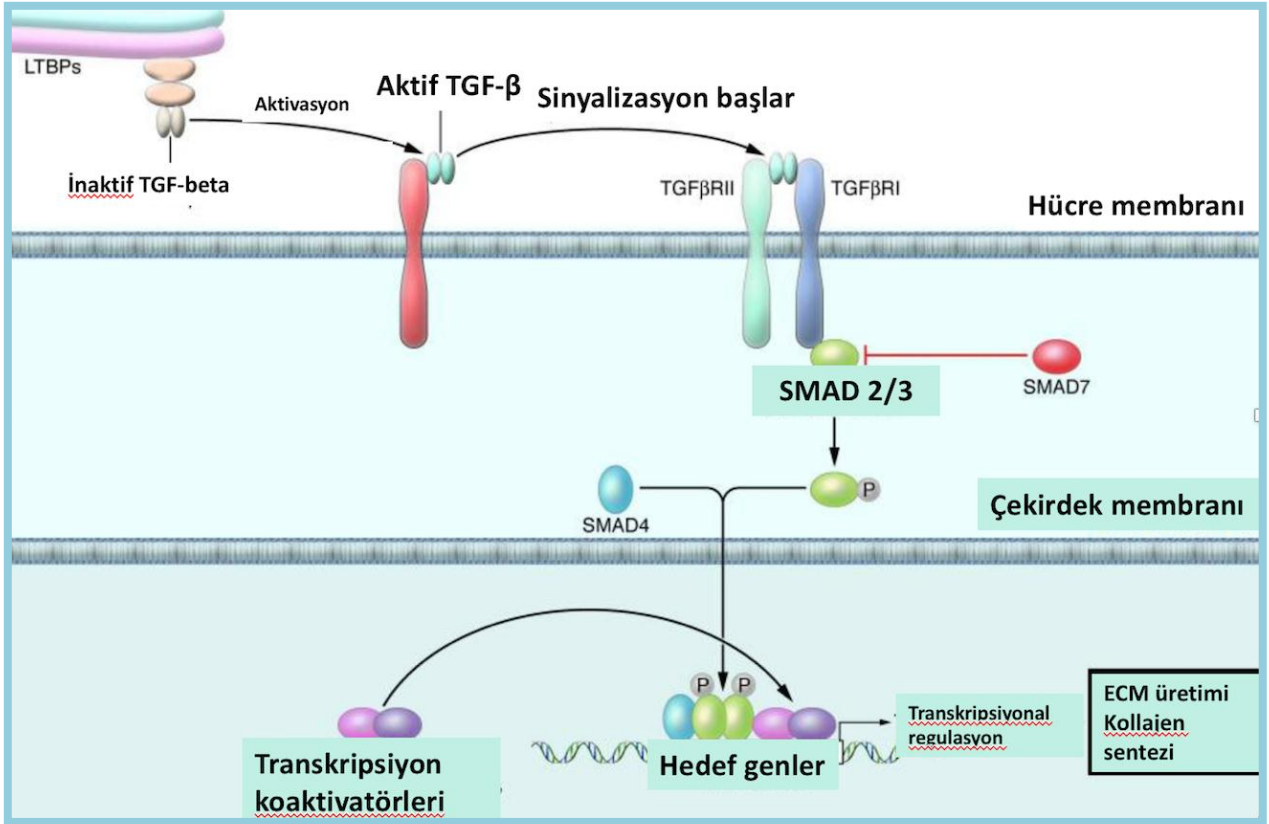
### **2.1. Skleroderma ve Fibrozis**

Sistemik skleroz (SSc) ya da skleroderma, mikrovasküler tutulum, bağışıklık sisteminin aktivasyonu, ciltte ve iç organlarda hücre dışı matriks birikimi artışıyla karakterize edilen çok sistemli bir hastalıktır [25]. Sklerodermanın tipik bulgusu, deride sertlik, kalınlaşma ve deri fibrozudur. Hastalıkta, iç organlardan akciğer, kalp, gastrointestinal sistem (GİS) ve böbrekler sıklıkla tutulur. Skleroderma nadir görülen hastalıktır. Hastalığın, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki prevalansı %0.01–0.03' tür. Dünya genelinde görülen skleroderma, kadınlarda erkeklere göre daha sık (kadın/erkek oranı 3:1) görülür ve 30–50 yaşları arasında gözlenir.

Sklerodermanın genetik yatkınlığı olabileceği düşünülüp çalışmalar yapılmıştır. Skleroderma tanısı olan hastaların birinci dereceden akrabalarında, hastalık gelişme riski artmıştır. Ancak; İkizler arasında görülme oranının düşük olması (monozigot ve heterozigotların her ikisi için de % 4,6) genetik etkinliğin güçlü olmadığını göstermektedir [1].

Sklerodermanın hâlâ belirsiz patogenetik karmaşıklığına rağmen, çeşitli yeni yollar araştırılarak, terapötik alanda yeni olası hedefler belirlenmektedir. Sklerodermada, vasküler hasar, fibroblastların aktivasyonuna ve esas olarak kollajenin ekstrasellüler matriks (ESM)'te anormal birikmesiyle fibrozise neden olur. SSc'de, lezyon bölgelerindeki fibroblastlar çoğunlukla miyofibroblastlar halinde bulunur. Bununla birlikte yapısal olarak ESM bileşenlerinin değişikliğe uğraması, cildin aşırı derecede gerilmesine ve sıkılaşmasına neden olur. Fibrozis sonucunda doku işlevinde bozulma gerçekleşir. Fibroblast aktivasyonu, doku restorasyonunun sağlanması için hasardan sonra fizyolojik bir tepki olarak da gerçekleşir [26, 27]. SSc fibroblastlarının apoptoza gitme duyarlılığı SSc'de disregüle fibrozisin önemli bir belirteçidir.

Fibrozis, ESM ve TGF $\beta$  tarafından fibroblast proliferasyonunu destekleyen bir süreçtir. Sistemik skleroz, fibrotik sürecin en iyi gözlemlendiği hastalıktır (Şekil 1) [1, 28]. ESM protein dengesi MMP' lerle yüksek oranda ilişkilidir. Dermal fibrozda en aktif MMP-1, MMP-8 ve MMP-13'tür [10].



**Şekil 1.** Fibrozis Oluşumunda TGF-β ve SMAD Sinyalizasyonu

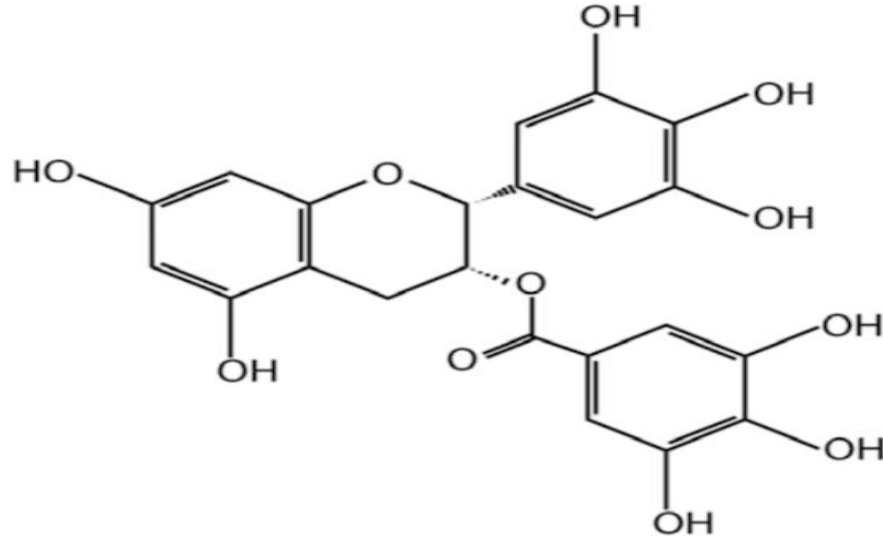
Skleroderma için tedavi planlaması erken inflamatuvar fazda yani fibrotik değişiklikler ortaya çıkmadan yapılmalıdır. Günümüzde, mevcut tedaviler büyük oranda semptomatiktir. Skleroderma gelişimini engelleyen veya geciktiren uzun etkili bir ilaç yoktur. Mevcut tedaviler yaşam kalitesini düzeltme ve mortaliteyi azaltmaya yardımcıdır.

## 2.2. Epigallo-kateşin-3-Gallat (EGCG)

Epigallo-kateşin-3-gallat (EGCG) doğada bulunan bir fenoldür ve güçlü bir antioksidan ve reaktif oksijen türü temizleyici olarak bilinir [29,30]. Son on yılda EGCG'nin sağlığa etkileri yoğun olarak araştırılmıştır. Lökosit kemotaksisini inhibe ettiği, serbest radikalleri etkisizleştirdiği, geçiş metallerini şelatladığı ve lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu bozduğu gösterilmiştir [31-33]. EGCG'nin dermal fibroblastlarda MMP ekspresyonu ve üretimini



sağlayan AP-1'i ve nükleer faktör  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)'i inhibe ettiği gösterilmiştir [34]. Ayrıca, EGCG'nin TGF- $\beta$  aktivasyonunu değiştirdiği ve TGF- $\beta$  reseptörlerini (I ve II) baskıladığı gösterilmiştir. Aynı zamanda fibroziste rol oynadığı bilinen bağ doku büyüme faktör (CTGF) genini baskıladığı gösterilmiştir [35]. Klass ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada EGCG'nin, kollajen yapımında görevli olan TGF- $\beta$ 'in rolünü değiştirdiği gösterilmektedir. Aynı çalışmada, miyofibroblast farklılaşmasını, CTGF ve kollajen tip 1 gen ekspresyonunu azalttığı gösterilmektedir [36]. Hepatik fibrozda çalışılan EGCG'nin TGF- $\beta$ / SMAD, PI3K / Akt / FoxO1 ve NF- $\kappa$ B yolaklarının aktivitesini etkilediği bilinmektedir [37]. Myokardiyal fibrozda ise EGCG'nin *in vitro* ve *in vivo* endoglin ekspresyonu ve miyokardiyal fibrozu endoglin / JNK / AP-1 yolu ile fibrozu baskıladığı gösterilmiştir [38].



**Şekil 2.** EGCG'nin Yapısı

### 2.3. EGCG ve Skleroderma İlişkisi

EGCG ve skleroderma ilişkisi çok az çalışılmıştır. *In vivo* çalışma yoktur ancak *in vitro* yapılan bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada ise SSc hastalarından elde edilen dermal fibroblastlarda, EGCG uygulaması ile ESM üretimi ve CTGF protein ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir. Aynı zamanda, EGCG, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini, ERK1 / 2 ve NF-κB aktivitesini bastırmıştır [39].

### 2.4. Bleomisinle Oluşturulmuş Skleroderma Modeli

Bleomisin, bir bakteri türü olan “*Streptomyces verticillus*” tarafından üretilir ve lenfoma, skuamöz hücreli karsinomlar, germ hücreli tümörler ve intraplevral uygulama ile malign plevral efüzyonun tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajandır.

BLM kullanan hastalarda majör yan etki olarak fibrozis ortaya çıkmıştır. Bu özelliği ile skleroderma oluşturmak üzere hayvan deneylerinde kullanımının temeli oluşturur.

Günümüzde, skleroderma patogenezi ile ilgili tartışmalar sürmektedir ve etkin bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır. Bununla birlikte, skleroderma, nadir görülen bir hastalıktır ve hastalar romatoloji polikliniklerine hastalığın değişik evrelerinde başvurmaktadırlar. Yeterli sayıda ve homojen bir hasta popülasyonu sağlanamamaktadır. Skleroderma için ideal bir klinik çalışma planlanması ve yapılması olası değildir. Tüm bu sebeplerden dolayı skleroderma çalışmaları açısından deneysel hayvan modelleri önemli hale gelmektedir. Literatürde, birçok deneysel skleroderma modeli tanımlanmıştır (Tablo 1) [19, 40-42]. Skleroderma modellerinden, oluşturulmasının kolaylığı ve insana benzer immünolojik ve histopatolojik özellikler göstermesi nedeniyle bleomisin (BLM) ile uyarılmış dermal fibroz/skleroz *Balb/c dişi fare* modeli tercih edilmektedir. Hastalık deney modellerinde, tüm çevresel faktörler kontrol edilebilmektedir ve hastalığın patogenezi rol alabilecek olası tüm basamaklar test edilebilmektedir. Bununla birlikte, hastalık deney modellerin avantajları yanında dezavantajları da bulunmaktadır. Çoğu zaman, belirli bir hastalığa özgü deneysel modeli bulmak ve uygulamaya sunmak zor olmaktadır. Seçilecek olan deneysel model, hastalığın özelliklerini yansıtmalıdır. Skleroderma hayvan modeli için Tsk1 ve BLM ile uyarılan skleroderma modelleri, çalışmalarda en çok kullanılanlardır. Tsk1

modelinde spontan fibroz gelişir ve oldukça iyi bir modeldir. Ancak, bu modelde, akciğerde fibrozis yerine amfizematöz değişiklikler oluşmakta, deride inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülmemektedir. Dolayısıyla sklerodermayı tam olarak yansıtmamaktadır.

Sklerodermada, vaskülopati, hücresel bağışıklık sistemi ve fibrozis gibi karmaşık patolojik süreçlerin araştırılması için *in vitro* çalışmaların yetersiz olduğu, *in vivo* çalışmaların gerekliliği birçok çalışmada vurgulanmıştır [39]. Yamamoto ve ark. 21 gün boyunca *subkutanöz* (sc) bleomisin enjeksiyonu ile skleroderma fare modeli oluşturmuştur [19-24]. Araştırmacılar, 1 µg ve daha yüksek dozlarda, tekrarlanan BLM uygulamalarının 3. ve 4. haftadan sonra skleroderma benzeri histopatolojik ve biyokimyasal bulgulara yol açtığını bildirmişlerdir [19-24]. BLM uygulamaları sonlandırılrsa dahi hastalığa dair bulguların en az 6 hafta devam ettiği ve günâşırı uygulamaların da benzer histopatolojik bulguları oluşturduğu gösterilmiştir [23]. Bleomisinle oluşturulmuş bu model, günümüzde çok çalışılan ve skleroderma patolojisine en yakın olandır.

**Tablo 1.** Skleroderma Deneysel Hayvan Modelleri [19, 40-42]

|                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>GENETİK MODELLER</b>                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• T<math>\beta</math>RII<math>\Delta</math>k fare</li><li>• TBR1CA fare</li><li>• MRL/lpr<math>\gamma</math>R<math>^{-/-}</math> fare</li><li>• RLX<math>^{-/-}</math> fare</li><li>• İntegrin <math>\alpha</math>1 null (knockout) fare</li></ul> |
| <b>SPONTAN OLUŞAN MODELLER</b>                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• UCD-200 tavuk</li><li>• Tsk1 fare</li></ul>                                                                                                                                                                                                      |
| <b>BİR AJAN İLE OLUŞANLAR</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Tsk2 fare</li><li>• BLM (fare)</li><li>• TGF-<math>\beta</math> ve CTGF (fare)</li><li>• Vinil klorid (fare)</li><li>• Civa klorid (fare)</li></ul>                                                                                              |
| <b>TRANSPLANTASYON YOLUYLA OLUŞANLAR</b>                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Sklerodermatoz GVHD (B10.D2 vs. Balb/c)</li><li>• Modifiye sklerodermatoz GVHD (B10.D2 vs. RAG<math>^{-/-}</math>)</li><li>• Siklosporin A ile uyarılan otoimmünite modeli (rat)</li></ul>                                                       |

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Araştırmanın Tipi**

Araştırmamız deneysel niteliktedir.

#### **3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı**

Araştırmamız 2014-2017 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Laboratuvar Hayvanları Bilim Dalı ve Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Araştırma Laboratuvarında (ARLAB) yürütülmüştür.

#### **3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi**

Araştırmada deneysel hayvan modeli kullanılmıştır. Bu model, bleomisin'in *Balb/c* dişi fareye uygulanmasıyla oluşturulmuştur. 32 adet *Balb/c* dişi fare kullanılmıştır.

#### **3.4. Araştırmanın Materyali**

Araştırmada *Balb/c* dişi farenin deri materyali kullanılmıştır.

#### **3.5. Araştırmanın Değişkenleri**

Bağımlı değişken: MMP-8, MMP-13, MMP-1, p-SMAD, TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ -SMA

Bağımsız Değişken: EGCG

#### **3.6. Veri Toplama Araçları**

##### **3.6.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Araç ve Gereçler**

Tez çalışmasında kullanılan tüm araç ve gereçler Tablo 2' de verilmektedir.

**Tablo 2.** Araştırma Sırasında Kullanılan Araç ve Gereçler

|                                                                                    |                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>Salınımmlı santrifüj (Eppendorf)</b>                                            | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi<br>Araştırma Laboratuvarı-ARLAB  |
| <b>Sabit açılı santrifüj (Heraus)</b>                                              | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi<br>Araştırma Laboratuvarı- ARLAB |
| <b>Vorteks (Ika)</b>                                                               | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi<br>Araştırma Laboratuvarı- ARLAB |
| <b>Saf su sistemi (Elga)</b>                                                       | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi<br>Araştırma Laboratuvarı- ARLAB |
| <b>Western blotting sistemi (Bio-Rad)</b>                                          | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi<br>Araştırma Laboratuvarı- ARLAB |
| <b>Mikroplate okuyucu (Synergy HT, Multi-Detection Microplate Reader, BIO-TEK)</b> | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi<br>Araştırma Laboratuvarı- ARLAB |
| <b>Işık mikroskobu (Nikon Eclipse C2)</b>                                          | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi<br>Patoloji Anabilim Dalı        |
| <b>Işık Mikroskobu Kamerası –İmage sistem</b>                                      | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi<br>Patoloji Anabilim Dalı        |
| <b>Termal Cycller (Bio-Rad)</b>                                                    | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi<br>Araştırma Laboratuvarı- ARLAB |
| <b>Derin Dondurucu -80C (Thermo Forma Model 705)</b>                               | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi<br>Araştırma Laboratuvarı- ARLAB |
| <b>Derin Dondurucu -20C (Indesit)</b>                                              | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi<br>Araştırma Laboratuvarı- ARLAB |
| <b>Buzdolabı +4C (Indesit)</b>                                                     | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi<br>Araştırma Laboratuvarı- ARLAB |
| <b>Buz makinası (Scotsman AF-100)</b>                                              | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi<br>Araştırma Laboratuvarı- ARLAB |

|                                                                                |                                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>Lab Roller (Labnet H5000 rotator)</b>                                       | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>Araştırma Laboratuvarı- ARLAB |
| <b>Plak karıştırıcı (Labnet)</b>                                               | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>Araştırma Laboratuvarı- ARLAB |
| <b>Ph metre (Hanna)</b>                                                        | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>Araştırma Laboratuvarı-ARLAB  |
| <b>Light Cycler (Roche 2.0)</b>                                                | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>Araştırma Laboratuvarı- ARLAB |
| <b>Otomatik İmmünohistokimya Cihazı<br/>(Ventana Benchmark Ultra)</b>          | Dokuz Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi<br>Patoloji Anabilim Dalı        |
| <b>Otomatik Doku Takip Cihazı<br/>(Tissue-Tek Xpress)</b>                      | Dokuz Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi<br>Patoloji Anabilim Dalı        |
| <b>Su Banyosu<br/>(Leica HI1210 )</b>                                          | Dokuz Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi<br>Patoloji Anabilim Dalı        |
| <b>Mikrotom (Shandon AS325)</b>                                                | Dokuz Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi<br>Patoloji Anabilim Dalı        |
| <b>Otomatik Hematoksilen &amp; Eozin Boyama<br/>Cihazı (Tissue Tek Prizma)</b> | Dokuz Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi<br>Patoloji Anabilim Dalı        |
| <b>Otomatik Lam Kapatıcı<br/>(Tissue-Tek-Film)</b>                             | Dokuz Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi<br>Patoloji Anabilim Dalı        |
| <b>Parafine Gömme Cihazı<br/>(Tissue-Tek AutoTek)</b>                          | Dokuz Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi<br>Patoloji Anabilim Dalı        |
| <b>Işık mikroskobu (Nikon Eclipse C2)</b>                                      | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>Patoloji Anabilim Dalı        |
| <b>Işık Mikroskobu Kamerası –İmage sistem</b>                                  | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>Patoloji Anabilim Dalı        |

### **3.6.2. Kullanılan Sarf Malzemeler**

- MMP-1 primer antikor (ThermoFisher Scientific, lot no:QB1974628, ABD)
- MMP-8 primer antikor (ThermoFisher Scientific, Lot no: QB1974621I, ABD)
- MMP-13 primer antikor (ThermoFisher Scientific, Lot no: QB1974761, ABD)
- P-SMAD 2/3 primer antikor (ThermoFisher Scientific, Lot no #QB1974585, ABD)
- Total SMAD 2/3 primer antikor (ThermoFisher Scientific, Lot no #QB1974876, ABD)
- Beta- aktin primer antikor (ThermoFisher Scientific, Lot no #QB1974585, ABD)
- HRP bağı sekonder antikor (ThermoFisher Scientific, Lot no #2389230, ABD)
- cDNA sentez kiti (ThermoFisher Scientific, Lot no #1303184, ABD)
- SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Lot no # 4334973, ABD)
- Bleomisin (Onko Koçsel, Türkiye)
- Epigallokateşin-3-Gallat (Sigma, ABD)
- 15 ml'lik tüp (IsoLab, Almanya)
- 50 ml'lik tüp (IsoLab, Almanya)
- Steril pastör pipet (IsoLab, Almanya)
- Mikropipetler ve pipet ucu (Vertex, ABD)
- Örnek saklama kutuları (Vertex, ABD)
- Steril, DNaz, RNAz free pipet uçları (Vertex, ABD)

### **3.6.3. Yöntemler**

#### **3.6.3.1. Bleomisin ile Skleroderma Hayvan Modeli Oluşturma Deneyleri [24]**

##### **3.6.3.1.1. Amaç ve Genel İlke**

Amaç, fibrotik bir ajan olan bleomisin ile 21 gün boyunca skleroderma modeli oluşturmaktır.

Genel ilke, BLM 21 gün için uygulanan bölgede fibrozis başlatır ve bu etki sklerodermanın klinik tablosunu oluşturmaktadır [19-24]. Normal koşullarda kemoterapötik bir ajan olan bleomisin, uygulanan hastalarda yan etki olarak fibrozis oluşturmaktadır.



#### 3.6.3.1.2. Bleomisin ile Skleroderma Hayvan Modeli Oluşturma Deneyleri

Çalışmaya ortalama altı haftalık ve 20-25 gram ağırlıklarında, 32 adet *Balb/c* dişi fare alındı ve dört eşit gruba ayrıldı. Fareler, 12 saat güneş ışığı alan bir odada, özel olarak hazırlanmış kafeslerde barındırıldı. Farelerin beslenmesinde, standart fare yemi kullanılarak ve kafeslerde özel bölümlere yerleştirilmiş olan ve uç kısımlarında damlalık bulunan özel şişeler ile su verildi. Tüm farelerin sırt bölgesinde belirlenmiş olan bir bölge, subkutan (*Sc*) uygulamalar için tıraş edildi.

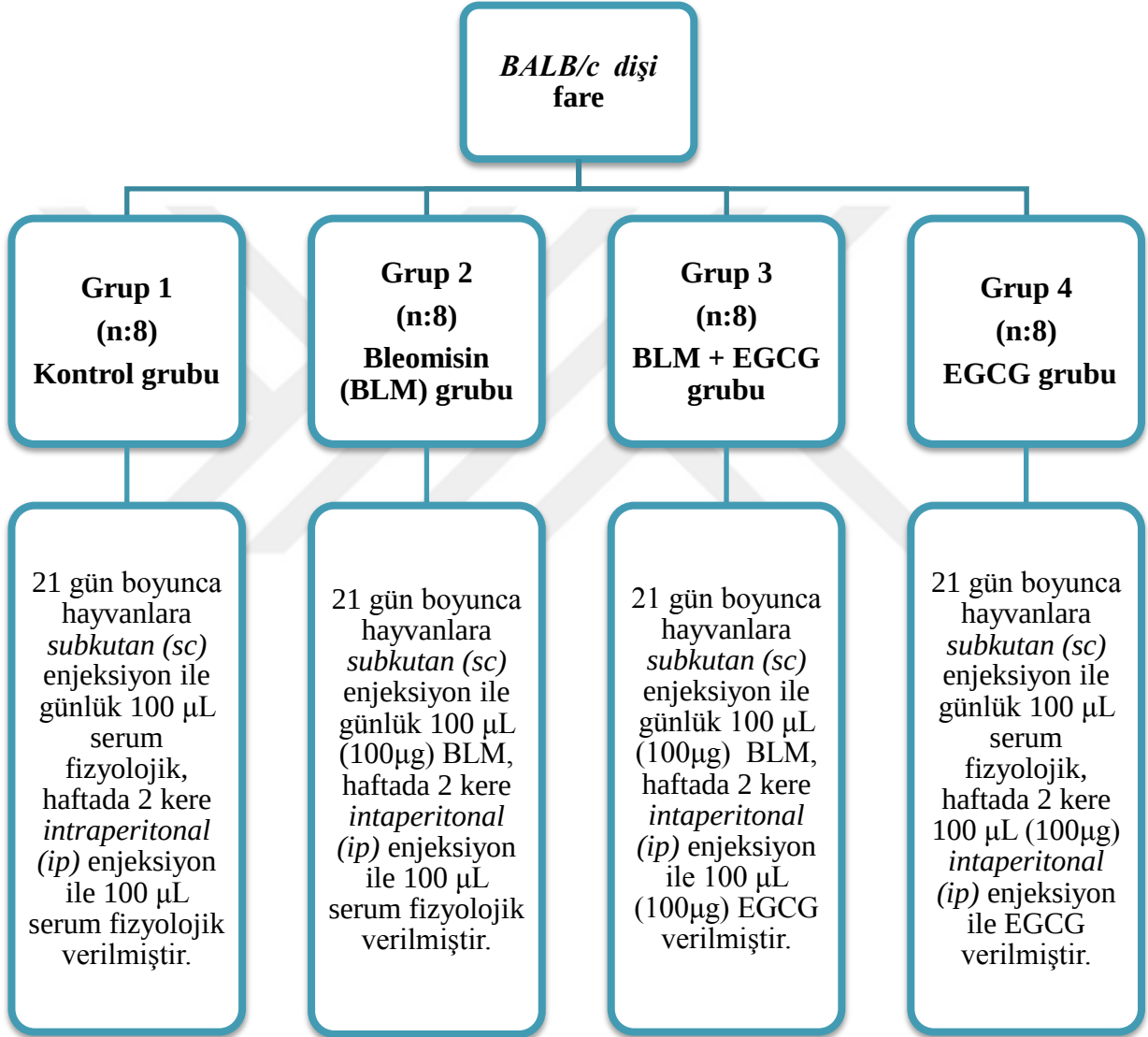
#### 3.6.3.1.3. Bleomisin ve EGCG Uygulamaları

Deneyssel skleroderma modeli için ön çalışma yapılmıştır. 100  $\mu$ L (100  $\mu$ g) ve 150  $\mu$ L (150  $\mu$ g) bleomisin (Onko Koçsel) dozları, günlük olarak, 21 gün boyunca *subkutan* (*sc*) olarak *Balb/c* dişi fareye verilmiştir. Deney sonunda, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda preparatlar incelenmiştir. 100  $\mu$ L (100  $\mu$ g) bleomisin dozunun fibrozis gelişimi için ideal doz olduğu bulundu. Bu doz ile ve aynı takvim çerçevesinde ana çalışmaya devam edildi.

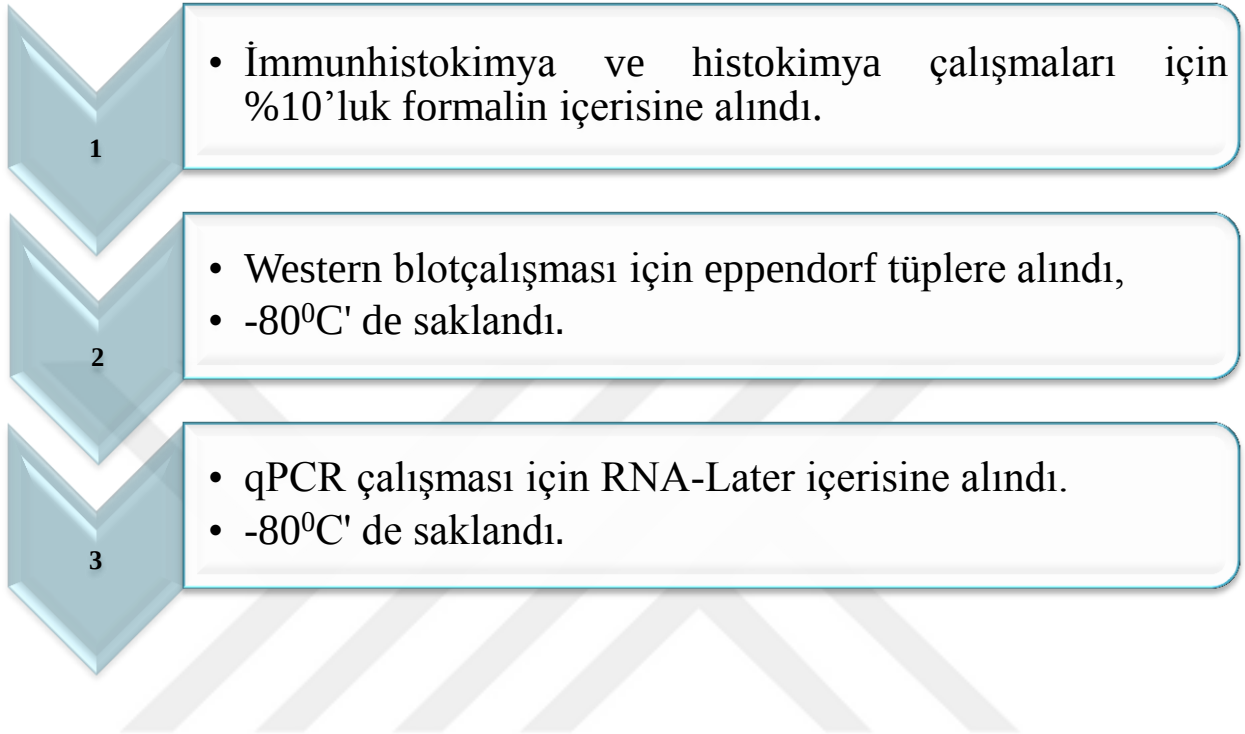
Epigallokateşin-3-Gallat (Sigma, ABD), serum fizyolojik içerisinde 20 mg/kg olarak çözüldürüldü [43]. Farelere 100  $\mu$ L *intraperitoneal* (*ip*) olarak enjekte edilmiştir. Deney hayvanı çalışmaları boyunca tutulan deney hayvanları takip formu Ek-3'te verilmiştir.

Çalışmaya ait protokol Tablo 3' te verilmiştir.

**Tablo 3.** Deney Hayvanı Araştırma Protokolü



Hayvan çalışması sonlandırıldığında deri dokuları aşağıdaki şekilde üç bölüme ayrıldı.



### 3.6.3.2. Hematoksilen Eozin ve Masson Trikrom Histokimya Boyamaları [19]

#### 3.6.3.2.1. Amaç ve Genel İlke

Bu yöntemin temel amacı, dermal dokuların hematoksilen & eozin ve masson trikrom boyamalarından dermal kalınlık kollajen birikimlerinin ölçülmesidir.

Hematoksilen & Eozin boyaması rutin histopatolojik analizlerde en sık kullanılan boya kombinasyonudur. Hematoksilen koyu mavi-mor renklidir ve nükleik asitleri boyar. Eozin pembedir ve sitoplazma, protein birikimi, amiloid gibi yapıları boyar. Tipik bir dokuda çekirdekler mavi-siyah renkte, sitoplazma ve ekstrasellüler matrix (ESM) pembenin farklı tonlarında boyanır.

Masson Trikrom ise kollajen birikimi için kullanılır. Masson Trikrom boyası, kollajeni yeşil; kas, sitoplazma, eritrositler ve fibrini kırmızı boyar. Eğer kollajen ekspresyonu artarsa yeşil tonu koyulaşır.

### 3.6.3.2.2.Uygulama Basamakları

Formalin solüsyonu içerisindeki doku örneklerinden, aynı gün içerisinde, parafin blokları hazırlandı. Bloklardan alınan kesitler Hematoksilen-Eosin ve Masson-Trikrom ile boyandı.

Hematoksilen &Eozin boyama işlemi tamamen otomatize sistem tarafından (Tissue Tek Prizma) Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda boyanmıştır.

Masson Trikrom boyaması için formalin solusyonu içerisine alınan dermal doku örneklerinden, parafin blokları hazırlandı. Bloklardan, 3 mikron kalınlığında kesitler elde edildi, lam üzerine alındı. Aşağıda belirtilen boyama basamakları uygulandı.

- Doku kesiti, 5 damla Weigert demirli hematoksilin ve 5 damla Weigert demirli hematoksilin ile kaplandı.
- 10 dakika sonra lamdan boya uzaklaştırıldı.
- Lam, oda sıcaklığında 60 dakika boyunca kurutuldu.
- Kesite, pikrik asit alkolik çözeltisi damlatıldı.
- 5 dakika inkübe edildikten sonra dH<sub>2</sub>O ile yıkandı.
- Doku kesitine fuksin çözeltisi damlatıldı.
- 5 dakika inkübe edildikten sonra dH<sub>2</sub>O ile yıkandı.
- Fosfomolibdik asit çözeltisi damlatıldı ve Masson anilin mavisi çözeltisi ile muamele edildi.
- Lam dH<sub>2</sub>O ile yıkandıktan sonra incelemeye alındı.

Işık mikroskopunda (Olympus BX-50) X40, X100, X200 ve X400 büyütmede (uzman bir patolog tarafından incelenerek) fibroz dereceleri belirlendi. Dermal kalınlık (epidermo-dermal bileşke ile dermis-subkutan yağ dokusu bileşkesi arası uzunluk) için, her bir denekte, en az iki farklı preparatta, X100 büyütmede, en az 5 farklı ölçümün ortalaması alındı. Yangı H&E boyalı kesitlerde yarı nicel skorlandı; 0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli olarak sınıflandırıldı.

İnflamasyon bulguları, grupların skor ortalamaları alınarak verildi. Masson trikrom bulguları dermal kalınlık (µm) olarak verilmiştir.

### **3.6.3.3. Alfa Düz Kas Aktin Antikoru ile İmmunhistokimya Boyamaları**

#### **3.6.3.3.1.Amaç ve Genel İlke**

Bu yöntemin temel amacı, dermal dokuları  $\alpha$ - düz kas aktin ( $\alpha$ -SMA) antikoru ile boyayarak myofibroblast hücrelerini belirlemektir.

$\alpha$ - düz kas aktin, düz kas hücrelerinin farklılaşma durumlarını ortaya koyan spesifik bir belirleyicidir. Normal dermal hücrelerin fibrozis sürecinde myofibroblast hücrelerine dönüşme sürecinde belirteç olarak kullanılır.

#### **3.6.3.3.2.Uygulama Basamakları**

Formalin solusyonu içerisine alınan dermal doku örneklerinden, parafin blokları hazırlandı. 3 mikron kalınlığında elde edilen kesitler poly-l-lysine kaplı lam üzerine alındı. Kesitler etüvde yaklaşık  $60^0$  C'de 2-3 saat bekletilerek deparafinize edildi. Lamalar cihaza (Ventana Benchmark Ultra) yerleştirildi.  $\alpha$ - düz kas aktin antikoru uygulanacak olan preparatlarda antiijen açığa çıkarma uygulandı. Primer antikor (Santa Cruz, ABD) 1/300 dilüsyonda damlatılarak 40 dk inkübe edildi. Ultra view Universal DAB Detection kit sekonder antikoru uygulandı. Hematoksilen ile 8 dk kontrast boyama uygulandı. Kesitler otomatik kapama cihazında (Sakura, Tissue-Tek Film) kapatıldı.

Dermal alandaki  $\alpha$ -SMA pozitif ( $\alpha$ -SMA+) fibroblastik hücre sayısını saptamak için her bir denekte, en az iki farklı preperatta, X400 büyütmede, en az 5 farklı alanda  $\alpha$ -SMA+ hücre sayısı belirlenip, ölçümün ortalaması alındı. Bulgular gruplardaki pozitif ( $\alpha$ -SMA+ ) hücre sayısı olarak verilmiştir.

### **3.6.3.4. MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve p-SMAD 2/3 Proteinl Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi ile Analizi [11, 12]**

#### **3.6.3.4.1.Amaç ve Genel ilke**

Bu yöntemin temel amacı, dermal doku homojenatlarından MMP-1, MMP-8, MMP-13, p-SMAD 2/3 protein ekspresyon düzeylerini belirlemektir.

Western Blot; dokudaki spesifik bir proteini analiz etmemizi sağlayan moleküler biyoloji tekniğidir. Bu teknik dokuda bulunan bir proteinin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonu, konsantrasyon değişimlerinin saptanması ve farklı gruplar arasındaki konsantrasyonlarının karşılaştırılması için kullanılır.

Western Blot analizi, poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmış olan protein karışımının içinde düzeyini ölçmeyi planladığımız proteinin buna özgül antikorunun kullanılması ve bu proteinin düzeyinin belirtimi amacıyla yapılmaktadır. Yöntem, poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinlerin ayrılması, proteinlerin membrana transferi ve ilgili proteinlerin görünür ve düzeyi ölçülebilir hale getirilmesi şeklinde üç aşamadan oluşmaktadır.

Tüm western blot deneyleri üç kez tekrarlanmış ve bulguların ortalaması alınmıştır.

#### **3.6.3.4.2. Protein Saflaştırılması**

- Dermal doku örnekleri Tripure isolation reagent (Sigma Aldrich, Almanya) ile tissue Lyser'da (Qiagen, Almanya) homojenize edildi.
- Homojenat 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 1: 5 oranında kloroform ilave edildi ve vortekslendi.
- 12,000 g'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi.
- Üst faz alındı, RNA elde edildi. RNA'lar qPCR deneylerde kullanılmak üzere 80° C ' de saklandı.
- Toplam proteinin izolasyonu için, altta kalan organik faza % 1 gliserol+ izopropanol edildi.
- Üç kez % 95 etanol+ 0.3 M guanidin hidroklorit ile yıkandı.

- Aralıklı vorteksleme yapılarak, % 1 sodyum dodesil sülfat (SDS) içerisinde organik faz çözündürüldü.
- Toplam protein ekstraktları western blotting yönteminde kullanılmak üzere temiz tüplere aktarıldı, -80 ° C ' de saklandı.

#### 3.6.3.4.3. Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması

Elde edilen proteinin ölçümünde biçinkonik (BCA) protein ölçüm yöntemi kullanıldı. Bu amaçla ThermoFisher marka (ThermoFisher Scientific, ABD) protein tayin kiti kullanıldı. Yöntemde bakır sülfat'ın BCA çözeltisine eklenmesi ile çözelti elma yeşili bir renk alır. Bu çözeltide bulunan  $\text{Cu}^{+2}$  iyonları alkali koşullarda, bir değerlikli  $\text{Cu}^{+}$  iyonlarına indirgenerek, protein çözeltisi ile karıştırıldığında, proteinin peptid bağları ile etkileşerek mavi-mor renkli bir kompleks oluşmaktadır. Mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

- Protein standartı olarak bidistile su içerisinde 0 µg/ml, 25µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml konsantrasyonlarında sığır serum albümini (BSA) standartları hazırlandı.
- Standartlardan ve örneklerden 25'er µl 96' lık kuyucuklu plağa konuldu.
- Çalışma çözeltisi; A reaktifi (biçinkonik asit solüsyonu, sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, biçinkonik asit ve sodyum tartarat) ve B reaktifinin (bakır sülfat solüsyonu) 1:20 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı.
- 200 µl çalışma ayırıcı (protein assay), kuyucuklara eklendi.
- 96 kuyucuklu plak, 37<sup>0</sup>C' de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Oluşan mavi renk gözlemlenerek 562 nm' de spektrofotometrede (Biotek, Synergy HT, ABD) absorbans ölçüldü. Oluşturulan standart eğriye göre örneklerdeki protein miktarları µg/µl olarak hesaplandı.

#### 3.6.3.4.4. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Jelin Hazırlanması

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi olarak adlandırılan elektroforezde; sodyum dodesil sülfat (SDS), ısı ile birlikte bir indirgeyici ve denatüran olarak kullanılmaktadır. Proteinler ya ditiyotritol (DTT) ya da SDS varlığında ısıtılarak denatüre edilmektedir. SDS, anyonik bir ajan olup, proteinlerin primer yapıda kalmalarını sağlayan bir deterjandır. Proteinler sabit ağırlık oranında SDS'e bağlanırlar, bu sayede tüm proteinler eşit yük yoğunluğuna sahip olmaktadır. SDS ile muamele edilen proteinler negatif yüklerinden dolayı elektriksel alanda pozitif kutba doğru göç ederler.

Bio-Rad marka vertikal elektroforez sistemi, elektroforez tankı, jel kabı ve güç kaynağından oluşmaktadır.

- Çalışmalara jellerin hazırlanması ile başlandı. 1cm aralık oluşturacak şekilde iki cam vertikal elektroforez sistemine yerleştirildi.
- Sızıntı olup olmadığı su ile kontrol edildi. Tablo 5' de gösterildiği gibi ayırıcı monomer karışımı hazırlandı. Hazırlanan jel çözeltisi pipet yardımıyla iki cam arasındaki boşluğa döküldü. Poliakrilamid jeller monomerik akrilamidin poliakrilamid zincirlere polimerize olması ve N,N'-metilen-bis akrilamid tarafından çapraz bağlanması sonucu oluşmaktadır. Polimerizasyon reaksiyonu APS'nin eklenmesi ile başlamaktadır. Reaksiyon APS'den serbest radikallerin oluşmasını katalize eden TEMED ile hızlandırılmaktadır.
- Jelin üst sınırının düzgün olması için üzerine izopropanol eklendi.
- Jel polimerize olduktan sonra üstteki izopropanol boşaltıldı.
- Paketleyici jel çözeltisi Tablo 6'daki gibi hazırlandı ve ayırıcı jelin üzerine döküldü. 12 kuyulu tarak 45° açı ile iki cam arasına yerleştirildi. Polimerizasyon için bir süre beklendi.
- 25 µg protein ile total hacim 1 X olacak şekilde 5 X yükleme tamponu ve %10 oranında β-merkaptoetanol karışımı eklendi.
- Protein karışımını içeren ependorf tüpler 95°C'de 5 dk inkübe edilip ardından +4 °C'e alındı.



- Dikey elektroforez tankına 10 kuyucuklu %12 konsantrasyonunda ayırıcı jel, %4 konsantrasyonunda ise paketleyici jel hazırlandı.

**Tablo 4.** SDS–PAGE Yönteminde Ayırıcı Jelin (%12) İçeriği

| Bileşenler                  | %12    |
|-----------------------------|--------|
| ddH <sub>2</sub> O          | 3.85ml |
| 3 M Tris-HCl                | 1.25ml |
| %20 SDS                     | 50 µl  |
| %40 akrilamid-bis akrilamid | 4.8 ml |
| %10 APS                     | 200 µl |
| TEMED                       | 20 µl  |

**Tablo 5.** SDS–PAGE Yönteminde Paketleyici Jelin (%4) İçeriği

| Bileşenler                  | %4      |
|-----------------------------|---------|
| ddH <sub>2</sub> O          | 7.35 ml |
| 1.5 M Tris-HCl              | 1.25 ml |
| %20 SDS                     | 50 µl   |
| %40 akrilamid-bis akrilamid | 1.34 ml |
| %10 APS                     | 100 µl  |
| TEMED                       | 20 l    |

#### **3.6.3.4.5. Örnek Hazırlanması**

Protein örnekleri kuyucuk başına 25 µL’de 25 µg olacak biçimde hazırlandı ve 95°C’de 5 dakika tutuldu.

#### **3.6.3.4.6.Jelin Yüklenmesi**

Paketleyici jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartıldı. Jel bulunan cam, elektroforez tankı içine yerleştirildi ve running tamponu (Running stok: Tris 15.1 g, Glisin 72 g, SDS 5 g, dH<sub>2</sub>O 1000 ml’de) ile dolduruldu. Kuyulara protein örnekleri ve Bir kuyuya da proteinlerin büyüklüklerini tahmin etmek amacıyla içinde bilinen büyüklüklerde çeşitli proteinler bulunan önceden boyalı büyüklük belirteci (prestained size marker) yüklendi.

#### **3.6.3.4.7.Elektroforetik Yürütme**

Örnek yüklendikten hemen sonra tank sisteminin üzeri kapatıldı. Tank sistemi güç sistemine bağlandı. Örnekler ayırıcı jele girinceye kadar 70 Volt gerilim uygulandı. Örnekler ayırıcı jele geçtikten sonra, gerilim 100 Volt’a çıkarıldı. Örneklerin yürümesi takip edildi. Standart takip edilerek istenilen yol geçildikten sonra akım kesildi ve tank sistemi güç kaynağından alındı.

#### **3.6.3.4.8.Proteinlerin Membrana Transferi**

Proteinlerin membrana transferi için ıslak transfer yöntemi uygulandı. Transfer tamponu içinde transfer kasetinin siyah kapağı tarafına sırası ile; sünger, 2 adet whatmann kağıdı, jel, membran, 2 adet whatmann kağıdı ve tekrar sünger konuldu ve aralarındaki hava kabarcıkları çıkarılarak, dikkatlice sandviç yapıldı ve kasetin kapağı kilitlendi. Transfer tankının kaset bölümünün siyah yüzeyine kasetin siyah tarafının gelmesine dikkat edilerek transfer kasetleri tanka yerleştirildi. Tanka buz kabı yerleştirildi, transfer tamponu ile tank dolduruldu ve tank kapağı elektrotlara dikkat edilerek yerleştirildi. Manyetik karıştırıcı üzerinde, 300 mAmp’de +4°

C' de 1 saat transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer kasetinin siyah tarafı (–) yüklü anot görevi yaparken, diğer taraf (+) yüklü katot görevi yapar; böylelikle SDS muamelesi ile negatif yüklü hale gelen proteinlerin jelden membrana göçü sağlanır.

#### **3.6.3.4.9. Jelde Proteinlerin Coomassie Blue Boyası ile görüntülenmesi**

Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası nonspesifik olarak çoğu proteine bağlanmaktadır. Proteinlerin eşit miktarda yüklenip yüklenmediğinin ve blotlama işleminin kontrolü için yapılan bir uygulamadır. Jel, transferden sonra boya solusyonuna alındı ve oda sıcaklığında, 30 dakika boyunca çalkalanarak bekletildi. Protein bantların daha belirginleşmesi için jelin boyasının uzaklaştırılması amacıyla jel önce distile su ile yıkandı ve destain (boya uzaklaştırıcı) solüsyonuna alındı. Oda sıcaklığında karıştırılarak jel boyasızlaştırıldı. Görüntüsü alındı.

**Boyanın Hazırlanması:** 0.006 %' lık Coomassie Brilliant Blue R-250 çözeltisi, 40 % metanol ve 10 % asetik asit içeren distile su ile oluşturulan bir karışım içerisinde çözündürüldü. Bunun için, tartılan coomassie boyası (6 mg), çeker ocak altında, önce 50 ml distile su ve 40 ml metanolden oluşan karışımında çözündürüldü ve bu karışıma 10 ml asetik asit eklendi. Bu çözelti oda sıcaklığında saklanabilmekte ve tekrar kullanılabilir.

**Destain Solüsyonunun Hazırlanması:** 10 ml metanol, 10 ml asetik asit 80 ml distile su içerisinde karıştırılarak destain çözeltisi hazırlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

#### **3.6.3.4.10. Bloklama**

Transfer sonrasında membran, blotlama sırasında özgül olmayan bağlanmaların engellenmesi için; % 5 yağsız süt tozu ve % 0.5 Tween-20 içeren TBS tamponu ile muamele edilerek 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak bloklama işlemi gerçekleştirildi.

#### **3.6.3.4.11. Primer Antikor ile İnkübasyon**

Bloklamadan alınan membranlar 3 kez Tween-20 içeren TBS (TBST) tamponu ile yıkandı. 1:500 oranında Rabbit poliklonal MMP-8 (Thermo, USA), 1:1000 oranında Rabbit poliklonal MMP-1 (Thermo, USA), 1:1000 oranında Rabbit poliklonal MMP-13 (Thermo, USA), 1:1000 oranında Rabbit poliklonal p-SMAD (Thermo, USA) antikorları TBST ile hazırlandı.

Membranlar hazırlanan primer antikorlar ile 1 gece +4 ° C'de bekletildi. Ertesi gün alınarak 3 kez 15' er dakika TBST ile yıkandı ve bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı.

#### **3.6.3.4.12. Sekonder Antikor ile İnkübasyon**

Primer antikor inkübasyonundan alınan ve yıkanan membranlar 1:3000 oranında Anti-rabbit sekonder antikor (Thermo, USA) ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Membranlar tekrar 3 kez 15' er dakika TBST ile yıkandı ve bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı.

#### **3.6.3.4.13. Görüntüleme**

Tüm yıkamalar sonrasında deteksiyon kiti (Millipore, Luminata, Forte Western HRP) kullanılarak proteinlerin deteksiyonu yapıldı. Kit direktiflerine göre hazırlanan reaktif solüsyonundan membranı kaplayacak miktarda membran üstüne yayılarak 5 dakika bekletildi. Bu süreçte sekonder antikorlara bağlı olan peroksidaz enzimleri reaktifteki substratlarını parçalamakta ve sonuçta modifiye substrattan kimyasal bir ışımaya oluşmaktadır. Membranlar bir kaset içine alındıktan sonra üzerlerine kemiluminesansa duyarlı film (Kodak, 5256441) koyulup yeterli süre beklendi ve film yıkanarak protein bantları görüntülendi.

#### **3.6.3.4.14. Dansitometrik Analiz**

Protein bant yoğunlukları IMAGE-J Analysis Software programında değerlendirildi. Veriler -beta aktine oranlanarak standardize edildi. Bulgular MMP-1/β- Aktin, MMP-8/β- Aktin, MMP-13/β- Aktin, p-SMAD 2-3 / total SMAD 2-3 oranları olarak verilmiştir.

### **3.6.3.5.Deney Gruplarında TGF-Beta1 Gen Ekspresyonun RNA Düzeyinde RT-qPZR ile Belirlenmesi**

#### **3.6.3.5.1.Amaç ve Genel İlke**

Bu yöntemde temel amaç, dermal dokulardaki TGF- $\beta$ 1 gen ekspresyonlarının belirlenmesidir.

RT-qPZR, ortamda polimeraz enzimi ve sentez için diğer uygun moleküllerin bulunması durumunda, RNA dizisinin seçilip tanınması ve sayısal olarak artırılması esasına dayanan bir yöntemdir. Gen ekspresyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Tüm RT-qPZR deneyleri üç kez tekrarlanmış ve bulguların ortalaması alınmıştır.

#### **3.6.3.5.2. Dermal Dokulardan Total RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini**

Protein eldesi kısmında anlatılan RNA'ların eldesine burada devam edildi. Tüm örnekler RNaz içermeyen suda çözüldü. Örnekler çözüldükten sonra RNA'nın saflığını kontrol etmek ve konsantrasyonunu hesaplamak için nanodrop cihazında (Thermo, ABD) uygun pipetler kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

#### **3.6.3.5.3.Total RNA'lardan cDNA Sentezlenmesi**

Dermal dokulardan total RNA izole edilip konsantrasyonları ve kalitesi belirlendikten sonra bu RNA'lardan 1  $\mu$ g kullanılarak cDNA sentezlendi. cDNA sentezinde The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo, USA) kullanıldı. 1  $\mu$ g total RNA ve 0.2  $\mu$ g/  $\mu$ l random primer, dH<sub>2</sub>O içerisinde hazırlandıktan sonra 65 °C'de 5 dk inkübe edildi. Daha sonra karışıma 5x reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü (20 u/  $\mu$ l), dNTP (10 mM) ve en son Reverse Transcriptase (200 u/  $\mu$ l) eklendi ve 25 °C'de 5 dk, 42 °C'de 60 dk inkübe edilerek cDNA sentezi bir termal cycler (Bio-Rad, ABD) içerisinde yapıldı. Tüpler 70 °C'de 5 dk. tutularak reaksiyon sonlandırıldı.

#### 3.6.3.5.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR)

Tek iplik cDNA sentezlendikten sonra bu cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak TGF-Beta genine spesifik primerler aracılığıyla RT-qPZR kuruldu. Ayrıca kontrol olarak da GAPDH genine spesifik primerler kullanıldı. Primer optimizasyonu için farklı primer konsantrasyonları, farklı termal profiller gibi değişkenler uygulandı. Optimizasyon sonucunda RT-qPZR reaksiyonları kuruldu. Kullanılan primer dizileri aşağıdaki gibidir:

Fare TGF- $\beta$ 1 Reverse 5'-CTGTATTCCGTCTCCTTGGTTCA-3'

FareTGF- $\beta$ 1 Forward 5'-GCCTGAGTGGCTGTCTTTTGA-3'

Fare GAPDH Reverse 5'- TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'

Fare GAPDH Forward 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'

cDNA'lar, spesifik primerlerin varlığında Roche 2.0 Real Time PCR cihazında (Roche, USA) Luminaris HiGreen qPCR Master Mix (Thermo, USA) kullanılarak amplifiye edildi. Negatif kontrol için nukleaz-free su kullanıldı. Real Time PCR reaksiyonu için tablo 7' deki reaksiyon karışımı hazırlandı ve 20  $\mu$ L'lik reaksiyon karışımı kapillerlere pipetlendi.

**Tablo 6.** RT-qPZR Reaksiyon Karışım İçerikleri

| Kimyasal                             | Eklenen Miktar | Son konsantrasyon |
|--------------------------------------|----------------|-------------------|
| Luminaris SYBR green qPCR Master Mix | 10 $\mu$ L     | 1X                |
| Forward Primer (10 $\mu$ L)          | 0,3 $\mu$ L    | 0,3 $\mu$ M       |
| Reverse Primer (10 $\mu$ L)          | 0,3 $\mu$ L    | 0,3 $\mu$ M       |
| cDNA örneği                          | 5 $\mu$ L      | 100ng             |
| Nükleaz free su                      | 4,4 $\mu$ L    |                   |
| Toplam                               | 20 $\mu$ L     |                   |

mRNA düzeylerindeki değişimler  $\Delta\Delta CT$  yöntemine göre analiz edildi ve housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı. Bulgular,  $\Delta\Delta CT$  hesaplama sonuçlarına göre, ekspresyon katsayısı olarak verilmiştir.

### 3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırmanın Etik Kurul Onayı Aralık 2012’ de alınmıştır. Deneysel çalışmalar 2014-2017 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Ayrıntılı çalışma planı Tablo 3’ te verilmektedir.

**Tablo 7.** Araştırma Takvimi

|                                    |                                                                                                                                                          |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>2014 Nisan</b>                  | Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2014.KB.SAG.024 protokol numarası ile maddi olarak desteklenmiştir. |
| <b>2014 Kasım</b>                  | Çalışma, Tübitak Bideb-2211-C programı tarafından desteklenmiştir ve bursiyerlik hakkı kazanılmıştır.                                                    |
| <b>2015 Ocak-Şubat</b>             | Projenin malzeme ve hizmet satın alımları tamamlanmıştır.                                                                                                |
| <b>13. 04. 2015 - 03. 05. 2015</b> | Deney Hayvanı çalışmaları tamamlanmıştır.                                                                                                                |
| <b>2015-2017</b>                   | Projenin tüm laboratuvar çalışmaları tamamlanmıştır.                                                                                                     |
| <b>2017-2018</b>                   | Orpheus kapsamında değerlendirilmesi amacıyla çalışmaya ait yayınlar tamamlanmıştır.<br>Tez yazım süreci tamamlanmıştır.                                 |

### **3.8. Verilerin Değerlendirilmesi**

Çalışma tamamlandıktan sonra elde edilen verilerin istatistikler analizleri, SPSS (v20.0, SPSS Inc., Chicago, IL) istatistik programında yapıldı. Süreklilik arz eden değişkenler ortalama±standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki olası farklılıkların anlamlılığı ANOVA Sidak, Student t testleri ile değerlendirildi. P değerinin <0.05 olması istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

### **3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları**

Çalışmamızın potansiyel sınırlılığı sadece bleomisinle oluşturulmuş skleroderma modeli üzerinde gerçekleştirilmiş olmasıdır. Daha geçerli ve kapsamlı bir çalışma olması için birçok skleroderma hayvan modelinde de deneylerin yapılması gerekmektedir. Ancak diğer modeller iç organ fibrozunu iyi yansıtsalar dahi, insanda gelişen dermal fibrozu iyi mimik edememektedir. Bu sebeple, çalışmanın sınırlılığı olmaktan çıkmaktadır.

### **3.10. Etik Kurul Onayı**

Araştırma protokolü, Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu (Protokol No: 79/2012) tarafından onaylanmıştır.

### **3.11. Araştırmanın Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Kabulü**

Araştırma bütçesi, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (2014. KB. SAG.024) tarafından kabul edilmiştir.



#### 4. BULGULAR

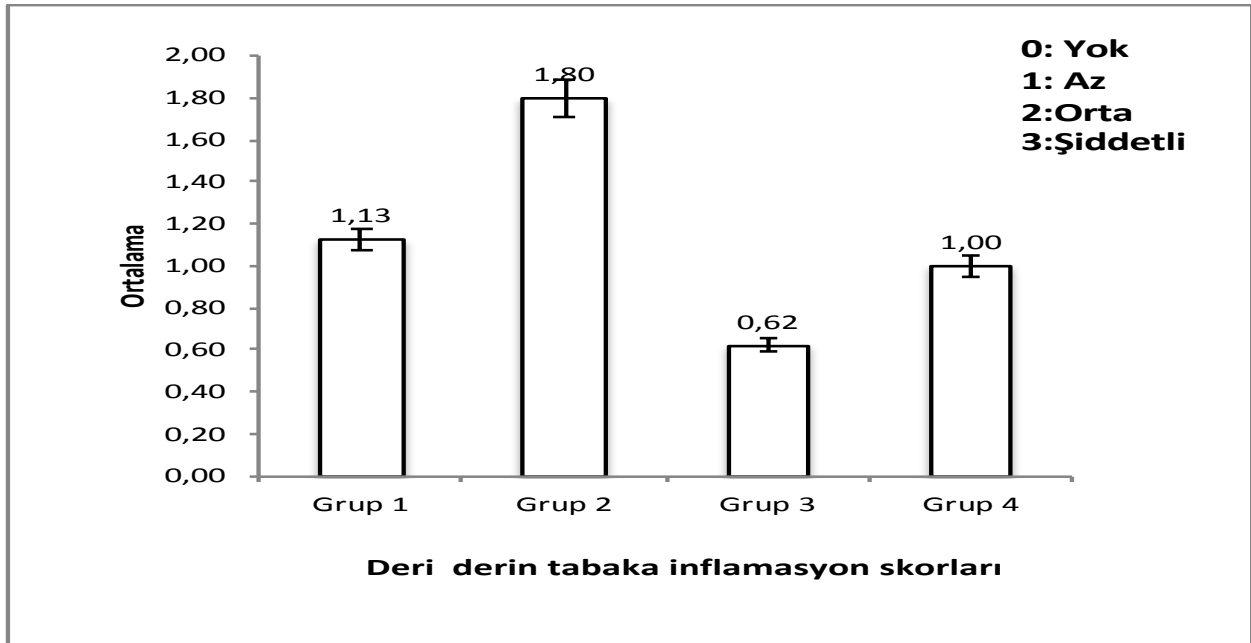
##### 4.1. EGCG'nin Skleroderma Oluşumunda Fibrozise Etkilerinin Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi

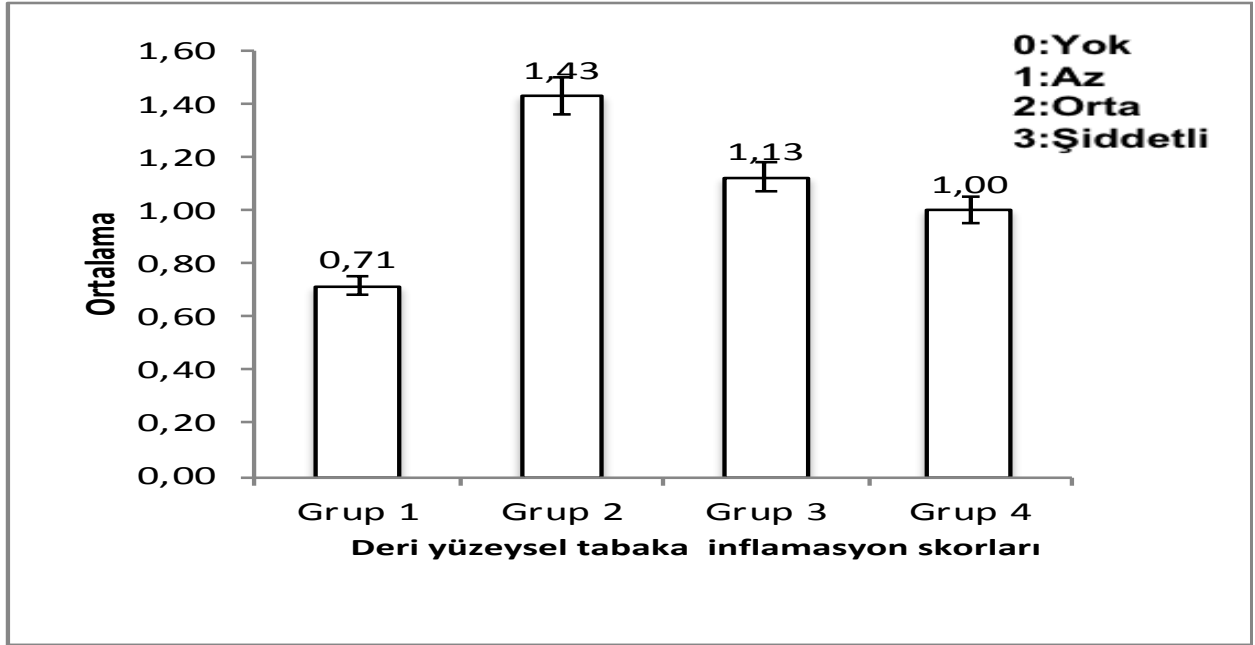
###### 4.1.1. Histokimyasal Boyama Analizleri

21. gün sonunda sakrifiye edilen farelerde histopatolojik değerlendirmede dermal fibrozun olduğu görüldü.

Hematoxilen & Eozin boyamalarda derinin yüzeysel tabaka ve derin tabaka skorlamalarında gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Derinin yüzeysel tabaka yangı skorlamasında gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Ancak derinin derin tabaka yangı skorlamasında grup 1 (kontrol grubu) ve grup 2 (BLM grubu) arasında anlamlı fark bulunmuştur. Bununla birlikte grup 3 (Bleomisin + Epigallocateşin-3-Gallat) ve grup 2 (Bleomisin) grubu arasında da anlamlı fark bulunmuştur ( $p:0.000$ ) (Şekil 3 a ve b)

**a**

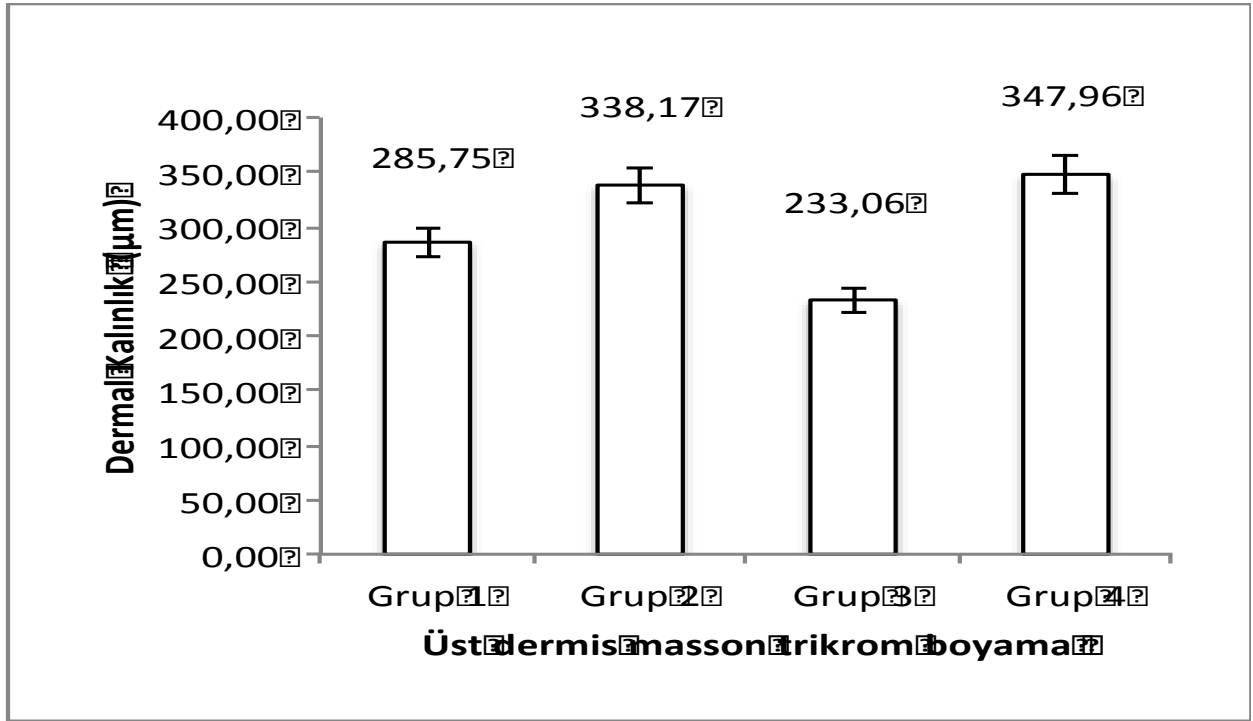


**b**

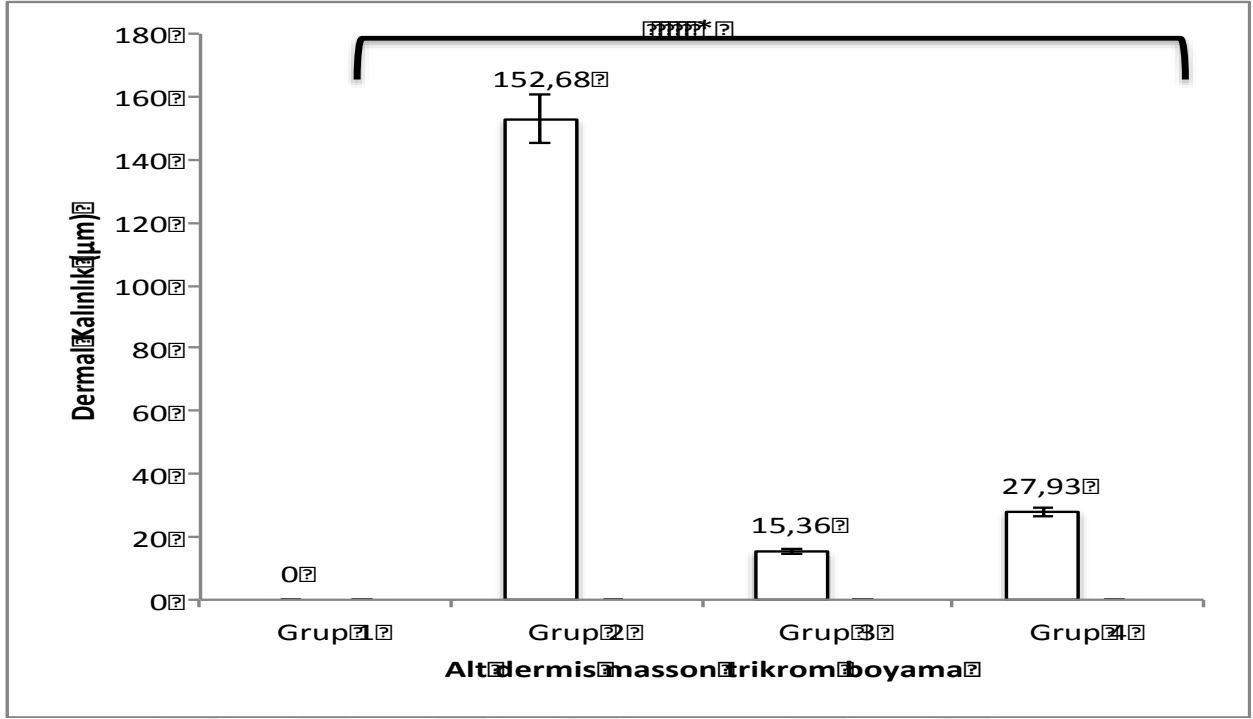
**Şekil 3.** Çalışma Gruplarında Dermal İnflamasyon Skorları. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. **a)** Deri Derin Tabaka İnflamasyon Skorları, **b)** Deri Yüzeyel Tabaka İnflamasyon Skorları. İnflamasyon skorları, beş alanın ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Masson trikrom boyama sonuçlarına göre gruplar arasında üst dermis kalınlıkları arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Alt dermis kalınlıkları arasında ise grup 1 (kontrol grubu) ve grup 2 (Bleomisin grubu) arasında anlamlı fark bulunmuştur. Bununla birlikte grup 2 (BLM grubu) ve grup 3 (Bleomisin + Epigallokateşin-3-gallat) arasında da anlamlı fark bulunmuştur ( $p:0.000$ ) (Şekil 4 a ve b, Şekil 5) .

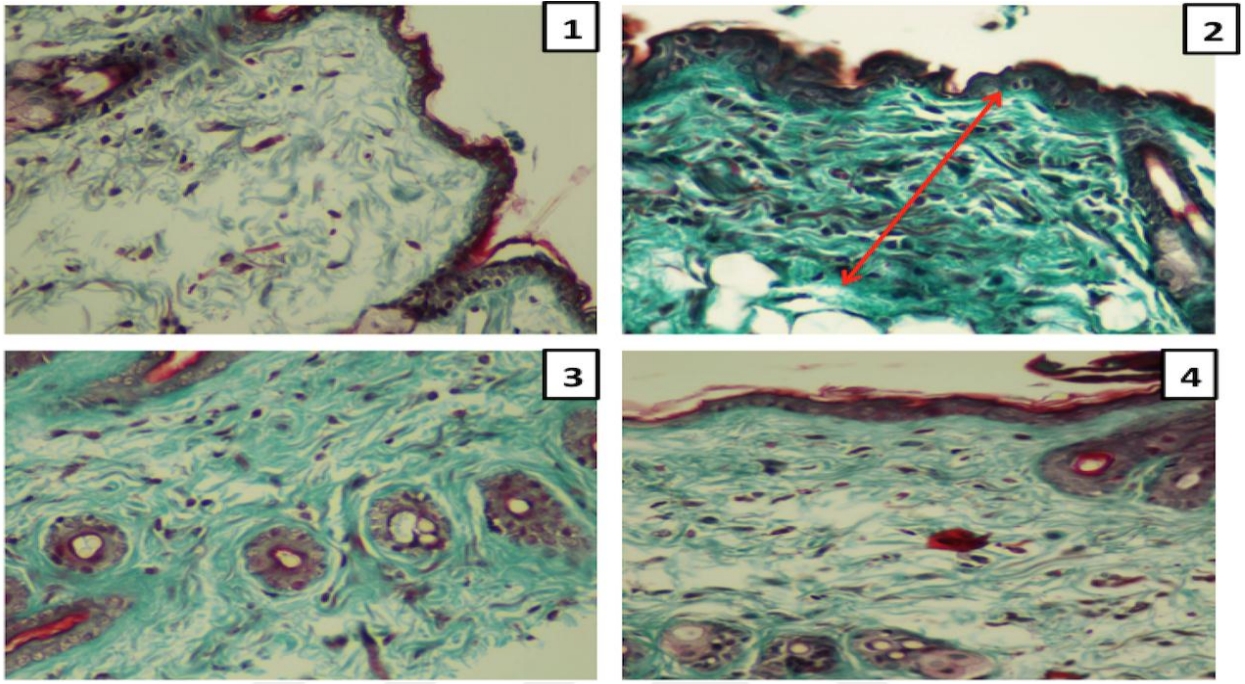
**a**



**Şekil 4a.** Çalışma Gruplarında Masson Trikrom Boyama ile Elde Edilmiş Üst Dermis Kalınlıkları. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. Dermal kalınlık µm olarak hesaplanmıştır.

**b**

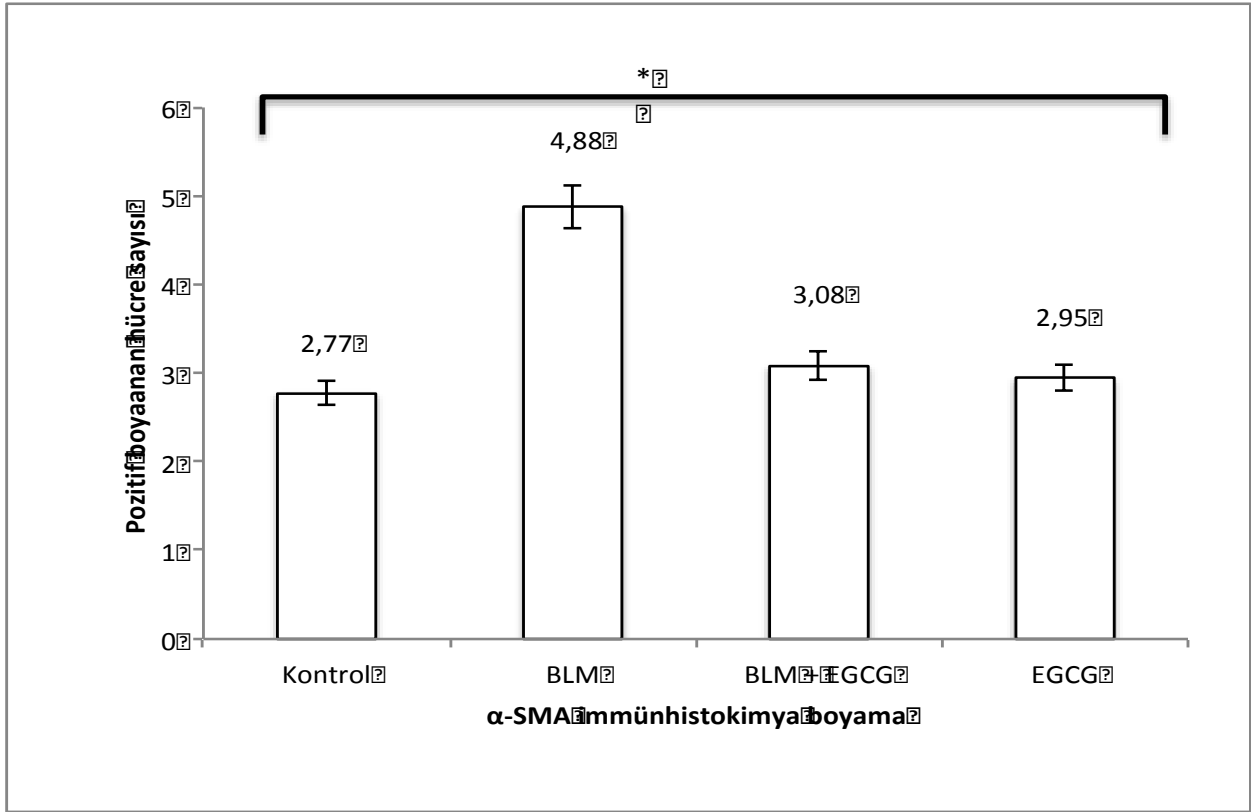
**Şekil 4b.** Çalışma Gruplarında Masson Trikrom Boyama ile Elde Edilmiş Alt Dermis Kalınlıkları. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu.



**Şekil 5.** Çalışma Gruplarında Masson Trikrom Boyamaları. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. Yeşil boyama alanları kollajeni ifade etmektedir.

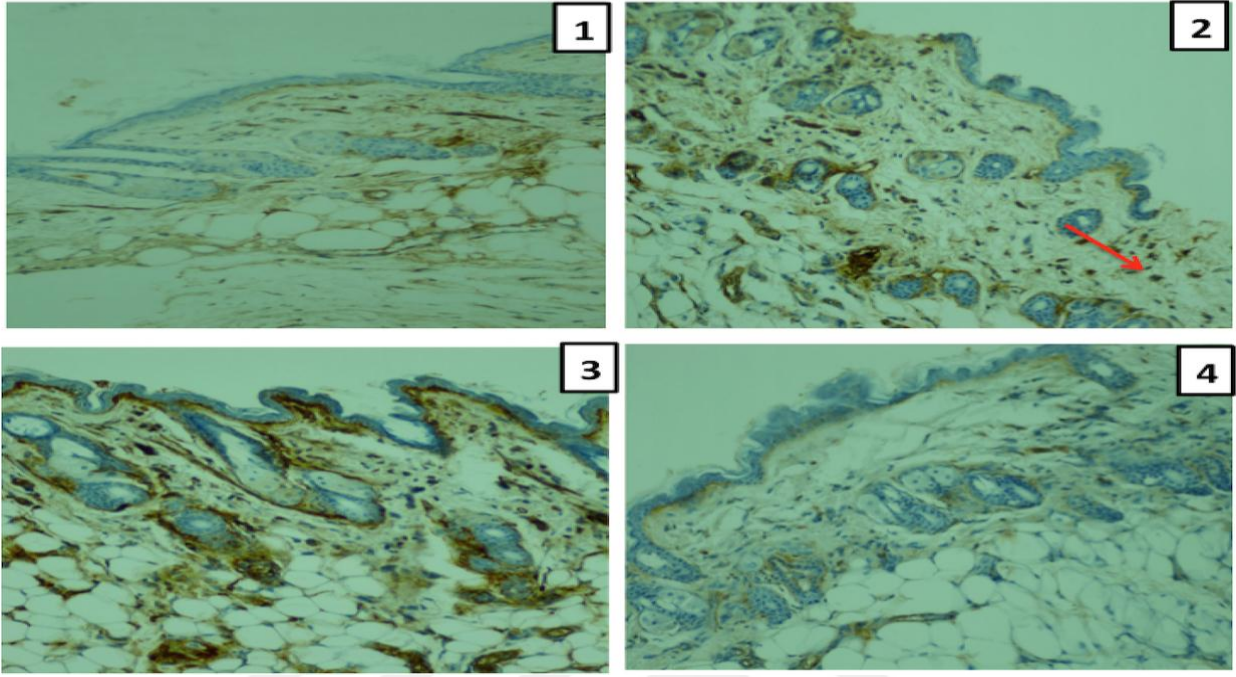
#### 4.1.2. İmmünohistokimya Boyama Analizleri

Çalışma grupları karşılaştırıldığında, dermal alandaki  $\alpha$ -SMA+ hücre sayısında grup 1 (kontrol grubu) ve grup 2 (BLM) arasında; grup 2 (BLM) ve grup 3 (BLM+EGCG) arasında anlamlı farklılık bulunmuştur (p:0.0035) Grup 3, EGCG uygulanan grupta  $\alpha$ -SMA+ hücre sayıları azalmıştır (Şekil 6, Şekil 7).



**Şekil 6.** Çalışma Gruplarında  $\alpha$ -SMA+ Hücre Sayıları. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. 5 farklı alanda  $\alpha$ -SMA+ hücre sayısı ortalaması verilmektedir.

Ortalama  $\alpha$ -SMA+ hücre sayısı, BLM grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı yüksek bulundu. Ancak, BLM + EGCG grubu ve BLM grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı düşük bulundu.

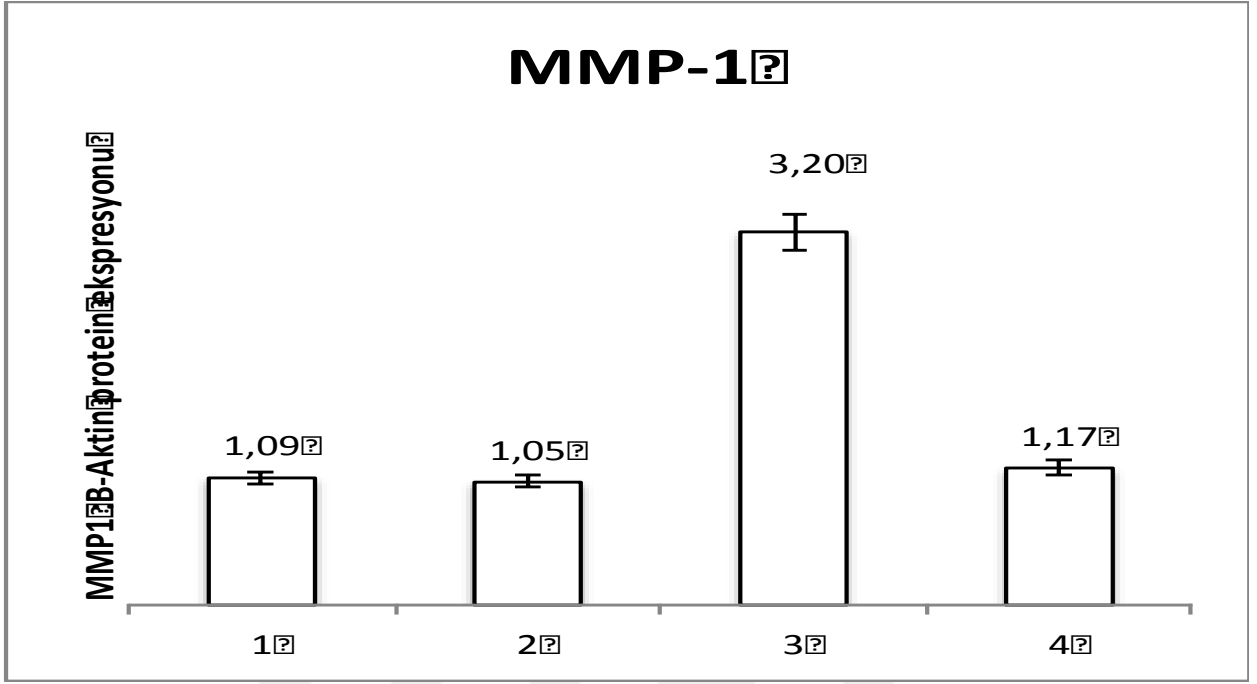


**Şekil 7.** Çalışma Gruplarında  $\alpha$ -SMA+ Boyamaları. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu

#### **4.2. MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve p-SMAD 2/3 Proteinlerinin Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi ile Analizi**

##### **4.2.1. Kontrol ve Deney Gruplarında MMP-1 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Gösterilmesi**

Dermal doku homojenatlarında çalışılan MMP-1/  $\beta$ -Aktin protein oranı ekspresyonu, grup 2 (BLM grubu) ve grup 3 (BLM + EGCG) arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. EGCG uygulanan grup 3'te ise grup 2'ye oranla anlamlı olarak artmıştır (Şekil 8).

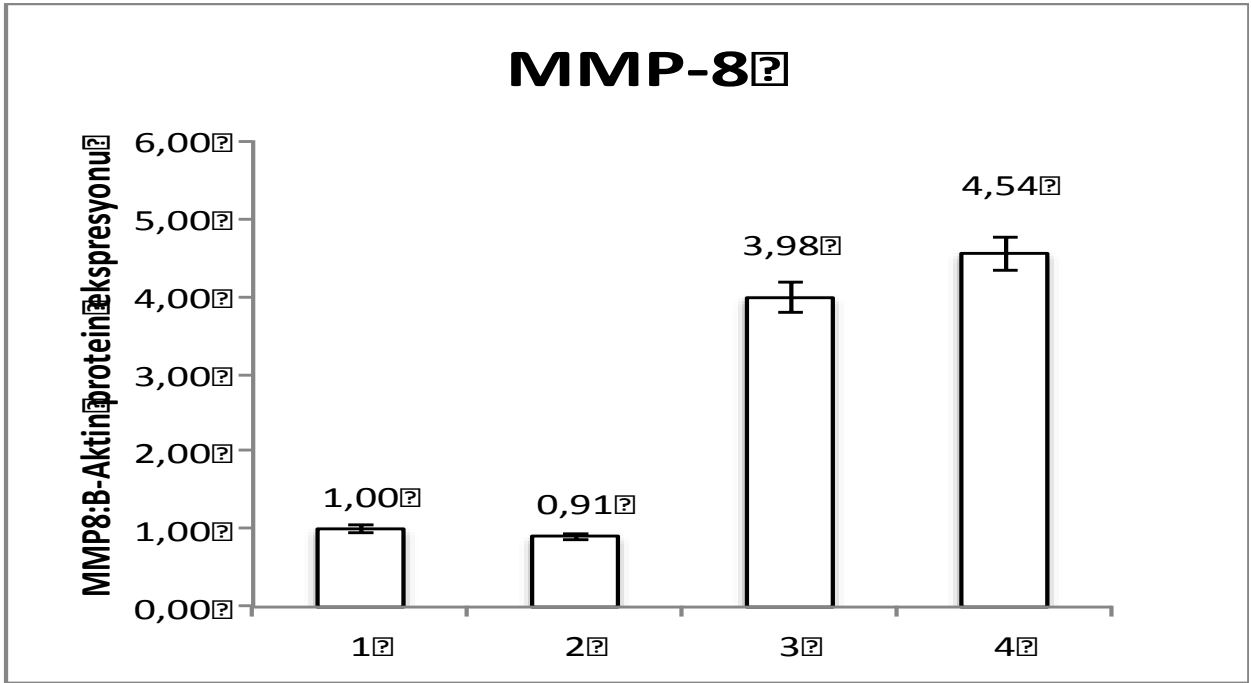


**Şekil 8.** Çalışma Gruplarında MMP-1 Protein Ekspresyon Düzeyleri. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. MMP-1/  $\beta$ -Aktin bant yoğunluk oranları verilmektedir.

#### 4.2.2. Kontrol ve Deney Gruplarında MMP-8 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Gösterilmesi

Dermal doku homojenatlarında çalışılan MMP-8/  $\beta$ -Aktin protein oranı ekspresyonları gruplar arasında anlamlı farklılık vardır. EGCG uygulanan grup 3'te grup 2'ye oranla anlamlı olarak artmıştır (Şekil 9).

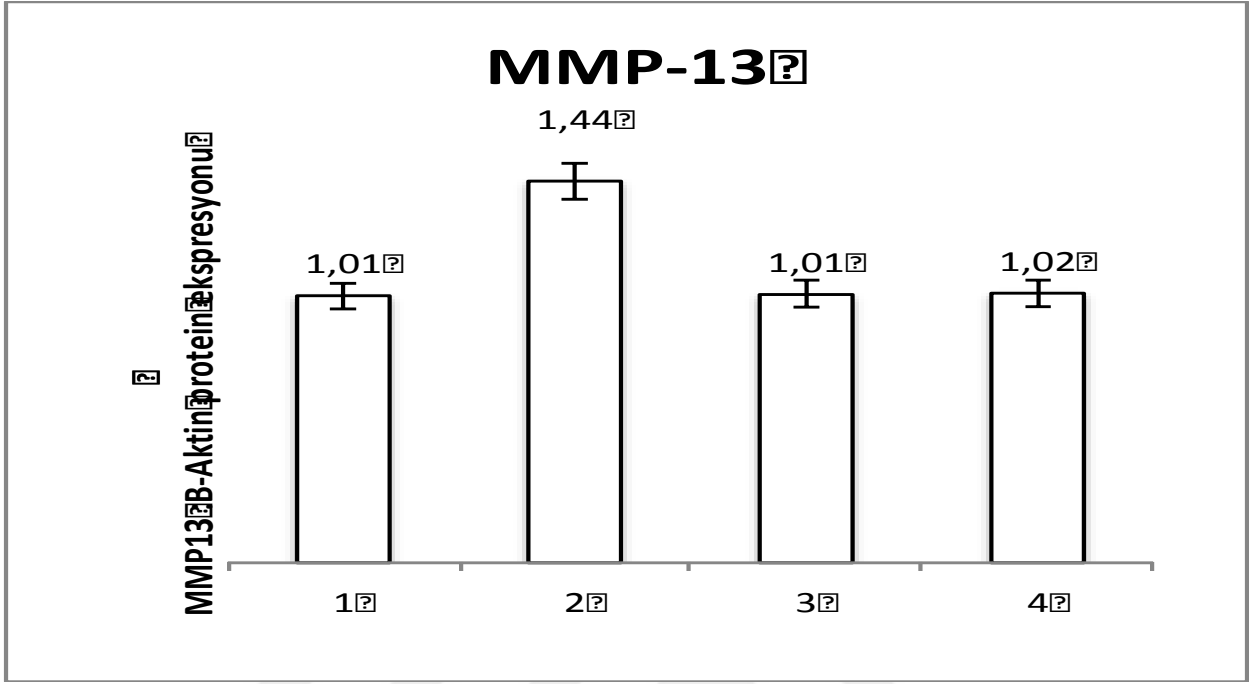




**Şekil 9.** Çalışma Gruplarında MMP-8 Protein Ekspresyon Düzeyleri Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. MMP-8/  $\beta$ -Aktin bant yoğunluk oranları verilmektedir.

#### 4.2.3. Kontrol ve Deney Gruplarında MMP-13 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Gösterilmesi

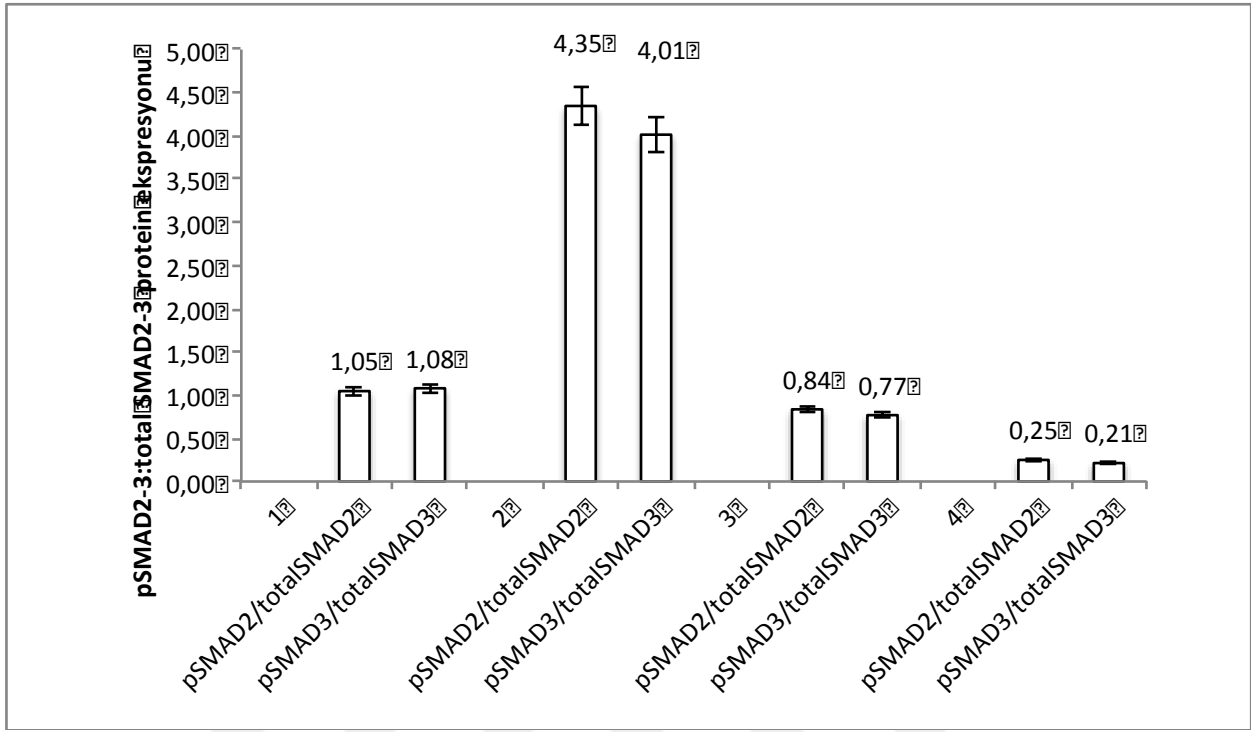
Dermal doku homojenatlarında çalışılan MMP-13/  $\beta$ -Aktin protein oranı ekspresyonları gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediği bulunmuştur (Şekil 10).



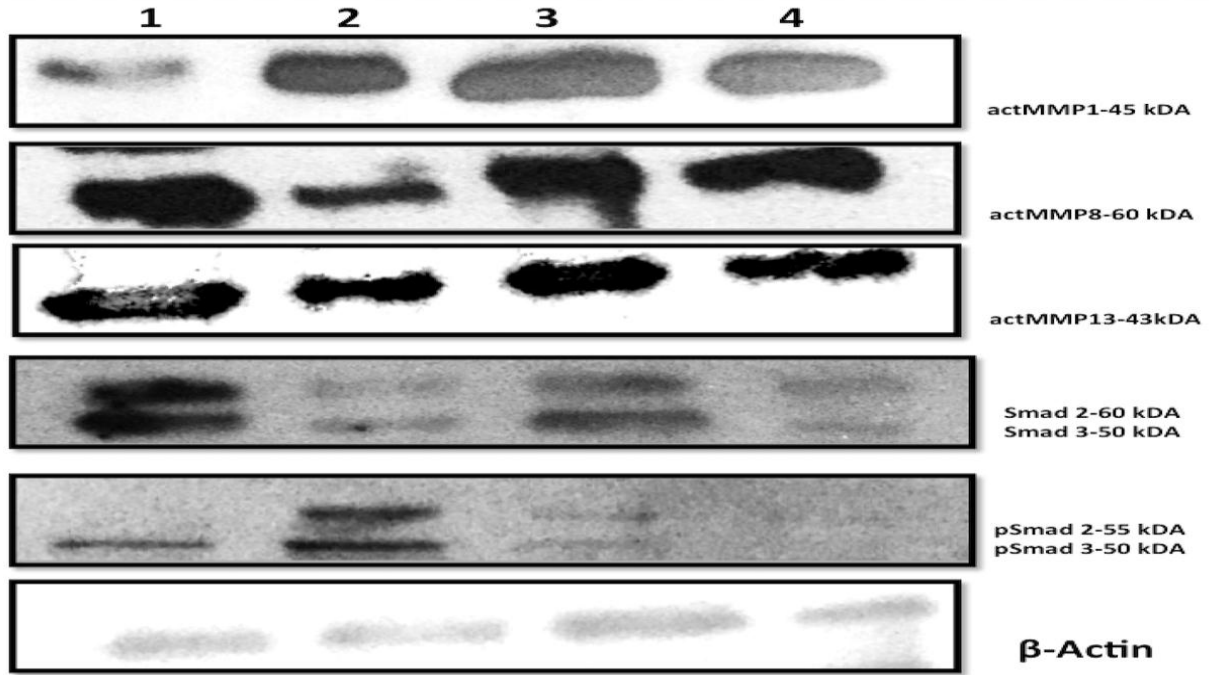
**Şekil 10.** Çalışma Gruplarında MMP-13 Protein Ekspresyon Düzeyleri. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. MMP-13/  $\beta$ -Aktin bant yoğunluk oranları verilmektedir.

#### 4.2.4. Kontrol ve Deney Gruplarında p-SMAD 2/3 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Gösterilmesi

Dermal doku homojenatlarında çalışılan p-SMAD 2-3/ total SMAD 2-3 protein ekspresyon oranları açısından, grup 1 (kontrol grubu) ve grup 2 (BLM grubu) arasında anlamlı farklılık vardır. Grup 2’de grup 1’e oranla anlamlı olarak artmıştır. EGCG uygulanan grup 3’ te ise grup 2’ ye oranla anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 11).



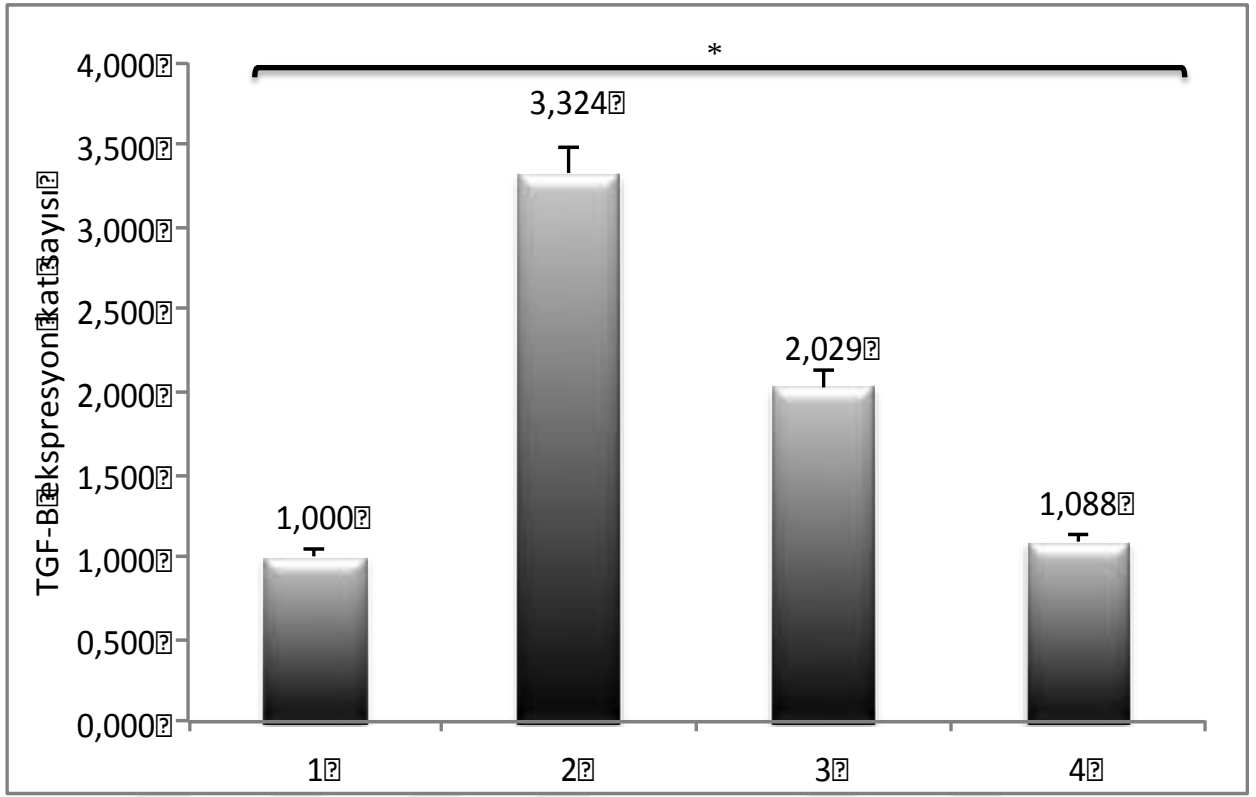
**Şekil 11.** Çalışma Gruplarında p-SMAD 2-3/ total SMAD 2-3 Protein Ekspresyon Oranları. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu. p-Smad 2/Total-Smad 2, p-Smad 3/ Total-Smad 3 bant yoğunluk oranları verilmektedir.



**Şekil 12.** Çalışma Gruplarında Western Blot Yöntemi ile Elde Edilen MMP-1, MMP-8, MMP-13, p-SMAD 2/3 Protein Bant Görüntüleri. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu

#### **4.3. TGF-Beta Gen Ekspresyonunun Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR) ile Analizi**

Dermal doku örneklerinden çalışılan PZR reaksiyonlarında, TGF-  $\beta$  gen ekspresyonu grup 2’de (BLM grubu), grup 1’e oranla anlamlı olarak artmıştır (p:0,0012). Grup 3’te (BLM+EGCG) ise Grup 2’ye (EGCG grubu) anlamlı olarak düşmüştür (Şekil 13).



**Şekil 13.** Çalışma Gruplarında RT-qPCR yöntemi ile elde edilen TGF-  $\beta$ 1 mRNA'larının değişimleri. Grup 1: Kontrol Grubu, Grup 2: Bleomisin Grubu, Grup 3: Bleomisin + Epigallokateşin-3-Gallat Grubu, Grup 4: Epigallokateşin-3-Gallat Grubu (\* p:0,002). Bulgular,  $\Delta\Delta C_T$  hesaplama sonuçlarına göre, ekspresyon katsayısı olarak verilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Kronik inflamatuvar otoimmün bir hastalık olan skleroderma, romatizmal inflamatuvar patolojiler arasında, tedavisinde en başarısız olunan hastalıktır. Bu sebeple, hastalığın etiopatogeneze yönelik çalışmalar gittikçe önem kazanmaktadır. Hastalığın patolojisindeki gelişmelerin aydınlatılması yeni tedavi olanaklarının geliştirilmesine yol açacaktır.

Skleroderma (SSc) için günümüzdeki tedavi seçenekleri, altta yatan patofizyolojiyi hedef almadan sadece semptomları kontrol altına aldığı için bazı kısıtlamalara sahiptir. Bununla birlikte, uygulanabilir ve güvenli tedavi seçenekleri için daha fazla araştırma gerekmektedir. Sklerodermanın oluşumunda yer alan moleküler mekanizmaların araştırılması son yıllarda büyük ilgi görmüştür [44]. SSc' nin en belirgin klinik özelliği, cilt ve akciğer gibi ilgili organlarda ESM bileşenleri olan tip I ve tip III kollajen birikimidir. ESM protein ve yapı elemanlarının yapımı ve yıkımı dinamik bir denge halindedir. ESM' de bu dengenin yapım lehine bozulması fibrozis ile sonuçlanır. ESM degradasyonu matriks metalloproteinaz (MMP)'lar ile sağlanırken, doku MMP inhibitörü (tissue inhibitor of metalloproteinases-TIMP) bu dengeyi fibrozis lehine kaydırır. Skleroderma fibroblastlarında, miyofibroblastların bir markeri olan  $\alpha$ -SMA ekspresyonu artar. Miyofibroblastlar, ESM' de patolojik süreçler sırasında yüksek düzeylerde bulunur ve aktive durumdadırlar [45].

Sklerodermada fibrozis patogenezin son aşamasını oluşturur. Fibrozis sürecindeki en önemli faktör aktive olmuş fibroblastlardır. Yapılan deri biyopsilerinde miyofibroblastların artmış olduğu ve doku miyofibroblast yoğunluğunun Rodnan deri skoru ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir [8].

Skleroderma nadir görülen ve klinik olarak heterojen bir hastalıktır. Bu sebeple ideal bir klinik çalışmanın planlanması ve yapılması oldukça güçtür. Tüm bu nedenlerden dolayı patolojiye yol açan yolların aydınlatılabilmesi, gen analizi çalışmalarının yapılabilmesi, hastalığı oluşturan diğer etkenlerin araştırılabilmesi ve etkin tedavi ajanının bulunabilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda deneysel modellere başvurulmaktadır. Skleroderma için birçok deneysel model kullanılmaktadır ancak BLM ile uyarılan deneysel model, sklerodermanın birçok fenotipik özelliklerini sergilemektedir. Aynı zamanda BLM ile skleroderma modeli oluşturmak düşük maliyetlidir. Bu sebeplerle, günümüze kadar tanımlanmış olan deneysel skleroderma

modellerinden en uygunu ve en fazla kullanılanıdır [46]. Tüm bu sebeplerden dolayı, bu çalışmada *Balb/c* dişi farelerde BLM ile oluşturulmuş deneysel skleroderma modeli kullanılmıştır. Dişi fare kullanmamızın sebebi ise sklerodermanın kadınlarda daha fazla görülmesidir [1].

Bu çalışma, deneysel skleroderma modelinde EGCG' nin potansiyel antifibrotik etkisini araştıran ilk çalışma olma niteliğindedir. Bu çalışma ile EGCG' nin sklerodermada antifibrotik bir etkiye sahip olduğunu ve TGF- $\beta$  gen ekspresyonunu azalttığını, protein düzeylerinde ise SMAD 2/3'ün fosforillenmesini düşürerek, MMP-8, MMP-1'i arttırdığı ortaya konmuştur. Sonuçlarımız, EGCG' nin aşırı kollajen üretimini azaltarak sklerodermanın fibrotik etkilerini düşürdüğü ve terapötik tedavide potansiyel bir aday olabileceğini göstermiştir.

Skleroderma patogeneğinde en önemli moleküllerden birisi, Transforme edici büyüme faktörü (TGF- $\beta$ )' dür. Bu büyüme faktörü, hücrede, fibrozis sırasında önemli görevlerde rol alır. Özellikle fibroblastların stimülasyonu, kollajen üretimini artırma gibi fibrozisi teşvik eden etkileri vardır. Aktive endotelyal hücreler ve inflamatuvar hücreler, hücre-hücre etkileşimi ile doğrudan ya da çeşitli sitokin, adezyon molekülü ve büyüme faktörü ile dolaylı olarak fibroblastları aktive eder. Bu süreçlerin tümünden TGF-beta sorumludur. TGF-  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 ve  $\beta$ 3 olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. Bu üç izoform birbirlerine %60-80 oranında homologdur ve 12-kDa polipeptid dimerleridir. Bu izoformlardan TGF- $\beta$ 1 ve  $\beta$ 2 profibrotik olarak bilinmektedir (Şekil 1). TGF- $\beta$ , bleomisin modelinde sklerotik evrede fibroblastlarda ve infiltrate hücrelerde üretilir. Çalışılan deneysel modelde, kollajen üretimini sağlayan TGF- $\beta$ 1 ve fosforile Smad 2 / 3 yolağı görevlidir [47]. Bizim çalışmamızda da, pozitif kontrol olan grup 2'de TGF- $\beta$ 1'in gen ekspresyonunun artmıştır. TGF- $\beta$  aktif hale geldiği zaman hedef hücrelerle temasa geçer. Hedef hücre yüzeyindeki TGF- $\beta$  RI reseptörünü aktif reseptör kompleksine dönüştüren TGF- $\beta$  R2 reseptörüne bağlanır. Bu sinyal, çekirdeğe Smad' lar tarafından iletilir. Smad 2 veya Smad 3 TGF- $\beta$  reseptör kompleksine bağlanır ve fosforillenerek Smad kompleksini çekirdeğe taşıyan Smad 4 sitoplazmik proteini ile kompleks oluşturur. Smad 7, TGF- $\beta$  reseptör kompleksine bağlanabilen ve Smad 2/3' ün fosforilasyonunu engelleyen bir proteindir; bir nevi bu yolağın inhibitördür. EGCG, TGF-  $\beta$ 1 yolağını etkiler ve Smad 7'nin ekspresyonunu artırarak Smad 3'ün fosforillenmesini engeller. Böylece tip I kollajen üretimi azalır [48]. Sunulan çalışmamızda *Balb/c* dişi fare skleroderma modelinde, BLM ile uyarılan dermal fibroz modelinde

(Grup 2) TGF- $\beta$ 1 mRNA ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Smad 2 ve Smad 3 proteinlerinin ise fosforillenmesi artmıştır.

Skleroderma hastalarının dermal dokularında yapılan araştırmada TGF- $\beta$  / Smad yolunun önemli bir rol oynadığı kabul görmüştür [39]. Pulmoner ve hepatik fibrozda EGCG'nin muhtemel antifibrotik etkileri araştırılmış olmasına rağmen [49-51], deneysel bir skleroderma modelinde EGCG'nin cilt dokuları üzerindeki etkisi ile ilgili literatür verileri bulunmamaktadır. Çalışmamızda, EGCG uygulanan grupta  $\alpha$ -SMA ekspresyonunun inhibisyonu gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, kollajen düzeyleri önemli ölçüde azalmıştır. Bu bulgular EGCG' nin kollajen üretimini ve fibroblast farklılaşmasını inhibe ettiğini göstermektedir.

EGCG' nin farklı hücre tiplerinde ESM' yi modüle ettiği ile ilgili literatürde önemli kanıtlar bulunmaktadır [39]. EGCG' nin, insan ve sıçan hepatik stellat hücrelerinde, sıçan pankreatik hücrelerinde, fare aortik düz kas hücrelerinde, glioblastomada ve insan keloid fibroblastlarında TGF- $\beta$  ve PDGF sinyalleri yoluyla anti-fibrotik, anti-kanser ve anti-inflamatuvar etkinliği olduğu gösterilmiştir [52-58]. Hsieh ve arkadaşları EGCG' nin TGF- $\beta$ ' yi baskılayarak kollajen sentezini azalttığını bulmuştur [59]. Bir başka çalışmada ise EGCG hem *in vivo* hem de *in vitro* miyokardiyal fibrozu baskılamıştır [38]. Bleomisinle indüklenmiş rat akciğer fibroblastlarında prokollajen yapımı, TGF- $\beta$  mRNA ve TGF-  $\beta$  protein sentezi artmıştır [60]. Bir başka çalışmada bleomisinle oluşturulmuş deneysel fare modelinde TGF- $\beta$ 1 ekspresyonu ve sentezi artmıştır [61]. *In vitro* yapılan EGCG çalışmasında, fibroblast aktivitesinin bastırıldığı gösterilmiştir [39]. Suzuki ve arkadaşları diğer çalışmalara benzer olarak, insan dermal fibroblastlarında EGCG'nin kollajen üretiminde inhibitör görevi olduğunu göstermişlerdir [62]. Bizim çalışmamızda ise literatürde ilk defa, bleomisinle oluşturulmuş deneysel skleroderma modelinde, deride, EGCG' nin kollajeni, TGF- $\beta$ 1 ve p-SMAD 2/3 mRNA düzeylerini azalttığı bulunmuştur. Buna paralel olarak, MMP-1 ve MMP-8 protein düzeyleri EGCG uygulanan deney grubunda artmıştır. Çalışmamızdan çıkan bu sonuçlara göre, EGCG'nin SSc'de kollajen metabolizması üzerinde çift etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Bu iki olay ; hem kollajen üretimini inhibe etmekte hem de kollajenazların aktivasyonu ile ESM regülasyonunu düzenlemektedir. Sonuçlarımıza paralel olarak, pulmoner fibrozda, EGCG'nin TGF- $\beta$ 1 sinyalini inhibe ederek fibroblast aktivasyonunu ve kollajen birikimini inhibe ettiği gösterilmiştir [63].



TGF- $\beta$ , aktive lenfosit ve monositlerden salınır ve ESM sentezini uyarak, SSc'deki fibroz gelişiminde temel rolü oynar [64]. Ayrıca kollajeni yıkan MMP'lerin üretimini azaltır ve proteaz inhibitörlerinin üretimini artırır. Böylece ESM yıkımını indirekt olarak önlemektedir [65, 66]. EGCG, birçok hastalıkta ve sağlık araştırmasında çalışılmıştır. Bu araştırmalar çoğunlukla antioksidan etkisi üzerinedir [30, 67, 68]. EGCG, TGF- $\beta$  yoluyla  $\alpha$ -SMA ekspresyonundaki artışı azaltır. Bu sonuçlar, EGCG'nin  $\alpha$ -SMA ekspresyonu üzerindeki inhibe edici etkisinin antioksidatif etkisinden bağımsız olduğunu düşündürmektedir. Tabuchi ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile EGCG'nin, TGF- $\beta$  reseptörüne bağlandığını ve MMP'leri düzenleyerek kollajen bozulmasını arttırdığını düşünmüşlerdir [69]. Bu nedenle, EGCG'nin skleroderma üzerindeki etkileri kısmen Smad 2 / 3'ün fosforilasyonunun inhibisyonundan kaynaklanabilir.

EGCG sadece bu yolları değil diğer inflamatuvar, apoptotik ve hücre sağ kalımında önemli rolleri olan yolları da etkilemektedir. Dermal fibroblastlarda yapılan bir çalışmada, EGCG'nin AP-1 ve nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)'yi inhibe ettiği gösterilmiştir, bu yollar inflamasyonda ve ESM modülasyonunda görevlidir [34]. Skleroderma aynı zamanda inflamatuvar bir hastalık olduğu için planlanan ileri çalışmalarda, EGCG'nin etkisini tam incelemek amacıyla bu yollara da bakmak faydalı olacaktır. Aynı zamanda, EGCG, bağ doku büyüme faktörü (CTGF)'nü inhibe etmektedir [35]. Park ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, keloid fibroblastlarına uygulanan artan EGCG dozlarının (25-100  $\mu$ M) STAT-3 yolağını inhibe ettiği belirtilmiştir [58]. Farklılaşmış adiposit hücrelerinde ise EGCG, PPAR $\gamma$  ve fosforile-FOXO1 yollarını baskılamıştır [70]. Deneysel otoimmün tiroitit farelerde yapılan bir çalışmada ise, EGCG'nin anti-apoptotik bir gen olan B-hücre lenfoma-2 (BCL-2) protein ekspresyonunu arttığı, kaspaz-3 aktivitesini ve TNF- $\alpha$ -ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TRAIL) protein düzeyini baskıladığı belirtilmiştir [71]. Aynı zamanda, *in vitro* ve *in vivo* deneylerde PI3K/Akt sinyal yolağını inhibe ederek epitelyal mezenkimal transizyon (EMT)'u baskıladığı bildirilmiştir [72].

Bunun yanında tamamen başka bakış açısıyla yapılan bir çalışmada, EGCG'nin yaşlanmaya bağlı olarak gelişen kardiyak hipertrofiyi, organlarda oluşan fibrozisi, apoptozisi ve yağ lipidlerini düşürerek kardiyovasküler sistemi koruduğu bulunmuştur. Yine aynı çalışmada, bu etkiyi TGF $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , ve NF- $\kappa$ B yollarını baskılayarak yaptığı ortaya konmuştur [73].

Sonuçlarımıza göre EGCG uygulamasının, sklerodermada, TGF- $\beta$  sinyal yolunu inhibe ederek, Smad 2 ve Smad 3 fosforillenmesini ve  $\alpha$ -SMA ekspresyonunu azaltarak farklılaşmış miyofibroblastları kısmen geri döndürebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızın hipotezini doğrulamış bulunmaktayız: “Bleomisinle oluşturulmuş deneysel skleroderma fare modelinde EGCG fibrozu baskılar ve antifibrotik etkileri vardır.” diyebilmekteyiz.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bulgularımız, EGCG' nin, *Balb/c* dişi farelere uygulanan deneysel skleroderma modelinde, TGF- $\beta$  -SMAD 2/3 aktivasyonunu düşürüp, MMP-1 ve MMP-8 protein ekspresyonunu artırarak deri fibrozunu azalttığını göstermektedir.

Bu kapsamda sonuçlarımız şunlardır:

- 4.2.1. EGCG, skleroderma hayvan modelinde MMP-1 protein düzeyini arttırmıştır.
- 4.2.2. EGCG, skleroderma hayvan modelinde MMP-8 protein düzeyini arttırmıştır.
- 4.2.3. EGCG, skleroderma hayvan modelinde p-SMAD 2/3 protein düzeyini azaltmıştır.
- 4.2.4. EGCG, skleroderma hayvan modelinde TGF-beta1 gen ekspresyonu düzeyini azaltmıştır.
- 4.2.5. EGCG, skleroderma hayvan modelinde pozitif  $\alpha$ -SMA hücre sayısını azaltmıştır.
- 4.2.6. EGCG, skleroderma hayvan modelinde dermal kalınlaşmayı ve kollajen miktarını azaltmıştır.
- 4.2.7. EGCG, skleroderma hayvan modelinde, derin dermis alanda yangıyı azaltmıştır.
- 4.2.8. EGCG, skleroderma hayvan modelinde MMP-13 protein düzeylerinde etkili olmamıştır.

Çalışmamızda, EGCG' nin sklerodermalı hastalarda fibrozis tedavisinde potansiyel yeni bir ajan olarak kullanımının araştırılmaya değer olabileceği ortaya çıkmıştır. Ancak EGCG'nin inhibisyon mekanizmasını nasıl aktif ettiği daha kapsamlı çalışmalarla ortaya konmalıdır.

## 7. KAYNAKLAR

- 1- Varga J and Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117(3): 557-67.
- 2- Bhattacharyya S, Wei J and Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 8(1): 42-54.
- 3- Hunzelmann N, Genth E, Krieg T et al. The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology* 2008;47(8):1185-92.
- 4- Allanore Y, Dieude P, and Boileau C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49(2): 203-10.
- 5- Mayes MD, Lacey JV Jr, Beebe-Dimmer J, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 2003;48(8): 2246-55.
- 6- Avouac J, Elhai M, and Allanore Y. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2013; 80(1): 23-8.
- 7- Roberts AB and Sporn MB. Transforming growth factors. *Cancer Surv* 1985; 4(4): 683-705.
- 8- J. Matthew Mahoney ,Jaclyn Taroni, Viktor Martyanov, et al. Systems level analysis of systemic sclerosis shows a network of immune and profibrotic pathways connected with genetic polymorphisms. *PLoS Comput Biol* 2015; 11(1): p. e1004005.

- 9- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, et al. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007;170:1807–16.
- 10- Kahari VM and Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997; 6(5): 199-213.
- 11- Siller-López F, Sandoval A, Salgado S, et al. Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology* 2004;126:1122–33; discussion 949.
- 12- Asano Y, Ihn H, Kubo M, et al. Clinical significance of serum levels of matrix metalloproteinase-13 in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:303-37.
- 13- Roh E, Kim JE, Kwon JY, et al. Molecular mechanisms of green tea polyphenols with protective effects against skin photoaging. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017;57:1631–7
- 14- White OP, Tribout H, Baron E. Protective mechanisms of green tea polyphenols in skin. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 560682.
- 15- Santamarina AB, Carvalho-Silva M, Gomes LM, et al. Decaffeinated green tea extract rich in epigallocatechin-3-gallate prevents fatty liver disease by increased activities of mitochondrial respiratory chain complexes in diet-induced obesity mice. *J Nutr Biochem* 2015;26:1348-56.
- 16- Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y. New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot (Tokyo)* 1966;19:200–9.

- 17- Yamamoto T, Eckes B, Krieg T. Bleomycin increases steady-state levels of type I collagen, fibronectin and decorin mRNAs in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2000; 292(11):556-561.
- 18- Clark JG, Starcher BC and Uitto J. Bleomycin-induced synthesis of type I procollagen by human lung and skin fibroblasts in culture. *Biochim Biophys Acta* 1980;631(2): 359-370.
- 19- Yamamoto T, Kuroda M, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. III: Histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Arch Dermatol Res* 2000; 292(11): 535-41.
- 20- Yamamoto T and Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. IV: induction of dermal sclerosis by bleomycin is T cell independent. *J Invest Dermatol* 2001; 117(4): 999-1001.
- 21- Yamamoto T and Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. V: Increased expression of alpha-smooth muscle actin in fibroblastic cells in bleomycin-induced scleroderma. *Clin Immunol* 2002; 102(1): 77-83.
- 22- Yamamoto T and Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. VI: Evaluation of bleomycin-induced skin sclerosis in nude mice. *Arch Dermatol Res* 2004; 295(10): 453-6.
- 23- Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, et al. Animal model of sclerotic skin. I: local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999;112:456–62.
- 24- Yamamoto T, Takahashi Y, Takagawa S, et al. Animal model of sclerotic skin. II. Bleomycin induced scleroderma in genetically mast cell deficient WBB6F1-W/W(V) mice. *J Rheumatol* 1999;26:2628–34.
- 25- Barsotti S, Stagnaro C, Della Rossa. A. Systemic sclerosis: a critical digest of the recent literature. *Clin Exp Rheumatol* 2015; 33 (suppl. 91):3-14.

- 26- Martin P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276; 1997: 75–81.
- 27- Gurtner GC, Werner S, Barrandon MT, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 453; 2008: 314–321.
- 28- Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N. Engl. J Med* 2009; 360: 1989–2003.
- 29- Yang CS, Chen L, Lee MJ, et al. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7:351-4.
- 30- Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003; 43:89-143.
- 31- Takano K, Nakaima K, Nitta M, et al. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin 3-gallate, a polyphenol of green tea, on neutrophil chemotaxis *in vitro* and *in vivo*. *J Agr Food Chem* 2004; 52:4571-6.
- 32- Katiyar SK, Matsui MS, Elmetts CA, Mukhtar H. Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem Photobiol* 1999; 69:148-53.
- 33- Lambert JD, Elias RJ. Antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys* 2010; 501:65-72.
- 34- Kim J, Hwang JS, Cho YK, et al. Protective effects of epigallocatechin-3-gallate on UVA and

UVB induced skin damage. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14: 11–9.

- 35- Yumei F, Zhou Y, Zheng S, Chen A. The antifibrogenic effect of (-)-epigallocatechin gallate results from the induction of de novo synthesis of glutathione in passaged rat hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2006; 86: 697–709.
- 36- Benjamin R. Klass MRCS , Olivier A. Branford MRCS , Adriaan Oet al. The effect of epigallocatechin-3-gallate, a constituent of green tea, on transforming growth factor-b1–stimulated wound contraction. *Wound Rep Reg* 2010; 18: 80–88.
- 37- Xiao J, Ho CT, Liong EC, et al. Epigallocatechin gallate attenuates fibrosis, oxidative stress, and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease rat model through TGF/ SMAD, PI3 K/Akt/FoxO1, and NF-kappa B pathways. *Eur J Nutr* 2014; 53: 187–99.
- 38- Lin C, Chang H, Wang B, Shyu K. Suppressive effect of epigallocatechin-3-O-gallate on endoglin molecular regulation in myocardial fibrosis *in vitro* and *in vivo* . *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2016; 20(11): 2045-2055.
- 39- Dooley A, Wen XS, Aden N, et al. Modulation of collagen type I, fibronectin and dermal fibroblast function and activity, in systemic sclerosis by the antioxidant epigallocatechin-3-gallate. *Rheumatology* 2010; 49 (11): 2024–2036.
- 40- Jimenez SA, Christner PJ. Murine animal models of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 671-680.
- 41- Wu M, Varga J. In perspective: murine models of scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 2008; 10: 173-182.



- 42- Zhang Y, Gilliam AC. Animal models for scleroderma: an update. *Curr Rheumatol Rep* 2002; 4: 150-162.
- 43- Sriram N, Kalayarasan S and Sudhandiran G. Enhancement of antioxidant defense system by epigallocatechin-3-gallate during bleomycin induced experimental pulmonary fibrosis, *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 1306–11.
- 44- Abraham DJ, Krieg T, Distler J, Distler O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48(Suppl 3):iii3–7.
- 45- Desmouliere A, Chaponnier C and Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005; 13(1): 7-12.
- 46- Yamamoto T. Animal model of sclerotic skin induced by bleomycin: a clue to the pathogenesis of and therapy for scleroderma? *Clin Immunol* 2002; 102: 209-261.
- 47- Takagawa S, Lakos G, Mori Y, et al. Sustained activation of fibroblast transforming growth factor-beta/Smad signaling in a murine model of scleroderma. *J Invest Dermatol* 2003; 121:41–50.
- 48- Wang T, Zhou XT, Yu Y et al. Expression of Smad 7 inhibits fibrogenic responses of keratocytes to transforming growth factor beta2. *Chin. Med. J. (Engl)* 2011; 124: 1988–93.
- 49- Yasuda Y, et al. (–)-Epigallocatechin gallate prevents carbon tetrachloride-induced rat hepatic fibrosis by inhibiting the expression of the PDGFR $\beta$  and IGF-1R. *Chemico-Biological Interactions* 2009; 182 (2-3): 159–164.

- 50-Zhen M, Wang Q, Huang X, Cao L, Chen X, Sun K, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits oxidative damage and preventive effects on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *J Nutr Biochem* 2007;18:795–805.
- 51-Sriram N, Kalayarasan S, Sudhandiran G, et al. Epigallocatechin-3-gallate exhibits anti-fibrotic effect by attenuating bleomycin-induced glycoconjugates, lysosomal hydrolases and ultrastructural changes in rat model pulmonary fibrosis. *Chemico-Biological Interactions* 2009; 180 (2): 271–280.
- 52-Chen A, Zhang L, Xu J, Tang J. The antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits activated hepatic stellate cell growth and suppresses acetaldehyde-induced gene expression. *Biochem J* 2002;368(Pt 3):695–704.
- 53-Chen A and Zhang L. The antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits rat hepatic stellate cell proliferation *in vitro* by blocking the tyrosine phosphorylation and reducing the gene expression of platelet-derived growth factor-beta receptor. *J Biol Chem* 2003; 278(26): 23381-9.
- 54-Nakamuta M, Higashi N, Kohjima M, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea, suppresses both collagen production and collagenase activity in hepatic stellate cells. *Int J Mol Med* 2005;16:677-81.
- 55-Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits ethanol-induced activation of pancreatic stellate cells. *Eur J Clin Invest* 2006;36:113–22.
- 56-Meng M, Li YQ, Yan MX, Kou Y, Ren HB. Effects of epigallocatechin gallate on diethyldithiocarbamate-induced pancreatic fibrosis in rats. *Biol Pharm Bull* 2007;30:1091.

- 57- Ahn HY, Hadizadeh KR, Seul C, et al. Epigallocatechin-3 gallate selectively inhibits the PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172). *Mol Biol Cell* 1999;10:1093–104.
- 58- Park G, Yoon BS, Moon JH, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses col- lagen production and proliferation in keloid fibroblasts via inhibition of the STAT3-signaling pathway. *J Invest Dermatol* 2008;128:2429–41.
- 59- Hsieh YP, Chen HM, Lin HY, et all. Epigallocatechin- 3-gallate inhibits transforming-growth-factor-beta1-induced collagen synthesis by suppressing early growth response-1 in human buccal mucosal fibroblasts. *J Formos Med Assoc* 2017;116:107-13.
- 60- Breen E, Shull S, Burne S, et al. Bleomycin regulation of transforming growth factor-beta mRNA in rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;6:146–52.
- 61- Oi M, Yamamoto T, Nishioka K. Increased expression of TGF-beta1 in the sclerotic skin in bleomycin-'susceptible' mouse strains. *J Med Dent Sci* 2004; 51(1): 7-17.
- 62- Suzuki Y, Hattori S, Isemura M. Epigallocatechin-3-O-gallate inhibits fibroblast contraction of floating collagen gel: interaction between epigallocatechin-3-O-gallate and platelet derived growth factor. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; 68(8): 1817-20.
- 63- Sriram N, et al. Epigallocatechin gallate attenuates fibroblast proliferation and excessive collagen production by effectively intervening TGF-beta1 signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015; 42(8): 849-59.
- 64- Takagawa S, Lakos G, Mori Y, et al. Sustained activation of fibroblast transforming growth factor-beta/Smad signaling in a murine model of scleroderma. *J Invest Dermatol* 2003; 121:41–50.

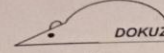
- 65- Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA. Transforming growth factor beta (TGF-beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts *Biochem J* 1987; 247: 597- 604.
- 66- Postlethwaite AE. Role of T cells and cytokines in effecting Fibrosis. *Int Rev Immunol* 1995; 12: 247-258.
- 67- Nanjo F, Goto K, Seto R, et al. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Med* 1996; 21:895-902.
- 68- Nanjo F, Mori M, Goto K, Hara Y. Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63: 1621-1623.
- 69- Masaki Tabuchi, Sumio Hayakawa, Eiko Honda et al. Epigallocatechin-3-gallate suppresses transforming growth factor-beta signaling by interacting with the transforming growth factor-beta type II receptor. *World J Exp Med* Nov 20, 2013; 3(4): 100-107.
- 70- Lu Y, Chen J, Xian T et al. Epigallocatechin-3-gallate suppresses differentiation of adipocytes via regulating the phosphorylation of FOXO1 mediated by PI3K-AKT signaling in 3T3-L1 cells. *Oncotarget*. 2018; 9:7411-7423.
- 71- Li J. Neuroprotective effect of (–)-epigallocatechin-3-gallate on autoimmune thyroiditis in a rat model by an anti-inflammation effect, anti-apoptosis and inhibition of TRAIL signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018;15(1):1087-1092.
- 72- Yang, N., Zhang, H., Cai, X. and Shang, Y. Epigallocatechin-3-gallate inhibits inflammation and epithelial-mesenchymal transition through the PI3K/AKT pathway via upregulation of PTEN in asthma. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018; 41, 818-828.

73-Ibrahim Muhammed, Suruthi Sankar and Sakthivel Govindaraj. Ameliorative Effect of Epigallocatechin Gallate on Cardiac Hypertrophy and Fibrosis in Aged Rats. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2018; 71(2):65–75.

## **8. EKLER**

### **8.1. Etik Kurul Raporu**



  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
Toplantı No : 08/22/2012  
Toplantı Tarihi : 28 Aralık 2012

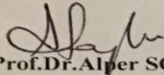
35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234

Sayın, Prof.Dr.Gül GÜNER AKDOĞAN  
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

79/2012 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Farelerde bleomisin ile oluşturulmuş skleroderma modelinde epigallokateşin-3-Gallatin Fibrozis üzerine olası koruyucu etkilerinin araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

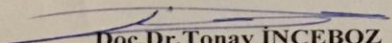
Prof.Dr.Osman YILMAZ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
Başkanı(Araştırmacı)

  
Prof.Dr.Alper SOYLU  
Üye

Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU  
Üye

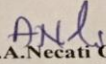
Prof.Dr.Abdullah KUMRAL  
Üye(Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Gülgün OKTAY  
Üye(Topl.Katılamadı)

  
Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ  
Üye

Vtr.Hekim Adnan SERPEN  
Üye

Zehra KINAM  
Üye(Topl.katılamadı)

  
Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN  
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Ayşe GELAL  
Üye(Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Hüseyin BASKIN  
Üye(Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Turna İLKINUR  
Üye

Prof.Dr.Sermin GENÇ  
Üye

Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK  
Üye

Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU  
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır

**8.2. Özgeçmiş**  
**AYŞE KOÇAK**

|                        |                                                                |
|------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>Doğum Yılı:</b>     | 07.01.1986                                                     |
| <b>Yazışma Adresi:</b> | Polat Caddesi No:180/11 Basınsitesi-İzmir                      |
| <b>Telefon:</b>        | 05072243706                                                    |
| <b>e-posta:</b>        | <a href="mailto:kocak.ayse@gmail.com">kocak.ayse@gmail.com</a> |

**EĞİTİM BİLGİLERİ**

| Ülke | Üniversite               | Fakülte/Enstitü            | Öğrenim Alanı                            | Derece        | Mezuniyet Yılı       |
|------|--------------------------|----------------------------|------------------------------------------|---------------|----------------------|
| TR   | Dokuz Eylül Üniversitesi | Sağlık Bilimleri Enstitüsü | Moleküler Tıp                            | Doktora       | 2012-2018 (beklenen) |
| TR   | Celal Bayar Üniversitesi | Sağlık Bilimleri Enstitüsü | Tıbbi Biyoloji ve Genetik                | Yüksek Lisans | 2008-2011            |
| TR   | Kocatepe Üniversitesi    | Fen Edebiyat Fakültesi     | Biyoloji (Moleküler Biyoloji ve Genetik) | Lisans        | 2004-2008            |
| TR   | Anadolu Üniversitesi     | Açıköğretim Fakültesi      | İşletme                                  | Önlisans      | 2005-2008            |

**AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM**

| Ülke | Kurum                             | Şehir | Bölüm/Birim                     | Görev Türü                       | Görev Dönemi |
|------|-----------------------------------|-------|---------------------------------|----------------------------------|--------------|
| TR   | Dokuz Eylül Üniversitesi          | İzmir | Moleküler Tıp                   | Tübitak 2211-C Doktora Bursiyeri | 2014-2016    |
| TR   | Novartis Onkoloji İlaç Geliştirme | İzmir | Klinik Araştırmalar (Faz 2-3-4) | Koordinatör                      | 2014         |
| TR   | AKA Biyoteknoloji                 | İzmir | Ege Bölgesi                     | Aplikasyon Uzmanı                | 2013         |
| TR   | NIC Medikal                       | İzmir | DAKO (FISH, CISH, IHK, HK)      | Aplikasyon Uzmanı                | 2010-2012    |

**UZMANLIK ALANLARI**

Matriks Metalloproteinazlar,  
Ekstraselüler Matriks,

**ÖDÜLLER-BURLAR**

| <b>Ödölün Adı</b>                                                                                            | <b>Alındığı Kuruluş</b>                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 3001 programı ,117S397 no'lu Proje Kapsamında Bursiyerlik, 2018                                              | TÜBİTAK                                                     |
| 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Bursu, 2014-2016                                          | TÜBİTAK                                                     |
| Young Scientist Forum (YSF) Katılım Hakkı, 2017                                                              | The Federation of European Biochemical Societies (FEBS)     |
| Kongre Üçüncülük Ödülü, 2017                                                                                 | 18. Ulusal Romatoloji Kongresi, 18-22 Ekim 2017, Antalya    |
| Poster Ödülü, 2017                                                                                           | 6th FEBS-MPST 2017 Spetses - Greece, May 25 - May 30, 2017. |
| 18. Ulusal Romatoloji Kongresi Kayıt ve Konaklama Bursu, 2017                                                | Türk Romatoloji Derneği                                     |
| Uluslararası Biyokimya Kongresi 28. Ulusal Biyokimya Kongresi-Genç araştırmacı kayıt & Konaklama Bursu, 2017 | Türk Biyokimya Derneği                                      |
| 6th FEBS Advanced Lecture Course,FEBS-Matrix Pathobiology, signaling Youth Travel Funds (YTF), 2017          | The Federation of European Biochemical Societies (FEBS)     |
| XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi Genç Araştırmacı Katılım Bursu, 2015                                        | Türk Biyokimya Derneği                                      |
| 40. FEBS Kongresi Katılım, Konaklama Bursu, 2015                                                             | The Federation of European Biochemical Societies (FEBS)     |
| 12.Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Kayıt ve Katılım bursu, 2011                                          | TÜBİTAK                                                     |

**YAYINLARI**



## SCI, SSCI, AHCI İNDEKSLERİNE GİREN DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

- Kocak Ayse**, Harmanci Duygu, Cavdar Zahide, Ural Cemre, Birlik Merih, Sarıoğlu Sulen, Yılmaz Osman, Guner Akdoğan Gul. Antioxidant effect of Epigallocatechin-3-Gallate in a bleomycin induced scleroderma model. The Archives of Rheumatology 2018. (Kabul Edildi.)
- Kocak A**, Harmancı D, Birlik M, Sarıoğlu S, Osman Y, Zahide C, Guner G. Effects of Epigallocatechin-3- gallate (EGCG) on a Scleroderma Model of Fibrosis. TJB. 2018; vol:43, iss:6. doi: 10.1515/tjb-2017-0185.
- Ersan S, Celik A, Tanrisev M, Kose I, Cavdar Z, Unlu M, **Kocak A**, Ural C, Yilmaz B, Kose T. Pretreatment with paricalcitol attenuates level and expression of matrix metalloproteinases in a rat model of renal ischemia- reperfusion injury. Clin Nephrol. 2017 Nov; 88(11):231-238. doi: 10.5414/CN109121.
- Sibel Ersan, Mehmet Tanrisev, Zahide Cavdar, Asli Celik, Mehtat Unlu, **Ayşe Kocak**, Timur Kose. Pretreatment With Nebivolol Attenuates Level And Expression Of Matrix Metalloproteinases in a Rat Model Of Renal Ischemia- Reperfusion Injury. Nephrology. January 2017. doi:10.1111/nep.13007.
- F Aydın Kose, S Celebi, H Cengiz, D Harmanci, **A Kocak**, E Canbay, D Aslan, E Sezer, A Pabuccuoglu, H Kocdor. The 1st Turkish in vitro diagnostic symposium evaluation. Turkish Journal of Biochemistry, Feb 2017; Volume 42: Issue 1.

## DiĞER DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

- Harmanci D, Erkan EP, **Kocak A**, Akdogan Guner G. The role of microRNA-29 family in fibrotic skin diseases. Biomedical Reports 2017,6: 599-604.
- Kocak A.**, Harmancı D., Birlik M., Güner G. Molecular Mechanisms of Scleroderma and Fibrosis. International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB) Volume 5, Issue 1, January 2017, PP 49-55.
- Koçak A.**, Moleküler Tıp ve İlaç Araştırmalarının Temeli, İlaç Haber Aktüel, Sayı 38, Aralık 2014, p 42-44, ISSN: 95886.

## HAKEMLİ KONFERANS/SEMPOZYUMLARIN BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

- Duygu Harmancı Karagulle, Cenk Demirdöver, **Ayşe Kocak**, Gul Akdogan. Determination of miR-29 family in striae as a new therapeutic target. 43rd FEBS Congress, Prague 07-12 July 2018. (Kabul edildi.)
- A. Kocak**, Z. Cavdar, C. Ural, S. Ersan, S. Arslan, S. Ozbal, A. Dubova, C. Cavdar. The protective effect of nebivolol on renal ischemia/reperfusion injury in rats through the p38 MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. 43rd FEBS Congress, Prague 07-12 July 2018. (Kabul edildi.)
- Ayşe Kocak**, Duygu Harmancı, Merih Birlik, Gul Guner. Molecular mechanisms mediating

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| antioxidant effect of epigallocatechin-3-gallate in experimental scleroderma model. EULAR Annual European Congress of Rheumatology, 2018 Amsterdam, 13-16 June 2018. (Kabul edildi.)                                                                                                                                |
| <b>Ayşe Kocak</b> , Duygu Harmancı, Merih Birlik, Gul Guner. Vitamin d and vitamin d receptor in patients with scleroderma subtypes. EULAR Annual European Congress of Rheumatology, 2018 Amsterdam, 13-16 June 2018. (Kabul edildi.)                                                                               |
| <b>Ayşe Koçak</b> , Duygu Harmancı, Merih Birlik, Gül Güner Akdoğan. Skleroderma alt tiplerinde vitamin d reseptör ekspresyonunun belirlenmesi. III. Türkiye in vitro Diyagnostik (IVD) Sempozyumu. 28 Şubat - 02 Mart 2018. İzmir (Kabul edildi.)                                                                  |
| <b>Ayşe Koçak</b> , Duygu Harmancı, Merih Birlik, Zahide Çavdar, Sülen Sarioğlu, Osman Yılmaz, Gül Güner Akdoğan. Bleomisinle oluşturulmuş deneysel skleroderma modelinde epigallokateşin-3-gallat'ın fibrozise etkilerinin araştırılması. RAED Dergisi 2017;9(Suppl):S1–S176. doi:10.2399/raed.17.S001017          |
| <b>Ayşe Koçak</b> , Duygu Harmancı, Merih Birlik, Zahide Çavdar, Sülen Sarioğlu, Osman Yılmaz, Cemre Ural, Gül Güner Akdoğan. Deneysel Skleroderma Modelinde Epigallokateşin-3-gallat'ın antioksidan etkisine aracılık eden moleküler mekanizmalar. RAED Dergisi 2017;9(Suppl):S1–S176. doi:10.2399/raed.17.S001017 |
| <b>Ayşe Koçak</b> , Duygu Harmancı, Merih Birlik, Gül Güner Akdoğan. Skleroderma tiplerinde oksidatif stress parametreleri. RAED Dergisi 2017;9(Suppl):S1–S176. doi:10.2399/raed.17.S001017                                                                                                                         |
| Zahide Çavdar, Ahmet Burak Hakkoymaz, Bedirhan Onus, Erdem Erkut Erkol, Cemre Ural, Duygu Harmancı, <b>Ayşe Koçak</b> , Memduh Bülbül, Gül Akdoğan. Tıp Eğitiminde Özel Çalışma Modülü: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) le Kırmızı Şarapta Resveratrol Analizi. Turk J Biochem, 2017; 42 (S1).       |
| Duygu Harmancı Karagülle, Zeliha Kılıç, <b>Ayşe Koçak</b> , Nilgün Yener, Aysun Pabuççuoğlu, Ferhan Girgin Sağın , Hilal Koçdor. 2. Turkey (in vitro) diagnostic symposium-“Biomarkers” Evaluation of General Participants. Turk J Biochem, 2017; 42 (S1).                                                          |
| <b>Ayşe Koçak</b> , Duygu Harmancı, Sülen Sarioğlu, Merih Birlik, Zahide Çavdar, Osman Yılmaz, Cemre Ural, Gül Güner Akdoğan. Skleroderma deney modelinde Epigallokateşin'in antioksidan etkileri. Turk J Biochem, 2017; 42 (S1).                                                                                   |
| <b>Ayşe Koçak</b> , Hikmet Kılınç, Ece Sena Çamlı, Aslıhan Oflaz, Jale Sinitta Özgür, Nalan Yıldız, Ozan Tekneci, Duygu Harmancı, Cemre Ural, Zahide Çavdar, Gül Güner Akdoğan. Fibroz Gelişiminin Öğrenilmesinde Skleroderma Fare Modelinin Kullanılması. Turk J Biochem, 2017; 42 (S1).                           |
| C Ural, Z. Cavdar, S. Ersan, <b>A. Kocak</b> , S. Arslan, S. Ozbal, A. Dubova, C. Cavdar. The protective effect of paricalcitol on renal ischemia/reperfusion injury in rats through the inhibition of p38 MAPK signaling pathway. The FEBS Journal 284 (Suppl. 1) (2017) 104–392 DOI: 10.1111/febs.14174           |
| <b>A.Kocak</b> , D. Harmancı, M. Birlik, S. Sarioglu, O. Yilmaz, Z. Cavdar, G. Guner Akdogan. Fibrosis                                                                                                                                                                                                              |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| modulation in scleroderma by epigallocatechin-3-gallate. The FEBS Journal 284 (Suppl. 1) (2017) 104–392 DOI: 10.1111/febs.14174                                                                                                                                                                                     |
| D. Harmanci Karagulle, <b>A. Kocak</b> , C. Demirdover, B. Lebe, G. Akdogan. The presence of miR-29 family in skin hypertrophic scars and normal skin. The FEBS Journal 284 (Suppl. 1) (2017) 104–392 DOI: 10.1111/febs.14174                                                                                       |
| <b>A. Kocak</b> , D. Harmancı, M. Birlik, S. Sarioglu, G. Guner Akdogan. Protective effects of epigallocatechin 3 gallate on fibrosis in scleroderma model. EULAR Annual European Congress of Rheumatology, 2017 Madrid, Spain 14-17 June 2017. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-eular.2076.                           |
| <b>A. Kocak</b> , D. Harmancı, Fatima Daldal, M. Birlik, G. Guner Akdogan. Oxidative stress biomarkers in scleroderma, II. IVD Sempozyumu “Biyobelirteçler” (Hastalıkta & Sağlıkta), Turk J Biochem 2017, Volume 42 I Supplement Issue 2.                                                                           |
| Sibel Ersan, Mehmet Tanrisev, Zahide Cavdar, Asli Celik, Mehtat Unlu, <b>Ayşe Kocak</b> , Timur Kose. Perikalsitolun Sıçanlarda Oluşturulan Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında MMP-2 ve MMP-9 Aktivitelerine Etkisi.Turkish Nephrology, Dialysis and Transplantation Journal, September 2016, Supp.1 Vol.25,3.      |
| <b>A. Kocak</b> , S. Sarioglu, D. Harmanci Karagulle, M. Birlik, G. Guner Akdogan. Investigation of effects of epigallocatechin-3- gallate on a scleroderma model of fibrosis, The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) p:79, DOI: 10.1111/febs.13807.                                                                |
| H. M. Said, D. Harmanci, <b>A. Kocak</b> , G. Gul, B. Acikgoz, F. D. Ince, C. Ural, Y. Soysal, C. Hagemann. Functional regulation of hypoxia induced genes in human brain cancer. The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) p:86, DOI: 10.1111/febs.13807.                                                             |
| S. Ersan, A. Celik, M. Tanrisev, I. Kose, Z. Cavdar, M. Unlu <b>A. Kocak</b> , C. Ural, B. Yilmaz, T. Kose. Paricalcitol attenuate activity and expression of matrix metalloproteinases in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) p:288, DOI: 10.1111/febs.13807. |
| F. Aydin Kose, S. Celebi, H. Cengiz, D. Harmanci, <b>A. Kocak</b> , E. Canbay, D. Aslan, E. Sezer, A. Pabuccuoglu, H. Kocdor. The 1st Turkish in vitro diagnostic symposium evaluation. The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) p:276, DOI: 10.1111/febs.13807.                                                      |
| <b>Kocak A.</b> , Guner G., A Special Study Module In Medical Education: A Model of Scleroderma Induced by Bleomycin, FEBS J. 282, Issue Supplement s1, July 2015, page 353.                                                                                                                                        |
| <b>Koçak A.</b> , Guner G., Tıp Eğitiminde Özel Çalışma Modülü: Bleomisinle Oluşturulmuş Deneysel Skleroderma Modeli, Turk J Biochem, 2015; 40 (S1), 215.                                                                                                                                                           |
| <b>Koçak A.</b> , Sarıoğlu S., Harmancı D., Yılmaz, O., Birlik M., Gül Güner Akdoğan G.G. Deneysel skleroderma modelinde epigallokateşin-3gallat’ın fibrozis üzerine etkilerinin araştırılması, Turk J Biochem, 2015; 40 (S1), 312.                                                                                 |
| <b>Koçak A.</b> , Korkmaz M. Deliloğlu Gürhan İ., Bor Türevlerinin Serviks Kanserine Büyüme Etkisinin Araştırılması, Türkiye Klinikleri J., Med. Sci. 2011, s.104.                                                                                                                                                  |

## YAZILAN ULUSLARARASI KİTAPLAR VEYA KİTAPLARDA BÖLÜMLER

Birlik M., **Koçak A.** , Harmancı D. Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis, Role of microRNAs in Rheumatoid Arthritis. DOI: 10.5772/67081. ISBN 978-953-51-5016-9.

## PROJELER

Damardan demir verilen farelerde lipoik asidin antioksidan özelliğinin ve böbrek hasarı üzerine etkisinin araştırılması (Dokuz Eylül Üniversitesi, Nefroloji Anabilim Dalı, 2017, Araştırmacı, Devam ediyor)

Sıçanlarda Bir Batında Doğan Yavru Sayısının ve Kafeslemenin Fiziksel ve Mental Gelişim Üzerine Etkilerinin İncelenmesi (Dokuz Eylül Üniversitesi, Laboratuvar Hayvanları Bilimi, 2017-Devam ediyor)

Sistemik skleroz hastalık alt gruplarında WNT yolağı aktivitesinin organ tutulumlarıyla ilişkisi (Dokuz Eylül Üniversitesi, Romatoloji & İmmunoloji Anabilim Dalı, 2017, Tübitak 3001 projesi, Araştırmacı, Devam ediyor)

Damardan demir verilen sıçanlarda lipoik asidin böbrek hasarı üzerine olası koruyucu etkisine aracılık eden moleküler mekanizmaların araştırılması (Dokuz Eylül Üniversitesi, Nefroloji Anabilim Dalı, 2017, Araştırmacı, Devam ediyor)

THP-1 Türevli Makrofaj ve Köpük Hücrelerinde Wnt5a Ekspresyon Değişimlerinin Aterosklerotik Süreçte Rol Oynayan CD36, SR-A1, LRP1, LOX1 Kolesterol Alım ve ABCA1, ABCG1 Kolesterol Atılım Genlerinin Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması (Dokuz Eylül Üniversitesi, Moleküler Tıp anabilim Dalı, BAP Onaylı 2018, Araştırmacı, Devam ediyor)

Paricalcitol ve Nebivolol'ün sıçanlarda oluşturulmuş renal iskemi-reperfüzyon hasarında olası koruyucu etkisine aracılık eden moleküler mekanizmaların tanımlanması (Dokuz Eylül Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Moleküler Tıp Anabilim Dalı, 2016, Araştırmacı, Devam ediyor)

Fibro-proliferatif Skar Dokularında miR-29 Ailesi Varlığının, miR29'un Kollajen Maturasyonuna Etkisinin ve Ekstrasellüler Matriks Sentezi ile İlişkili Sinyal Yolaklarındaki Rolünün İncelenmesi (Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, BAP Onaylı 2015, Araştırmacı, Devam ediyor)

Deneyssel renal iskemi-reperfüzyon hasarında parikalsitol ve nebivololün MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerine etkisi. (Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi, Nefroloji AbD.-2014- Araştırmacı, Tamamlandı)

Özafagus Kanserli ve Özefajitli Hastalarda Global Histon Modifikasyon Profillenmesi (2010 Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi –Araştırmacı, Tamamlandı)

Bor Türevlerinin Serviks Kanserinde Büyüme Etkilerinin Araştırılması (2009-2011 Celal Bayar Üniversitesi BAP destekli yüksek lisans tez projesi-Araştırmacı, Tamamlandı)

Bora Maruz Kalan Bireylerdeki Transkripsiyon Faktörlerinin Gen Ekspresyon Profiline RT-PCR Array ile Araştırılması. (Celal Bayar Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Birimi, 2009, Araştırmacı,

|                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tamamlandı)                                                                                                                                          |
| Yunt Dağı Bölgesinde kromozomal abnormalitelerin araştırılması. (Celal Bayar Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Birimi, 2009, Araştırmacı, Tamamlandı) |

### **BİLİMSEL ETKİNLİK GÖREVLERİ**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Düzenleme Kurulu: FEBS Education Workshop. İzmir Ekonomi Üniversitesi.6-8 Eylül 2018.                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Düzenleme Kurulu: ORPHEUS Danışmanlık Eğitimi Çalıştayı. İzmir Ekonomi Üniversitesi. 21-22 Haziran 2018.                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Düzenleme Kurulu: 2223 programı TUBİTAK DESTEKLİ, III. IVD Sempozyumu, "Endokrin ve Metabolik Hastalıklar, Tanıdan Tedaviye Biyobelirteçler" 28 Şubat-3 Mart 2018.                                                                                                                                                                                              |
| Düzenleme Kurulu: 2223 programı TUBİTAK DESTEKLİ, II. IVD Sempozyumu, "Biyobelirteçler" (Hastalıkta & Sağlıkta), Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, 10-12 Mayıs 2017.                                                                                                                                                                                             |
| Düzenleme Kurulu: İnsülin Direnci Sempozyumu, Bornova Kültür Merkezi, İzmir, 22 Mart 2017.                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Düzenleme Kurulu: Yara İyileşmesi: Temel Biyoloji ve Son Teknolojiler Sempozyumu, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB), DEÜ Tıp Fakültesi, 25 Mart 2016.                                                                                                                                                                       |
| Düzenleme Kurulu: Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ARLAB XII. Hücresel, moleküler ve Analitik Teknikler Kursu-1-2 Mart 2016.                                                                                                                                                                                                                            |
| Düzenleme Kurulu: Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Türk Biyokimya Derneği İzmir Şubesi ortaklığına ek TürkLab Kalibrasyon ve Deney Laboratuvarları Derneği'nin katılım desteğiyle "Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu: Tıbbi Laboratuvar Testleri: Eğitim-Öğretim, Araştırma, Üretim, Hizmet, İnovasyon, Bilişim": 18-20 Şubat 2016. |
| Düzenleme Kurulu: Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ARLAB-Araştırma laboratuvarlarında Biyogüvenlik ve Çalışan Sağlığı Çalıştayı 11 Ocak 2016.                                                                                                                                                                                                           |
| Düzenleme Kurulu: Türk Biyokimya Derneği, İzmir Şubesi, Laboratuvar ve Bilgisayar Başlı Çalışanlarında Bel ve Boyun Sağlığı Paneli, 5 Ocak 2016.                                                                                                                                                                                                                |
| Düzenleme Kurulu & Eğitici: Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ARLAB Hücresel, Moleküler ve Analitik Teknikleri Kursu, Tarih: 27 Temmuz – 1 Ağustos 2015.                                                                                                                                                                                                 |
| Düzenleme Kurulu: Uluslararası Moleküler Tıp Kongresi-Mayıs 2015, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Kampüsü, İzmir.                                                                                                                                                                                                                                               |
| Lisansüstü Öğrenci Kurulu: Çalıştay "Sağlıkta inovasyon: Üniversiteden Sanayiye" (Deneyimler, Destekler, Fırsatlar ve Başarı Öyküleri), 16-17 Mayıs 2013,Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Kampüsü, İzmir                                                                                                                                                         |

### **BİLİMSEL VE MESLEKİ KURULUŞLARA ÜYELİKLER**

|                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği (2008-Devam Ediyor)                                                |
| Hücre Ölümü Araştırma Derneği (2011-Devam Ediyor)                                                    |
| Türk Biyokimya Derneği (2012- Devam Ediyor)<br>(2015'ten itibaren İzmir Şubesi Yönetim Kurulu Üyesi) |
| Moleküler Biyoloji ve Genetik Derneği (2010- Devam Ediyor)                                           |
| International Society for Matrix Biology (2017- Devam Ediyor)                                        |



### **8.3. Tez ve Tezle İlişkili Konularda Yayımlanmış Makaleler**

**8.3.1. Kocak Ayse** , Harmanci Duygu, Cavdar Zahide, Ural Cemre , Birlik Merih, Sarioglu Sulen, Yilmaz Osman, Guner Akdoğan Gul. Antioxidant effect of Epigallocatechin-3-Gallate in a bleomycin induced scleroderma model. The Archives of Rheumatology 2018. (Kabul Edildi.)

**Antioxidant effect of Epigallocatechin-3-Gallate in a bleomycin induced scleroderma model**

Kocak Ayse<sup>1</sup>, Harmanci Duygu<sup>1</sup>, Cavdar Zahide<sup>1</sup>, Ural Cemre<sup>1</sup>, Birlik Merih<sup>2</sup>, Sarioglu Sulen<sup>3</sup>, Yilmaz Osman<sup>4</sup>, Guner Akdoğan Gul<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, Molecular Medicine Department, Izmir

<sup>2</sup> Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Rheumatology, Izmir

<sup>3</sup> Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Pathology, Izmir

<sup>4</sup> Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, Department of Laboratory Animal Sciences, Izmir

<sup>5</sup> Izmir University of Economics, Medical Faculty, Medical Biochemistry Department, Izmir

**Correspondence to:** Mrs. Ayse Kocak, Department of Molecular Medicine, Institute of Health Sciences, Dokuz Eylul University Health Campus, Izmir 35340, Turkey

E-mail: kocak.ayse@gmail.com

**Keywords:** Scleroderma, oxidative stress, fibrosis, antioxidant effect

**1. Introduction:**

Systemic sclerosis or scleroderma (SSc) is an autoimmune connective tissue disease (1). SSc is characterized by fibrosis of skin and internal organs. The cause of SSc is unknown and pathogenesis is unclear; it is characterized by overproduction of ECM (2). In this disease, normal tissue architecture is broken and replaced with collagen-rich, stiff connective tissue (3). Also, SSc is a very rare disease in the population and shows three pathological features: injuries to vascular endothelial cells, imbalanced immune system and excessive extracellular matrix (ECM) accumulation (1). As in other autoimmune diseases, women are at higher risk than men (3-5). In this disease, oxidative stress may play a role for pathogenesis (6-8). Recent studies showed a relationship between oxidative/antioxidative markers and SSc (9-12).

Animal models are used to provide clues and therapeutic interventions for human diseases. Bleomycin is often used as an anti-tumour agent for several cancer types and is originally isolated from the fungus *Streptomyces verticillus* (13). Recent studies showed that bleomycin upregulates collagen mRNA expression in human lung or dermal fibroblasts *in vivo* models like a normal scleroderma phenotype (14, 15). Yamamoto et al. established a mice model for scleroderma by local treatment by bleomycin *subcutaneous* (sc) injections during 21 days (16-21). Concerning the *in vivo* research, the bleomycin-induced experimental scleroderma mouse is the most used model for studying scleroderma (22).

Overproduction of ROS is known to induce tissue damage and cell death, which could lead to several physiological and pathological processes. Studies have shown that ROS generation occurs in fibrosis. ROS, such as superoxide anions, hydrogen peroxides, and hydroxyl radicals have been demonstrated to be an important mediator of BLM-induced fibrosis (23-25). In scleroderma, TGF- $\beta$  signaling increases fibroblast proliferation, collagen synthesis and ROS production (26,27). This situation also leads to suppress the expression of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) (27). The accumulation of matrix proteins is increased by both TGF- $\beta$  signaling and ROS production (27). Besides, there are studies showing that free radicals cause immune system activation and cytokine production and stimulate extracellular matrix elements and the amount of collagen (28-30).



There are two types of antioxidant systems in human metabolism. The first one is the enzymatic antioxidant system, including SOD, glutathione peroxidase (GSH-Px), and catalase (CAT) enzymes. The second is the nonenzymatic antioxidant system, including carotenoids, vitamin E, vitamin C, thiol, and glutathione. Malondialdehyde (MDA) is a lipid peroxidation marker for oxidative stress.

This study was planned to investigate the possible role of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the oxidative stress in BLM-induced fibrosis on scleroderma. EGCG, the most abundant catechin, is the major effective component of green tea and has been shown to have beneficial health effects on skin (31, 32). In liver fibrosis, EGCG was shown to inhibit proliferation of fibroblasts, reducing collagen deposition, and upregulating the mitochondrial respiratory chain (33). EGCG has been shown to play protective role against breast cancer (34-36) colon and prostate cancer (37). Besides, it has been promising as a source of new molecular therapies. The possible role of EGCG in oxidative stress has attracted attention over the last few years. However, the role of EGCG on scleroderma focusing on the pathways involving oxidative stress has not been investigated.

In this study we investigated the potential antioxidant role of EGCG on the scleroderma model focusing on the following parameters: Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), NF- $\kappa$ B, pp-38 and p-Akt protein levels.

## **2. Materials -Methods:**

**2.1. Animals:** Skin fibrosis was induced in 6–8-week-old, 20-22 gram- weight, pathogen-free female *Balb/c* mice (Dokuz Eylul University, Department of Experimental Animals) by local injection of bleomycin for 21 days (16, 20, 38). The animals were kept under standard animal laboratory conditions: temperature of 20–22°C, humidity of 55–60%, photoperiod of 12:12 hour light: dark cycle. They had free access to standard laboratory feed and water, according to the study protocol. All methods including the euthanasia procedure were conducted in accordance with Guide for Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research,

National Institute of Health (NIH). The study protocol was reviewed and approved by Dokuz Eylül University Ethics Committee for Animal Research (Protocol No: 1/2018).

**2.2. Experimental Model Design:** Skin fibrosis was induced in 6–8-week-old, pathogen-free 32 female *Balb/c* mice (DEU, Department of Experimental Animals) by local injection of bleomycin for 21 days. Bleomycin was used for scleroderma model (Onko Koçsel, Turkey). The epigallocatechin-3-gallate-EGCG (Sigma-Aldrich, UK) solution was prepared as 20 mg/kg in saline as reported earlier (39). A total of 32 female *Balb/c* mice were used and randomly divided into 4 groups of 8 animals each, as follows:

1. Control group (n:8) was given 100  $\mu$ L (100  $\mu$ g) *subcutaneous* (sc) saline (SF) once a day, 100  $\mu$ L (100  $\mu$ g) *intraperitoneal* (ip) SF twice a week,
2. BLM group (n:8) was given 100  $\mu$ L (100  $\mu$ g) sc BLM once a day, 100  $\mu$ L (100  $\mu$ g) ip SF twice a week,
3. BLM + EGCG group (n :8) was given 100  $\mu$ L (100  $\mu$ g) sc BLM once a day, 100  $\mu$ L (100  $\mu$ g) ip EGCG twice a week,
4. EGCG group (n:8) was given 100  $\mu$ L (100  $\mu$ g) sc SF once a day, 100  $\mu$ L (100  $\mu$ g) ip EGCG twice a week.

After 21 days, the animals were sacrificed under ether anesthesia in sterile condition. The injected skin section was removed and processed for analysis.

**2.3 Histopathological Examination:** The injected sections of mice skin were fixed in 4% formalin and embedded in paraffin. Four micrometer ( $\mu$ m) sections were stained with Masson's trichrome. Dermal thicknesses of the injected sections were analyzed with an Nikon Eclipse C1 microscope (Nikon, Japan) at 200-fold magnification and digitalized by Nikon DS-Fi2 camera. Dermal sections were measured (as  $\mu$ m) on 10 areas. In each series of experiments, the dermal thicknesses were evaluated statistically.

**2.4. Malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) assays:** All dermal tissues were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before the experiment. Dermal tissues were washed with cold phosphate buffer solution and homogenized using a Tissue Lyser (Qiagen, UK) in 50 mM

potassium phosphate buffer pH: 7.8, containing 0.5 mmol/L PMSF, 10 µg/mL aprotinin, and centrifuged at 2500 g for MDA analysis.

The protein content in each tissue was determined using the bicinchoninic acid protein assay (BCA) (Pierce, USA). Bovine serum albumin was used as a standard.

The MDA assay was based on the condensation of one molecule of malondialdehyde with two molecules of thiobarbituric acid (TBA) in the presence of reduced agents. The TBA + MDA complex was analyzed by HPLC system. The MDA levels were expressed as µmol/g protein.

For the SOD assay, homogenates were centrifuged at 11000 ×g for 10 min. The supernatant was used for determination of SOD enzyme activity. SOD activity was analysed by spectrophotometric assay kit (Cayman, MI, USA) and performed according to the manufacturer's instructions. This assay utilizes a tetrazolium salt for the detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine. The reaction was monitored at 440 nm using a plate reader (Synergy HT, BioTek Instrument Inc., Winooski, USA). One unit (U) of SOD is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% dismutation of the superoxide radical. SOD activity data were expressed as U/mg protein.

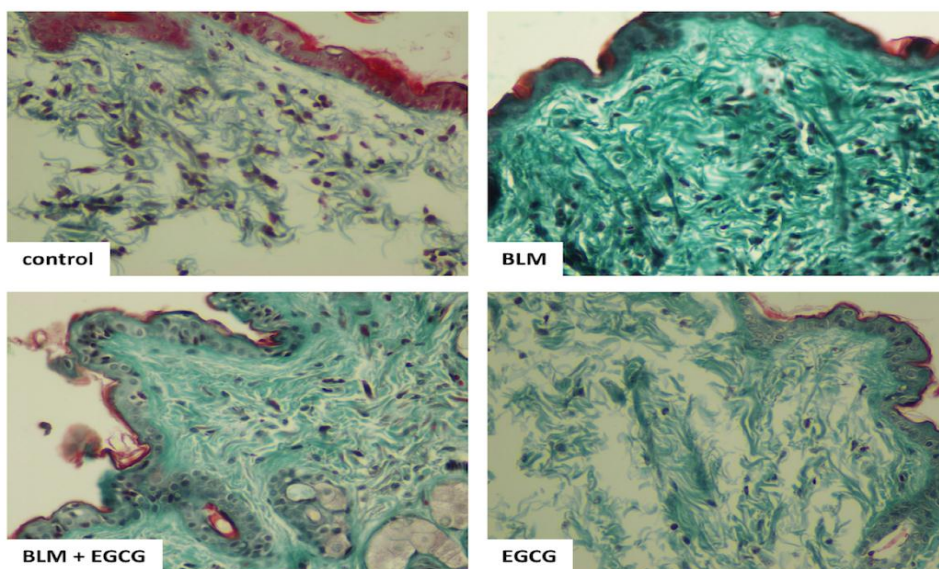
**2.5. Detection of pp-38, p-Akt, NF-κB by western blotting:** The protein concentration was quantified using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo Pierce, USA). A total 25 µg of protein was separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a 0.45 µm pore size, Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, USA) which was then blocked for 1 hour at room temperature using 5% skim milk/Tris buffered saline–Tween (TBST). The blots were incubated overnight with a 1:1,000 dilution of appropriate primary antibody in 5% skim milk/TBST. The following antibodies were used: Rabbit pp-38, p-38, Akt, p-Akt, NF-κB (Cell Signaling, USA). After the primary incubation, membranes were washed with TBST, the blots were incubated with the appropriate horseradish peroxidase–conjugated mouse anti-rabbit secondary antibody (Cell Signaling, USA). As a control for equal protein loading, membranes were stripped and re-incubated for β-actin using a monoclonal antibody

(Santa Cruz Biotechnology, USA). Protein bands were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL) (Millipore, USA) and were quantitated using Image-J, NIH Image densitometry software. Relative expressions of proteins were calculated using the ratios: NF- $\kappa$ B /  $\beta$ -actin, p-Akt/Akt, pp-38/p-38. All experiments were performed in triplicate and the western blotting images were presented as the representative of three images.

**2.6. Statistical analysis:** All experimental data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. The data were analyzed using Student's t-test and differences between multiple groups were evaluated by ANOVA two-way analysis of variance. Statistical analyses were performed with SPSS 22.0 (IMB, SPSS, Armonk, NY, USA).  $P < 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference.

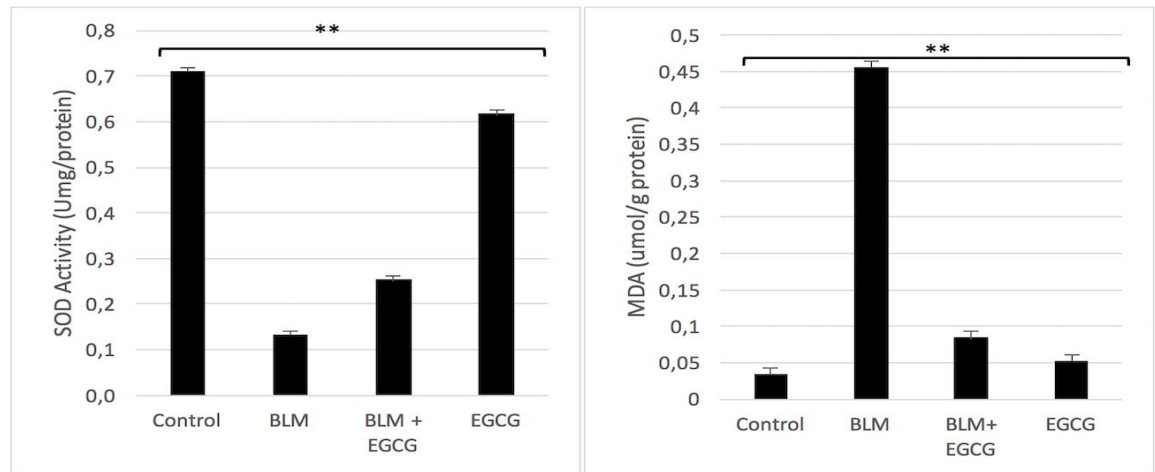
### **3. Results:**

**3.1. Effects of EGCG on dermal thickness and collagen content:** Masson trichrome staining was performed and the histological examination of the skin tissues from the mice is shown in Figure 1. The dermal thicknesses in the BLM+EGCG injected mice were significantly lower than in the BLM injected mice respectively ( $p < 0.05$ , Figure 1).



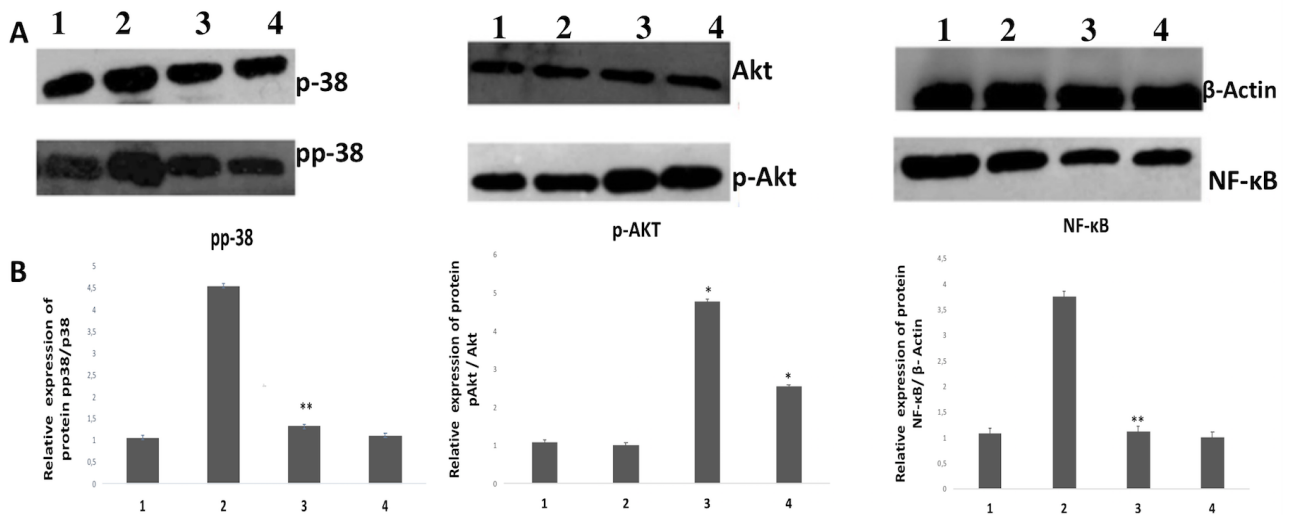
**Figure 1.** Masson- Trichrome staining. Evidence of fibrosis (green color) was more prominent in the BLM group than BLM + EGCG group. Original magnification 20X. (A) Control Group (B) BLM group (C) BLM + EGCG group (D) EGCG group.

**3.2. Effects of EGCG on SOD activity and MDA levels:** The effect of EGCG on the activity of the antioxidant enzyme (SOD) and MDA content is represented in Figure 2. A marked decrease in the SOD activity and a significant increase in the content of MDA were observed in the Bleomycine groups compared with the controls. The MDA content was decreased and SOD activity was increased in the EGCG groups ( $P < 0.05$ ) compared with the BLM groups.



**Figure 2.** EGCG increased SOD activity and decreased MDA activity. (\*\* $p < 0.05$ )

**3.3. Effect of EGCG on pp-38, NF- $\kappa$ B and p-Akt activity:** The western blotting analysis showed that EGCG increased the phosphorylation of AKT in the EGCG group compared with the control and BLM groups significantly (Figure 3,  $p < 0.05$ ). The pp-38 and NF- $\kappa$ B protein levels did not differ between control, EGCG and BLM group ( $p > 0.05$ )



**Figure 3.** Effects of EGCG treatment on p-Akt, pp-38, NF- $\kappa$ B protein levels. **(A)** Western blotting were performed to measure protein levels of p-Akt, pp-38 and NF- $\kappa$ B, as described under materials and methods. **(B)** Quantitative results of p-Akt, pp-38, NF- $\kappa$ B protein levels. Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). (1) Control Group, (2) BLM Group, (3) BLM + EGCG Group, (4) EGCG Group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

As shown Figure 3, p-Akt protein levels increased in the BLM + EGCG group compared with the BLM group ( $p < 0.05$ ). Also, The pp-38 and NF- $\kappa$ B protein levels were decreased ( $p < 0.01$ ) in the BLM + EGCG groups compared with the BLM groups.

**4. Discussion:** In this study, the effect of EGCG on BLM-induced scleroderma mice model was evaluated, focusing on the oxidative stress pathways (p-38, p-akt and NF- $\kappa$ B) as well as the oxidative stress parameter MDA and the and the anti-oxidant enzyme SOD.

The p38-mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway is conserved signaling pathway that responds to oxidative stress (40). NF- $\kappa$ B signaling is also activated and regulates cellular behaviour. Also, PI3K/AKT pathway is considered one of the most crucial factors for cell survival against oxidative stress (41).

Scleroderma (SSc) is a systemic autoimmune disease of unknown aetiology and pathogenesis. It is characterized by progressive tissue fibrosis. Fibrosis, characterized by excessive accumulation of the extracellular matrix, is a clinical hallmark of many disorders such as scleroderma. Oxidative stress and tissue inflammation are the underlying events that accompany the development of fibrosis in scleroderma (4).

In one study, several dietary antioxidants in nature were studied as therapeutic agents (42) and it was observed that the different antioxidants showed different defense mechanisms, and thus they possessed different potential therapeutic treatments. They reported that EGCG, one of the most active components of tea polyphenols, acts as antioxidant by scavenging reactive oxygen species. The significant antioxidant effect of EGCG is sweeping the free radicals. EGCG can act as electron traps to scavenge free radicals or inhibit the formation of ROS such as  $O_2^-$  and  $ONOO^-$  (43). However, they have not studied its role on the signaling pathways in scleroderma.

In our study, SOD activity was decreased and MDA content was increased in the experimental group (Figure 2). SOD enzyme activity and MDA levels are important indicators of oxidative stress and respond to induced oxidative stress (44).

EGCG has also been shown by some studies to directly inhibit several molecular targets and regulate multiple signal transduction pathways such as MAP kinases (p38) and the redox-sensitive transcription factor (NF- $\kappa$ B) in the cardiovascular and cancer studies (45-47). Akt signaling pathway plays an important role in cell growth, survival and motility. Several studies have also highlighted mechanisms by which EGCG could exert anti-fibrotic effects such as blocking the activation of NF- $\kappa$ B (48, 49). NF- $\kappa$ B signalling pathway is activated by both oxidative stress and inflammatory factors and it is considered to be a prototypical pro-inflammatory signalling pathway for its role in the expression of other pro-inflammatory genes (50). Dooley et al and Kim et al reported that EGCG reduces ROS, ERK1/2 and JNK signalling pathways, as well as NF- $\kappa$ B activity (51, 52).

Our findings on the scleroderma mice model showed that Akt phosphorylation was increased in the experimental groups, and suggest that EGCG helps the survival of the cell (Figure 3). We also showed that EGCG could suppress phosphorylation of p38 signalling and also decrease NF- $\kappa$ B activity of dermal tissue of mice (Figure 3). Also, we showed that NF- $\kappa$ B phosphorylation was decreased in the EGCG groups.

Our previous data showed that EGCG can effectively inhibit collagen content and myofibroblasts and TGF- $\beta$  signaling (53). In this study, we suggest that the inhibitory effect of EGCG on fibrosis may be at least partly due to ROS inhibition.

In conclusion, we state that EGCG reduced the severity of fibrosis in an experimental animal model of scleroderma. The improved pathology occurred in association with lower concentrations of pro-fibrogenic factors, lipid peroxides, Akt, p-38 and NF- $\kappa$ B. This study presents novel data concerning the effect of EGCG on the oxidative state in a scleroderma model. In the future, these parameters may be investigated for their possible role in the diagnosis and monitoring of the scleroderma.



**Acknowledgements:** This research was carried out at Dokuz Eylul University Medical Faculty Research Laboratory (R-LAB)

**References:**

1. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;117(3):557-67.
2. Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol* 2011;8(1):42-54.
3. Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, Lehmacher W, Melchers I, Meurer M, et al. The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology* 2008;47(8):1185-92.
4. Allanore Y, Dieude P, and Boileau C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatology* 2010; 49(2): 203-10.
5. Mayes MD, Lacey JV Jr, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 2003;48(8): 2246-55.
6. Herrick AL, Matucci Cerinic M. The emerging problem of oxidative stress and the role of antioxidants in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:4–8.
7. Lundberg AC, Akesson A, Akesson B. Dietary intake and nutritional status in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1143–8.

8. Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guilpain P, Chereau C, et al. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J Immunol* 2009;182:5855–64.
9. Kawashiri SY, Ueki Y, Terada K, Yamasaki S, Aoyagi K, Kawakami A. Improvement of plasma endothelin-1 and nitric oxide in patients with systemic sclerosis by bosentan therapy. *Rheumatol Int* 2014;34:221–5.
10. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. Statins as immunomodulators in systemic sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1110:670–80.
11. Riccieri V, Spadaro A, Fuksa L, Firuzi O, Saso L, Valesini G. Specific oxidative stress parameters differently correlate with nailfold capillaroscopy changes and organ involvement in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2008;27:225–30.
12. Ogawa F, Shimizu K, Muroi E, Hara T, Sato S. Increasing levels of serum antioxidant status, total antioxidant power, in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2011;30:921–5.
13. Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y, et al. New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot* 1966;19(5):200-9.
14. Yamamoto T, Eckes B, Krieg T. Bleomycin increases steady-state levels of type I collagen, fibronectin and decorin mRNAs in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2000; 292(11):556-561.
15. Clark JG, Starcher BC, Uitto J. Bleomycin-induced synthesis of type I procollagen by human lung and skin fibroblasts in culture. *Biochim Biophys Acta* 1980;631(2): 359-370.

16. Yamamoto T, Kuroda M, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. III: Histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Arch Dermatol Res* 2000;292(11):535-41.
17. Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. IV: induction of dermal sclerosis by bleomycin is T cell independent. *J Invest Dermatol* 2001;117(4):999-1001.
18. Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. V: Increased expression of alpha-smooth muscle actin in fibroblastic cells in bleomycin-induced scleroderma. *Clin Immunol* 2002;102(1):77-83.
19. Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. VI: Evaluation of bleomycin-induced skin sclerosis in nude mice. *Arch Dermatol Res* 2004;295(10):453-6.
20. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999;112(4):456-62.
21. Yamamoto T, Takahashi Y, Takagawa S, Katayama I, Nishioka K, et al. Animal model of sclerotic skin II. Bleomycin induced scleroderma in genetically mast cell deficient WBB6F1-W/W(V) mice. *J Rheumatol* 1999;26(12):2628-34.
22. Avouac J, Elhai M, Allanore Y. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2013;80(1):23-8.
23. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:933–956.
24. Hu C, Kitts DD. Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems in vitro. *Mol Cell Biochem* 2001;218:147–155.

25. Nakagawa H, Wachi M, Woo JT, Kato M, Kasai S, Takahashi F, et al. Fenton reaction is primarily involved in a mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate to induce osteoclastic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:94–101.
26. Badea I, Taylor M, Rosenberg A, Foldvari M. Pathogenesis and therapeutic approaches for improved topical treatment in localized scleroderma and systemic sclerosis. *Rheumatology* 2009;48(3):213–221.
27. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Amica D. New insights into the role of oxidative stress in scleroderma fibrosis. *Open Rheumatol J* 2012;6:87–95.
28. Distler JH, Jungel A, Pileckyte M, Zwerina J, Michel BA, Gay RE, et al. Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007;56(12):4203–4215.
29. Bozkurt M, Dag S, Oktayoglu P, Em S, Yuksel H, Caglayan M, et al. Serum prolidase enzyme activity and oxidative status in patients with scleroderma. *Acta Medica Mediterranea* 2014; 30:127–132.
30. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Pomponio G, Santillo M, Avvedimento EV. Oxidative stress and the pathogenesis of scleroderma: the Murrell's hypothesis revisited. *Semin Immunopathol* 2008;30(3):329–337.
31. Roh E, Kim JE, Kwon JY, Park JS, Bode AM, Dong Z, et al. Molecular Mechanisms of Green Tea Polyphenols with Protective Effects against Skin Photoaging. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017;57(8):1631-1637.
32. White OP, Tribout H, Baron E. Protective mechanisms of green tea polyphenols in skin. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 560682.

33. Santamarina AB, Carvalho-Silva M, Gomes LM, Okuda MH, Santana AA, Streck E, et al. Decaffeinated green tea extract rich in epigallocatechin-3-gallate prevents fatty liver disease by increased activities of mitochondrial respiratory chain complexes in diet-induced obesity mice. *J Nutr Biochem* 2015;26(11):1348-1356.
34. K. Imai, K. Suga, K. Nakachi. Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population, *Prev Med* 1997; 26 (6): 769-775.
35. Shrubsole MJ, Wei L, Zhi C, Xiao OS, Ying Z, Qi D, et al. Drinking green tea modestly reduces breast cancer risk, *J Nutr* 2009;139(2):310-316.
36. Wu AH, Yu MC, Tseng CC, Hankin J, Pike MC. Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans, *Int J Cancer* 2003;106 (4):574-579.
37. Guo Y, Zhi F, Chen P, Zhao K, Xiang H, Mao Q, et al. Green tea and the risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis, *Medicine* 2017;96 (13):6426.
38. Yamamoto T. Animal model of sclerotic skin induced by bleomycin: a clue to the pathogenesis of and therapy for scleroderma? *Clin Immunol* 2002;102(3):209-16.
39. Sriram N, Kalayarasan S, Sudhandiran G. Enhancement of antioxidant defense system by epigallocatechin-3-gallate during bleomycin induced experimental pulmonary fibrosis, *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 1306–11.
40. Tian L, Chen J, Chen M, Gui C, Zhong C, Hong L, et al. The p38 Pathway Regulates Oxidative Stress Tolerance by Phosphorylation of Mitochondrial Protein IscU. *J Biol Chem* 2014; 289: 31856.

41. Ying Liang, Jiajia Li, Qinlu Lin, et al. Research Progress on Signaling Pathway-Associated Oxidative Stress in Endothelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017;7156941, 8.
42. Bruckdorfer KR. Antioxidants and CVD. *Proc Nutr Soc* 2008; 67:214–22.
43. Tipoe GL, Leung TM, Hung MW, Fung ML. Green tea polyphenols as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2007;7: 135–44.
44. Del Rio D, Stewart AJ and Pellegrini N: A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15:316–328.
45. Khan N, Mukhtar H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Lett* 2008; 269:269–80.
46. Stangl V, Dreger H, Stangl K, Lorenz M. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2007; 73:348–58.
47. Yang CS, Lambert JD, Hou Z, Ju J, Lu G, Hao X. Molecular targets for the cancer preventive activity of tea polyphenols. *Mol Carcinog* 2006; 45:431–5.
48. Yasuda Y, Shimizu M, Sakai H et al. (-)-Epigallocatechin gallate prevents carbon tetrachloride-induced rat hepatic fibrosis by inhibiting the expression of the PDGFR-beta and IGF-1R. *Chem Biol Interact* 2009;182:159–64.
49. Sakata R, Ueno T, Nakamura T, Sakamoto M, Torimura T, Sata M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cell line LI90. *J Hepatol* 2004;40:52–9.

50. Guo Y, Zhi F, Chen P, Zhao K, Xiang H, Mao Q, et al. The non-canonical NF- $\kappa$ B pathway in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2017; 17: 545–558.
51. Dooley A et al. Modulation of collagen type I, fibronectin and dermal fibroblast function and activity, in systemic sclerosis by the antioxidant epigallocatechin-3-gallate. *Rheumatology* 2010; 11: 2024–2036.
52. Kim J, Hwang JS, Cho YK, Han Y, Jeon YJ, Yang KH. Protective effects of epigallocatechin-3-gallate on UVA and UVB induced skin damage. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14: 11–9.
53. Kocak A et al. Effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on a scleroderma model of fibrosis. *Turkish Journal of Biochemistry* 2018; 0(0), pp. -. Retrieved 8 Feb. 2018, from doi:10.1515/tjb-2017-0185.

**8.3.2. Kocak A,** Harmancı D, Birlik M, Sarıoğlu S, Osman Y, Zahide C, Guner G. Effects of Epigallocatechin-3- gallate (EGCG) on a Scleroderma Model of Fibrosis. TJB: vol:43 (2018), iss:6. DOI: 10.1515/tjb-2017-0185.





## Research Article



Ayşe Kocak\*, Duygu Harmancı, Merih Birlik, Sülen Sarıoğlu,  
Osman Yılmaz, Zahide Cavdar and Gul Guner

# Effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on a scleroderma model of fibrosis

## Epigallokateşin-3-gallat'ın (EGCG) Skleroderma Fibrosis Modeli Üzerine Etkileri

<https://doi.org/10.1515/tjb-2017-0185>

Received April 6, 2017; accepted April 11, 2017

## Abstract

**Objective:** The aim of the present study was to evaluate the potential protective effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on fibrosis in bleomycin induced scleroderma model.

**Materials and methods:** Thirty-two healthy female Balb-c mice with the average body weight of  $22 \pm 5$  g were used in this study. The mice were randomly divided into four groups as control (n=8), Bleomycin (n=8), Bleomycin + EGCG (n=8) and EGCG (n=8). Skin tissue samples were collected to quantify matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), p-SMAD 2/3 and SMAD 2/3 in protein homogenates by western blotting. TGF- $\beta$ 1 expression was determined by real-time PCR. Immunohistopathological

and histopathological examinations of skin tissues were also done.

**Results:** When measured with Masson Trichrome, EGCG treatment was found to decrease fibrosis in connective tissue compared to the BLM injected control. EGCG was decreased dermal fibrosis. Bleomycin + EGCG group showed a significant reduction in fibrosis at the dermal surface area using hematoxylin measurements compared with the BLM group. MMP-1, MMP-8 protein levels were increased and p-SMAD 2/3 protein level was decreased. TGF- $\beta$  mRNA expression was decreased in the EGCG + BLM group compared with the BLM group.

**Conclusion:** These results suggest an antifibrotic role for EGCG.

**Keywords:** BLM induced Scleroderma; EGCG; Fibrosis; TGF- $\beta$ ; MMPs.

## Özet

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, bleomisinle (BLM) oluşturulmuş skleroderma modelinde epigallokateşin-3-gallat'ın (EGCG) fibrozis üzerine olası koruyucu etkilerini değerlendirmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada ortalama vücut ağırlığı  $22 \pm 5$  g olan 32 adet sağlıklı dişi Balb-c fare kullanıldı. Fareler rastgele olarak; kontrol (n=8), Bleomisin (n=8), Bleomisin + EGCG (n=8) ve EGCG (n=8) olmak üzere dört gruba ayrıldı. p-SMAD 2/3, SMAD 2/3 ve matriks metalloproteinaz (MMP-1, MMP-8, MMP-13) proteinlerinin western blotting tayini için dermal doku örnekleri toplandı. TGF- $\beta$ 1 mRNA ekspresyonu qPCR ile belirlendi. Deri dokularında immünohistopatolojik ve histopatolojik incelemeler yapıldı.

**Sonuçlar:** Masson Trikrom boyama sonuçlarına göre, EGCG uygulanan grupta fibrozisin azaldığı gözlemlendi. Hematok-silen-eozin boyama sonuçlarına göre, Bleomisin + EGCG

\*Corresponding author: Ayşe Kocak, Institute of Health Sciences, Department of Molecular Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey, e-mail: kocak.ayse@gmail.com.  
<http://orcid.org/0000-0002-1510-2937>

**Duygu Harmancı and Zahide Cavdar:** Institute of Health Sciences, Department of Molecular Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey, e-mail: duyguharmanci@gmail.com (D. Harmancı), zahide.cavdar@deu.edu.tr (Z. Cavdar)

**Merih Birlik:** Faculty of Medicine, Internal Medicine, Division of Rheumatology, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey, e-mail: birlikm@gmail.com

**Sülen Sarıoğlu:** Faculty of Medicine, Department of Medical Pathology, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey, e-mail: sulen.sarioglu@deu.edu.tr

**Osman Yılmaz:** Institute of Health Sciences, Department of Laboratory Animal Sciences, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey, e-mail: osman.yilmaz@deu.edu.tr

**Gul Guner:** Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, İzmir University of Economics, İzmir, Turkey, e-mail: akdogan.gul@izmirekonomi.edu.tr

grubu ile BLM grubu karşılaştırıldığında EGCG uygulanan grupta fibrozis anlamlı ölçüde azaldı. EGCG uygulanan grupta MMP-1, MMP-8 protein düzeylerinin arttığı ve p-SMAD 2/3 protein düzeyinin azaldığı belirlendi. BLM ve BLM + EGCG grupları karşılaştırıldığında TGF- $\beta$  mRNA ekspresyonunun EGCG uygulanan grupta azaldığı gözlemlendi.

**Sonuç:** Sklerodermada, EGCG antifibrotik bir rol oynamaktadır.

**Anahtar sözcükler:** BLM ile oluşturulmuş scleroderma; EGCG; Fibrozis; TGF- $\beta$ ; MMP'ler.

## Introduction

Systemic scleroderma (SSc) is a complex disease with three main clinical features: excessive chronic matrix (ECM) accumulation, vascular damage and inflammation autoimmunity [1]. Although the pathogenesis is unclear, SSc is characterized by abnormal reshaping of connective tissues in the skin and internal organs, due to the overproduction of ECM, in particular that of collagen, by fibroblasts [2]. SSc is a very rare disease all around the world having a prevalence ranging from 50 to 300 cases per million. As with other autoimmune diseases, women are at higher risk than men [3–5]. Concerning the in vivo research, the bleomycin-induced experimental scleroderma mouse is the most widely used model for studying scleroderma, and it is the best model for studying the prevention or treatment of fibrosis [6]. Nevertheless, there is no therapy or cure for SSc or for reversing the fibrosis of the skin and internal organs. TGF- $\beta$ /Smad 2-3 is one of the most important pathways in scleroderma. TGF- $\beta$  promotes ECM synthesis, such as collagen type I or fibronectin, thereby altering the proteins of the cell matrix, and modulating the production of related proteins by its proteolytic activity [7]. In this disease, increased TGF- $\beta$  signaling may span fibroproliferative and inflammatory subsets and lead to the progressive deposition of ECM, resulting in fibrosis [8]. The expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in fibroblasts are also very important for differentiation into myofibroblasts and it coincides with an increase in the process of cell proliferation [9].

Matrix metalloproteinases (MMPs) are important enzymes of breakdown for various ECM components. MMPs can be divided into subgroups such as collagenases, stromelysins, stromelysin-like MMPs, gelatinases, membrane-type MMPs, and other Matrix metalloproteinases. MMP-1 (interstitial collagenase-1) is effective in initiating degradation of interstitial collagen types I, II, and

III [10]. MMP-8 (collagenase-2 or neutrophil collagenase) belongs to the collagenase family, which degrades various ECM proteins such as collagen type I [11]. MMP-13 (collagenase-3) is the interstitial collagenase which is elevated and positively correlated with pulmonary fibrosis [12].

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the most abundant catechin, is the major effective component of green tea and has been shown to have beneficial health effects on skin [13, 14]. In liver fibrosis, EGCG was shown to inhibit proliferation of fibroblasts, to reduce collagen deposition and to upregulate the mitochondrial respiratory chain [15]. It has also been promising for being a source of new molecular therapies.

Animal models are used to provide clues and therapeutic interventions for human diseases. Bleomycin is often used as an anti-tumor agent for a lot of cancers, which is originally isolated from the fungus *Streptomyces verticillus* [16]. Recent studies showed that bleomycin upregulates collagen mRNA expression in human lung or dermal fibroblasts in in vivo models [17, 18]. Yamamoto et al. established a mice model for scleroderma by local treatment of bleomycin via *subcutaneous* (sc) injections for 21 days [19–24].

In this study, we investigated the possible antifibrotic effects of EGCG in vivo in bleomycin-induced sclerotic mice. This study contributes to the knowledge of the potential use of EGCG as a treatment for fibrosis in SSc patients.

## Materials and methods

The study protocol was reviewed and approved by Dokuz Eylül University Ethics Committee for Animal Research (Protocol No: 79/2012).

### Animals

Skin fibrosis was induced in 6–8-week-old, weighing about 20–22 g, pathogen-free female *Balb/c* mice (DEU, Department of Experimental Animals) by local injection of bleomycin for 21 days [19, 23, 25]. The animals were kept under standard animal laboratory conditions: temperature of 20–22°C, humidity of 55–60%, photoperiod of 12:12 h light: dark cycle. They had free access to standard laboratory feed and water. All methods including the euthanasia procedure were conducted in accordance with Guide for Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, National Institute of Health.

## Experimental design

The experimental design was performed according to Yamamoto et al. [19, 23, 25]. Bleomycin was used for scleroderma model (Onko Koçsel, Turkey). EGCG (Sigma-Aldrich, USA) and bleomycin solutions were prepared at 1 µg/1 µL concentration before the experiment. A total of 32 female *Balb/c* mice were used and randomly divided into 4 groups of 8 animals each, as follows:

1. Control group (n:8) was given *subcutaneous* (sc) saline (SF) once a day, *intraperitoneal* (ip) SF twice a week,
2. BLM group (n:8) was given 100 µL of BLM sc once a day, 100 µL of SF ip twice a week,
3. BLM + EGCG group (n:8) was given 100 µL of BLM sc once a day, 100 µL of EGCG ip twice a week,
4. EGCG group (n:8) was given 100 µL of SF sc once a day, 100 µL of EGCG ip twice a week.

After 21 days, the animals were sacrificed under ether anesthesia in sterile condition. The injected skin was removed and processed for analysis. Skin tissue samples were separated for immunohistochemistry, histochemistry, western blotting analyses and qPCR analysis.

## Immunohistochemical and histological analyses

The injected sections of skin were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Four micrometer (µm) sections were stained with hematoxylin and eosin for the determination of dermal thickness. For the analysis of connective tissue, Masson's trichrome staining was performed. Dermal thicknesses of the injected sections were analyzed with an Nikon Eclipse C1 microscope (Nikon, Japan) at 200-fold magnification and digitalized by Nikon DS-Fi2 camera. Dermal sections were measured (as µm) on 10 areas. In each series of experiments, the dermal thicknesses were evaluated statistically.

α-Smooth muscle actin (α-SMA) (Thermo, USA) was used for immunohistochemical analyses. Four micrometer sections were cut, baked at 60°C for 30 min, and cooled. Sections were deparaffinized and rehydrated through graded alcohols to water. Antigen retrieval was required and it was done as follows: Slides were placed in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 and loaded onto a Ventana Autostainer (Roche, USA). Blocking was done and the primary antibody (Thermo Fisher Scientific, USA) was applied for 30 min at room temperature. A horseradish peroxidase (HRP) derived secondary antibody (Thermo

Fisher Scientific, USA) was applied. Slides were washed with wash buffer, incubated with liquid diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) substrate (Agilent Technologies, Dako, USA) for 7 min, and rinsed with water. They were counterstained for 2 min with hematoxylin (Agilent Technologies, Dako, USA), blued with wash buffer, rinsed with water, dehydrated, cleared, and coverslipped. α-SMA positive cells were counted on five areas. Images were visualized with a Nikon Eclipse C1 microscope (Nikon, Japan) at 200-fold magnification and digitalized by Nikon DS-Fi2 camera. In each series of experiments, α-SMA positive cells were counted and evaluated statistically.

## Preparation of tissue extracts for western blotting and quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

Skin tissues were prepared for the western blotting and qPCR analysis. Each sample was homogenated with the trizol reagent (Roche, USA) using TissueLyser II (Qiagene, USA). The homogenate was incubated for 5 min at room temperature. A 1:5 volume of chloroform was added, and the tube was vortexed and subjected to centrifugation at 12,000 g for 15 min. The aqueous phase was isolated, and the total RNA was precipitated by cold absolute ethanol. After centrifugation and washing, the total RNA was finally eluted in 20 µL of RNase, DNase free water. The quantity was characterized using a UV spectrophotometer (NanoDrop 8000, Thermo Scientific, USA). RNA was isolated from the homogenates. The isolated RNA had a 260/280 ratio of 1.9–2.1.

For the isolation of total protein the organic phase was obtained at the bottom of the tube as described above (12,000 g centrifugation/15 min) Isopropanol in 1% glycerol (Sigma Aldrich, USA) was added to bottom of the tube. This protein precipitate was washed three times with 0.3 M guanidine hydrochloride in 95% ethanol. In addition, the protein precipitate was dried and solubilized in 1% sodium dodecyl sulfate (SDS). To ensure maximum dissolution, the protein precipitate was incubated at 50°C with intermittent vortexing in 1% SDS. This produced a fairly good amount of protein. Total protein extracts were transferred to fresh tubes and stored at –80°C.

## Detection of MMP-1, MMP-8, MMP-13 and pSMAD 2/3 by western blotting

The protein concentration was quantified using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo Pierce,

USA). A total 25 µg of protein was separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a 0.45 µm pore size, Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, USA) which was then blocked for 1 h at room temperature using 5% skim milk/Tris buffered saline-Tween (TBST). The blots (For each MMP type, four blots-representing four experimental groups) were incubated overnight with a 1:1000 dilution of appropriate primary antibody in 5% skim milk/TBST. The following antibodies were used: Rabbit MMP-1, MMP-8, MMP-13 (ThermoFisher Scientific, USA) and total Smad 2/3, P-Smad 2/3 (Santa Cruz Biotechnology, USA). After the primary incubation, membranes were washed with TBST, the blots were incubated with the appropriate horseradish peroxidase–conjugated mouse anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA).

The following steps involved the processing of beta actin in a similar way, to be further used for comparison with the intensity of the MMP bands:

After visualizing the bands, MMP-1, MMP-8 and MMP-13 membranes were stripped, [using a solution (Thermo, USA) to dissociate the appropriate antibody] and the remaining protein band was re-incubated for β-actin using a monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA).

For the analysis of Smad and p-Smad: p-Smad membrane (following visualization for p-Smad) was stripped [using a solution (Thermo, USA) to dissociate the appropriate antibody] and re-incubated for Smad 2/3 with the Smad 2/3 antibody.

All protein bands were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL) (Millipore, USA) and were quantitated using Image-J, NIH Image densitometry software. Relative expressions of proteins were calculated using the ratios: MMP-1/β-actin, MMP-8/β-actin, MMP-13/β-actin and P-Smad 2-3/Smad 2-3 (Figure 6). All experiments were performed in triplicate and the western blotting images were presented as the representative of three images.

### Detection of TGF-β1 mRNA levels by quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR)

First-strand cDNA was synthesized from 1 µg total RNA in 20 µL by reverse transcription using high capacity cDNA kit (Applied Biosystems, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription reaction consisted of 2 µL Oligo-dT (50 µM), 2 µL of 10× reverse

transcriptase buffer, 0.8 µL of deoxynucleoside triphosphate (25 mM), 1 µL of RNase inhibitor (40 U/µL), 1 µL of MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL), and RNase free dH<sub>2</sub>O, up to a final volume of 20 µL. The cDNA was then stored at –20°C for the gene expression study.

Real time quantitative PCR was performed to detect the gene expression of TGF-β1 in skin tissue using SYBR master mix (ThermoFisher Scientific, USA) at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30 s and the reaction was performed on Roche Lightcycler (Roche, USA). GAPDH, mouse sequence 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3' and reverse 5'-TGTA-GACCATGTAGTTGAGGTCA-3', was used as an internal control. The primers that were used are TGF-β1 mouse sequence Forward 5'-GCCTGAGTGGCTGTCTTTTGA-3' and Reverse 5'-CTGTATTCCGTCTCCTTGTTCA-3'.

A relative quantification was performed using the 2<sup>ΔΔCt</sup> method [26, 27]. The experiments were performed in triplicate and were repeated twice.

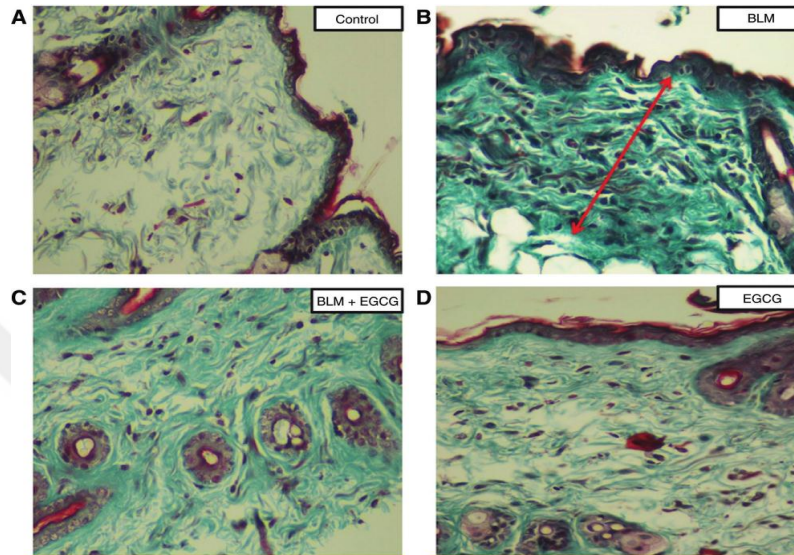
### Statistical analysis

Data were presented as means ± SD and for comparisons between the groups, ANOVA Sidak analysis of variance and for dual comparisons Mann-Whitney U-test were used. Statistical evaluations were performed using the SPSS package program, version 20.0 (IBM, USA). A p-value of <0.05 was considered to be statistically significant.

## Results

### Investigation of the effects of EGCG on the expression of antifibrotic molecules using histochemical and immunohistochemical staining

H&E and Masson Trichrome staining were performed and the histological examination of the skin tissues from the mice is shown in Figures 1 and 2. The dermal thicknesses in the bleomycin + EGCG injected mice was significantly lower than in the bleomycin injected mice respectively (p < 0.05, Figures 1 and 2). Alpha smooth muscle actin immunohistochemical staining score was lower in the BLM + EGCG injected mice than bleomycin injected mice (p < 0.05, Figures 3 and 4). EGCG shows inhibitory effect on fibrosis.



**Figure 1:** Masson-Trichrome staining. Evidence of fibrosis (green color) was more prominent in the BLM group than BLM + EGCG group. Original magnification 20 $\times$ . (A) Control group, (B) BLM group, (C) BLM + EGCG group, (D) EGCG group.

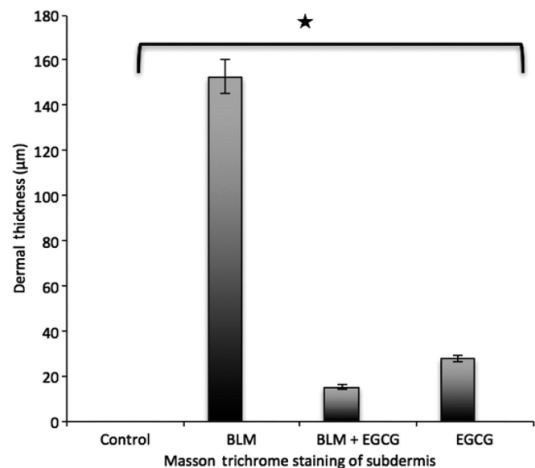
### Effects of EGCG on MMP-1, MMP-8, MMP-13 and p-Smad2/3 protein expressions in skin tissues

As mentioned above, all experiments were performed in triplicate. For this reason, all images obtained from three independent western blotting experiments (MMP-1, MMP-8, MMP-13, p-smad 2/3) were evaluated statistically following the calculation of MMP(s)/ $\beta$ -Actin band area ratios obtained from densitometric measurements. The western blotting analysis showed that EGCG increased the MMP-1, MMP-8 levels in the bleomycin induced mice. Also, p-SMAD 2-3/Total SMAD 2-3 protein level ratio was decreased ( $p < 0.05$ , Figures 5 and 6) in the bleomycin + EGCG group. MMP-13 was not found to be significantly different in comparison with the BLM controls ( $p > 0.05$ , Figures 5 and 6).

### Effect of EGCG on TGF- $\beta$ 1 mRNA levels in SSc tissues

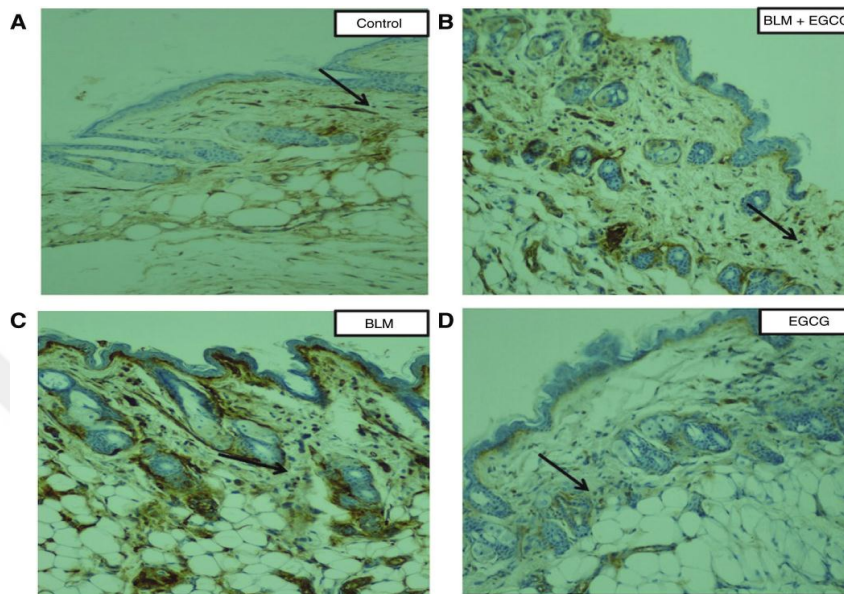
As expected in a successful bleomycin induced scleroderma model, the levels of TGF- $\beta$  mRNAs in the BLM group

was significantly increased ( $p < 0.01$ ) compared with the control group. TGF- $\beta$  mRNA levels in BLM + EGCG group was found to be lower ( $p < 0.01$ ) in comparison with the BLM group (Figure 7).



**Figure 2:** Staining score for Masson trichrome. Results are presented as mean + SEM. \* $p < 0.05$ .





**Figure 3:**  $\alpha$ -SMA staining of dermal tissue sections.

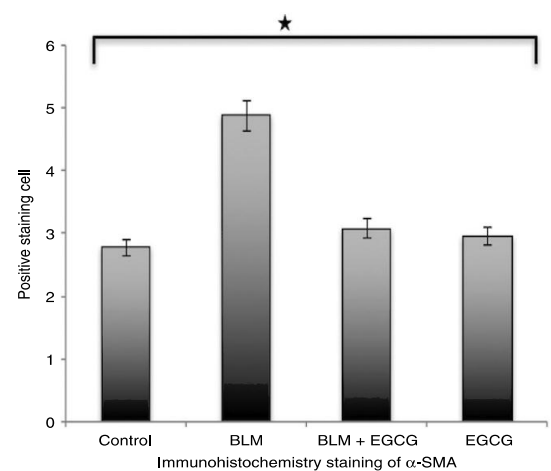
Alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) is a marker for activated fibroblasts. The number of  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive fibroblast cells (black arrows) was higher in the BLM group than BLM + EGCG group. Original magnification 20 $\times$ .

## Discussion

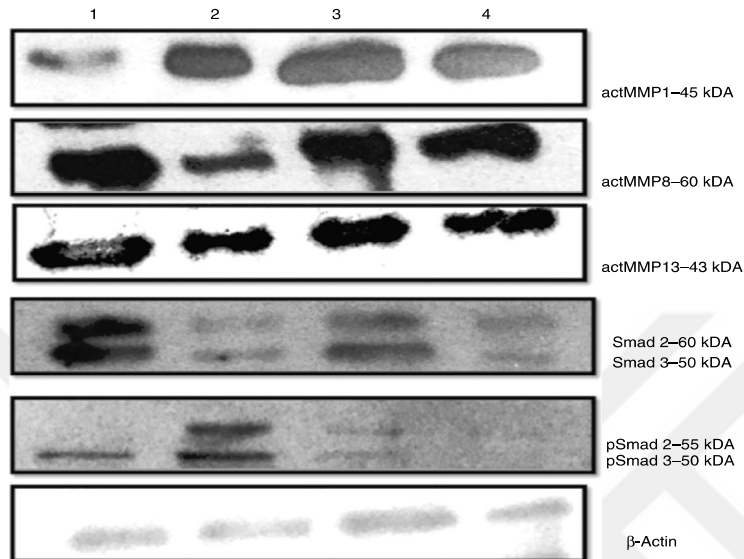
Current treatment options for scleroderma have limitations that they simply control symptoms without targeting the underlying pathophysiology. More research is needed for these more feasible, safer treatment options. The investigation of the molecular mechanisms underlying scleroderma has attracted considerable attention in recent years [28]. It has been widely accepted that the dysregulation of the TGF- $\beta$ /Smad pathway plays a key role in human skin tissues [29]. Although a variety of molecules have been investigated to check for possible antifibrotic effects of EGCG in pulmonary and hepatic fibrosis [30–32], there is no literature data encountered regarding the effect of EGCG on skin tissues in an experimental scleroderma model.

This is the first study aiming to elucidate if EGCG has an effect on the fibrotic component of scleroderma, in an experimental scleroderma model. We hypothesized that EGCG has an antifibrotic effect on scleroderma and the present study demonstrates for the first time that the natural green tea antioxidant, EGCG reduces collagens and TGF- $\beta$  signaling and also, increases MMP-8, MMP-1 while decreasing p-SMAD 2/3 protein levels. Our results suggest that EGCG may be a potential candidate for therapeutic treatment by

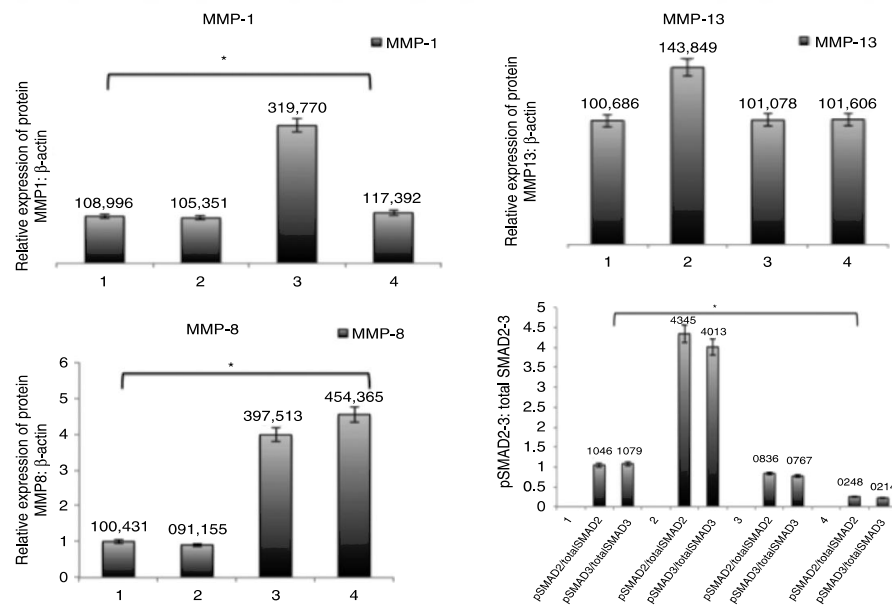
reducing the fibrotic effects of SSc disease characterized by oxidant stress as well as excessive collagen production and precipitation with fibroblasts in the skin.



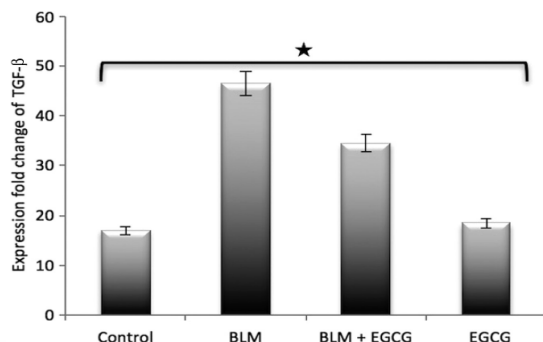
**Figure 4:** Staining score for alpha smooth muscle actin. Results are presented as mean + SEM. \* $p < 0.05$ .



**Figure 5:** Effects of EGCG treatment on MMPs and Smad pathway proteins in scleroderma. Western blottings were performed to measure protein levels of MMP1, MMP8, MMP13, SMAD 2/3 and pSMAD 2/3, as described under materials and methods. (1) Control group, (2) BLM group, (3) BLM + EGCG group, (4) EGCG group.



**Figure 6:** Effects of EGCG treatment on MMPs and Smad pathway proteins in scleroderma. Quantitative representation of protein expression in all groups were obtained by densitometric analysis. (1) Control group, (2) BLM group, (3) BLM + EGCG group, (4) EGCG group. \*p < 0.05.



**Figure 7:** EGCG decreased TGF-β1 mRNA. mRNA expression of TGF-β1 was analyzed by quantitative real-time qPCR. Results are presented as mean + SEM. \* $p < 0.01$ .

The most prominent clinical features of SSC are excessive accumulation of ECM components, especially type I and type III collagen, in related organs such as the skin and lung. In scleroderma fibroblasts,  $\alpha$ -SMA, which is a marker of the myofibroblasts, shows increased expression. SSc is associated with the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts, characterized by the expression of  $\alpha$ -SMA contractile filaments. Myofibroblasts provide some activation features, including high levels of ECM gene expression, during normal repair or during pathological fibrotic procedures [33]. We also observed EGCG-induced inhibition of  $\alpha$ -SMA expression in SSc groups. In addition, in our study, EGCG significantly decreased collagen levels in the EGCG treated groups. These findings indicate that EGCG inhibits production of collagen and the differentiation of fibroblasts.

There is important evidence in literature that EGCG modulates the ECM of different cell types [29]. EGCG has been shown to have anti-fibrotic, anti-cancer and anti-inflammatory activities via TGF- $\beta$  and PDGF signaling in human and rat hepatic stellate cells, rat pancreatic cells, rat aortic smooth muscle cells and human keloid fibroblasts [34–40]. Hsieh et al. [41] observed that EGCG blocks the ability of TGF- $\beta$ 1 to produce collagen. Another study indicated that EGCG reduced myocardial fibrosis in vitro and in vivo [42]. Bleomycin induced, in rat lung fibroblast cultures, an increase in TGF- $\beta$  mRNA synthesis and TGF- $\beta$  protein, followed by increased procollagen gene transcription [43]. Increased expression of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 mRNA were also detected in the lesional skin. In addition, recently, increased expression and synthesis of TGF- $\beta$ 1 in bleomycin-induced mice have been observed [44]. Dooley et al. [29] showed that EGCG can effectively inhibit fibroblast-mediated gel contraction. EGCG has

shown an inhibitory effect on human dermal fibroblasts [45]. Our data show, for the first time in the literature, the decreasing effects of EGCG on collagen, TGF- $\beta$  and p-SMAD 2/3 mRNA levels in skin tissues of the bleomycin induced sclerodermic animals. In addition, we noted that MMP-1, MMP-8 protein levels in the scleroderma mice fibroblasts increased by treatment with EGCG. This observation suggests that EGCG may have dual effects on the metabolism of collagen in SSc, involving both inhibiting the production and increasing the degradation of collagen. In parallel in our results EGCG was shown to inhibit fibroblast activation and collagen accumulation by inhibiting TGF- $\beta$ 1 signaling and thus was considered to be effective on pulmonary fibrosis [46].

TGF- $\beta$  is produced by fibroblasts and infiltrating cells at the sclerotic stage in the bleomycin model. In this model, TGF- $\beta$  and phosphorylated Smad2/3 are upregulated [47]. EGCG is a powerful antioxidant which has a lot of health benefits. The effects may be due to its antioxidative action [48–50]. EGCG reduced the increase in  $\alpha$ -SMA expression via TGF- $\beta$ . These results indicate that the inhibitory effect of EGCG on  $\alpha$ -SMA expression is independent of its antioxidative action. Tabuchi et al. [51] found that EGCG binds to the TGF- $\beta$  receptor and affects collagen degradation by regulating MMPs. The effects of EGCG on scleroderma might thus be partially caused by inhibition of phosphorylation of Smad2/3.

Taking our results into consideration, we think that EGCG treatment, by inhibiting TGF- $\beta$ 1 signaling pathway, may partially revert differentiated myofibroblasts, which is supported by our data on decreased  $\alpha$ -SMA.

In conclusion, our findings provide new evidence to medical literature, that EGCG reduces skin fibrosis by increasing MMP-1 and MMP-8. This study highlights the potential use of EGCG as a new drug for the treatment of fibrosis (following further investigations), in patients with SSc.

**Acknowledgements:** This research was supported by a grant supplied from Dokuz Eylul University Research Fund (2014.KB.SAG.024) and carried out at Dokuz Eylul University Medicine Faculty of Research Laboratory (R-LAB).

**Conflict of interest statement:** There are no conflicts of interest among the authors.

## References

1. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;117:557–67.



2. Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol* 2011;8:42–54.
3. Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, Lehmacher W, Melchers I, Meurer M, et al. The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:1185–92.
4. Allanore Y, Dieude P, Boileau C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:203–10.
5. Mayes MD, Lacey JV Jr, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 2003;48:2246–55.
6. Avouac J, Elhai M, Allanore Y. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2013;80:23–8.
7. Roberts AB, Sporn MB. Transforming growth factors. *Cancer Surv* 1985;4:683–705.
8. Mahoney JM, Taroni J, Martyanov V, Wood TA, Greene CS, Pioli PA, et al. Systems level analysis of systemic sclerosis shows a network of immune and profibrotic pathways connected with genetic polymorphisms. *PLoS Comput Biol* 2015;11:e1004005.
9. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, et al. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007;170:1807–16.
10. Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 1997;6:199–213.
11. Siller-López F, Sandoval A, Salgado S, Salazar A, Bueno M, García J, et al. Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology* 2004;126:1122–33; discussion 949.
12. Asano Y, Ihn H, Kubo M, Jinnin M, Mimura Y, Ashida R, et al. Clinical significance of serum levels of matrix metalloproteinase-13 in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:303–37.
13. Roh E, Kim JE, Kwon JY, Park JS, Bode AM, Dong Z, et al. Molecular mechanisms of green tea polyphenols with protective effects against skin photoaging. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017;57:1631–7.
14. White OP, Tribout H, Baron E. Protective mechanisms of green tea polyphenols in skin. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:Article ID: 560682;8 pages.
15. Santamarina AB, Carvalho-Silva M, Gomes LM, Okuda MH, Santana AA, Streck EL, et al. Decaffeinated green tea extract rich in epigallocatechin-3-gallate prevents fatty liver disease by increased activities of mitochondrial respiratory chain complexes in diet-induced obesity mice. *J Nutr Biochem* 2015;26:1348–56.
16. Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y. New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot (Tokyo)* 1966;19:200–9.
17. Yamamoto T, Eckes B, Krieg T. Bleomycin increases steady-state levels of type I collagen, fibronectin and decorin mRNAs in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2000;292:556–61.
18. Clark JG, Starcher BC, Uitto J. Bleomycin-induced synthesis of type I procollagen by human lung and skin fibroblasts in culture. *Biochim Biophys Acta* 1980;631:359–70.
19. Yamamoto T, Kuroda M, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. III: histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Arch Dermatol Res* 2000;292:535–41.
20. Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. IV: induction of dermal sclerosis by bleomycin is T cell independent. *J Invest Dermatol* 2001;117:999–1001.
21. Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. V: increased expression of alpha-smooth muscle actin in fibroblastic cells in bleomycin-induced scleroderma. *Clin Immunol* 2002;102:77–83.
22. Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. VI: evaluation of bleomycin-induced skin sclerosis in nude mice. *Arch Dermatol Res* 2004;295:453–6.
23. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999;112:456–62.
24. Yamamoto T, Takahashi Y, Takagawa S, Katayama I, Nishioka K, et al. Animal model of sclerotic skin. II. Bleomycin induced scleroderma in genetically mast cell deficient WBB6F1-W/W(V) mice. *J Rheumatol* 1999;26:2628–34.
25. Yamamoto T. Animal model of sclerotic skin induced by bleomycin: a clue to the pathogenesis of and therapy for scleroderma? *Clin Immunol* 2002;102:209–16.
26. Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques* 2005;39:519–25.
27. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–8.
28. Abraham DJ, Krieg T, Distler J, Distler O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48(Suppl 3):iii3–7.
29. Dooley A, Shi-Wen X, Aden N, Tranah T, Desai N, Denton CP, et al. Modulation of collagen type I, fibronectin and dermal fibroblast function and activity, in systemic sclerosis by the antioxidant epigallocatechin-3-gallate. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:2024–36.
30. Sriram N, Kalayarasan S, Sudhandiran G. Epigallocatechin-3-gallate exhibits anti-fibrotic effect by attenuating bleomycin-induced glycoconjugates, lysosomal hydrolases and ultrastructural changes in rat model pulmonary fibrosis. *Chem Biol Interact* 2009;180:271–80.
31. Yasuda Y, Shimizu M, Sakai H, Iwasa J, Kubota M, Adachi S, et al. (–)-Epigallocatechin gallate prevents carbon tetrachloride-induced rat hepatic fibrosis by inhibiting the expression of the PDGFR $\beta$  and IGF-1R. *Chem Biol Interact* 2009;182:159–64.
32. Zhen M, Wang Q, Huang X, Cao L, Chen X, Sun K, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits oxidative damage and preventive effects on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *J Nutr Biochem* 2007;18:795–805.
33. Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 2005;13:7–12.
34. Chen A, Zhang L, Xu J, Tang J. The antioxidant (–)-epigallocatechin-3-gallate inhibits activated hepatic stellate cell growth and suppresses acetaldehyde-induced gene expression. *Biochem J* 2002;368(Pt 3):695–704.
35. Chen A, Zhang L. The antioxidant (–)-epigallocatechin-3-gallate inhibits rat hepatic stellate cell proliferation in vitro by blocking the tyrosine phosphorylation and reducing the gene expression of platelet-derived growth factor-beta receptor. *J Biol Chem* 2003;278:23381–9.

36. Nakamuta M, Higashi N, Kohjima M, Fukushima M, Ohta S, Kotoh K, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea, suppresses both collagen production and collagenase activity in hepatic stellate cells. *Int J Mol Med* 2005;16:677–81.
37. Asaumi H, Watanabe S, Taguchi M, Tashiro M, Nagashio Y, Nomiyama Y, et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits ethanol-induced activation of pancreatic stellate cells. *Eur J Clin Invest* 2006;36:113–22.
38. Meng M, Li YQ, Yan MX, Kou Y, Ren HB. Effects of epigallocatechin gallate on diethyldithiocarbamate-induced pancreatic fibrosis in rats. *Biol Pharm Bull* 2007;30:1091–6.
39. Ahn HY, Hadizadeh KR, Seul C, Yun YP, Vetter H, Sachinidis A, et al. Epigallocatechin-3 gallate selectively inhibits the PDGF-BB-induced intracellular signaling transduction pathway in vascular smooth muscle cells and inhibits transformation of sis-transfected NIH 3T3 fibroblasts and human glioblastoma cells (A172). *Mol Biol Cell* 1999;10:1093–104.
40. Park G, Yoon BS, Moon JH, Kim B, Jun EK, Oh S, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses collagen production and proliferation in keloid fibroblasts via inhibition of the STAT3-signaling pathway. *J Invest Dermatol* 2008;128:2429–41.
41. Hsieh YP, Chen HM, Lin HY, Yang H, Chang JZ. Epigallocatechin-3-gallate inhibits transforming-growth-factor-beta1-induced collagen synthesis by suppressing early growth response-1 in human buccal mucosal fibroblasts. *J Formos Med Assoc* 2017;116:107–13.
42. Lin CM, Chang H, Wang BW, Shyu KG. Suppressive effect of epigallocatechin-3-O-gallate on endoglin molecular regulation in myocardial fibrosis in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 2016;20:2045–55.
43. Breen E, Shull S, Burne S, Absher M, Kelley J, Phan S, et al. Bleomycin regulation of transforming growth factor-beta mRNA in rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;6:146–52.
44. Oi M, Yamamoto T, Nishioka K. Increased expression of TGF-beta1 in the sclerotic skin in bleomycin-'susceptible' mouse strains. *J Med Dent Sci* 2004;51:7–17.
45. Suzuki Y, Hattori S, Isemura M. Epigallocatechin-3-O-gallate inhibits fibroblast contraction of floating collagen gel: interaction between epigallocatechin-3-O-gallate and platelet derived growth factor. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68:1817–20.
46. Sriram N, Kalayarasan S, Manikandan R, Arumugam M, Sudhandiran G. Epigallocatechin gallate attenuates fibroblast proliferation and excessive collagen production by effectively intervening TGF-beta1 signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015;42:849–59.
47. Takagawa S, Lakos G, Mori Y, Yamamoto T, Nishioka K, Varga J. Sustained activation of fibroblast transforming growth factor-beta/Smad signaling in a murine model of scleroderma. *J Invest Dermatol* 2003;121:41–50.
48. Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Med* 1996;21:895–902.
49. Nanjo F, Mori M, Goto K, Hara Y. Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63:1621–3.
50. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003;43:89–143.
51. Tabuchi M, Hayakawa S, Honda E, Ooshima K, Itoh T, Yoshida K, et al. Epigallocatechin-3-gallate suppresses transforming growth factor-beta signaling by interacting with the transforming growth factor-beta type II receptor. *World J Exp Med* 2013;3:100–7.

#### 8.4. Tezle İlişkili Konuda Yayına Gönderilen Makale

8.4.1. **Kocak Ayse**, Harmanci Duygu, Birlik Merih, Guner Akdoğan Gul. Vitamin D and vitamin D receptor in patients with scleroderma subtypes. Modern Rheumatology 2018

#### “VITAMIN D AND VITAMIN D RECEPTOR IN PATIENTS WITH SCLERODERMA SUBTYPES”

Kocak Ayse<sup>1</sup>, Harmanci Duygu<sup>1</sup>, Birlik Merih<sup>1,2</sup>, Guner Akdoğan Gul<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, Molecular Medicine Department ,  
Izmir

<sup>2</sup> Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Rheumatology, Izmir

<sup>3</sup> Izmir University of Economics, Medicine Faculty, Medical Biochemistry Department,  
Izmir

**Correspondence to:** Mrs. Ayse Kocak, Department of Molecular Medicine, Institute of Health Sciences, Dokuz Eylul University Health Campus, Izmir 35340, Turkey

E-mail: kocak.ayse@gmail.com

**Keywords:** Vitamin D, vitamin D receptor, scleroderma, scleroderma subtypes

#### Abstract

**Background:** Vitamin D receptor (VDR) is a member of the nuclear localized hormone receptor family. 1,25- (OH) 2D, a form of metabolically active Vitamin D3, is the ligand of VDR. When VDR and 1,25-(OH) 2D are linked, many genes initiate molecular interaction reactions that will modulate the transcription. VDR has been shown to be a negative regulator of the TGF- $\beta$  / Smad signaling pathway, which is important in the pathogenesis of scleroderma (SSc). Vitamin D has pleiotropic effects including immunomodulatory and antifibrotic properties in scleroderma pathogenesis.

**Objectives:** The aim of this study was to investigate the expression of VDR and the levels of vitamin D in scleroderma subtypes and study the possible correlation between the two parameters.

**Methods:** 19 SSc patients and 6 healthy controls were included in the study and they were classified according to the 2013 ACR / EULAR criteria and Rodnan scores were calculated. 11 were of the limited type and 8 were of the diffuse type of scleroderma. Vitamin D levels were determined in serum. Vitamin D level was measured by chemiluminescence immunometric assay. VDR gene expression was determined by quantitative PCR in isolated RNAs from the blood. Changes in mRNA levels were analyzed and beta-actin was used as the housekeeping gene.

**Results:** VDR gene expressions in diffuse type scleroderma patients were statistically significantly decreased compared to the control ( $p < 0.01$ ). It was found that VDR gene expression in limited type scleroderma patients did not show any significant difference when compared to control. Vitamin D levels and VDR gene expressions showed no correlation in scleroderma subtypes.

**Discussion:** VDR gene expression decreased in patients with diffuse type scleroderma and showed negative correlation with the Rodnan score. There was no significant difference between vitamin D and VDR levels.

**Keywords:** Vitamin D, vitamin D receptor, scleroderma, scleroderma subtypes

## **Introduction**

Systemic sclerosis or scleroderma (SSc) is autoimmune disease which is characterized fibrosis, dysregulation of immunity and damage of vascular system [1]. The fibrosis involve skin and internal organs such kidney, heart and lung [2]. Extracellular matrix is increased in this disease. However, intracellular signaling cascades that activate extracellular matrix production

are partly known. However, the available information has not yet been converted into antifibrotic therapies [3, 4].

Scleroderma patients have heterogeneity of clinical findings, autoantibody profiles, disease progression, treatment response and survival [5]. The disease is basically divided into two according to the skin condition: patients are grouped into limited cutaneous systemic sclerosis (lcSSc) and diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc) subsets [6]. However, some patients with systemic sclerosis do not observe any of these two disease classes. Some of them may change over time. The extent of skin fibrosis is calculated using the modified Rodnan skin score (mRSS) at 17 body surface areas with a scale of 0 (normal) to 3 (severe) and has a maximum total score of 51.

Vitamin D is synthesized in the skin. Deficiency of Vitamin D is associated with pathological conditions of many different organs and systems, including the autoimmune disease [7]. In addition, vitamin D has been shown to have immunomodulatory effects and, its role observed in several clinical manifestations of chronic autoimmune diseases [8]. In SSc patients, vitamin D levels are found to be low [9, 10].

1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is active form of the Vitamin D and it activates vitamin D receptor (VDR). VDR is a member of the superfamily of nuclear receptors [11]. VDR signaling has a role calcium and phosphorus balance in human metabolism. Also, VDR signaling is a key modulator of cell differentiation, immunomodulation and proliferation [12].

Here, we present the results of VDR expressions and Vitamin D levels in limited cutaneous systemic sclerosis (lcSSc) and diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc).

### **Patients and methods**

The study was approved by the ethical committee of the University of Dokuz Eylul. Informed consent was obtained from all participants. All patients were examined by the rheumatologist and diagnosis made according to the American College of Rheumatology (ACR)

criteria for scleroderma. 11 were of the limited type and 8 were of the diffuse type of scleroderma. Patients' Rodnan scores were calculated.

1 mL blood samples were collected from the patients. The blood samples were centrifuged and the sera, separated. Serum concentrations of 25(OH)D in patients—were determined using the chemiluminescence immunometric assay [13].

Total RNA was isolated from blood using the RNeasy kit (Qiagen, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from 1 µg total RNA in 20 µL by reverse transcription using high capacity cDNA kit (Applied Biosystems, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription reaction consisted of 2 µL Oligo-dT (50 µM), 2 µL of 10x reverse transcriptase buffer, 0.8 µL of deoxynucleoside triphosphate (25 mM), 1 µL of RNase inhibitor (40 U/µL), 1 µL of MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL), and RNase free dH<sub>2</sub>O, up to a final volume of 20 µL. The cDNA was then stored at -20°C for the gene expression study.

Real time quantitative PCR was performed to detect the gene expression of VDR in blood using SYBR master mix (ThermoFisher Scientific, USA) at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30s and the reaction was performed on Roche Lightcycler (Roche, USA)., β-Actin human sequence forward 5'-5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3' and reverse 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3', was used as an internal control. The primers that were used are VDR human sequence forward 5'-CCTTCACCATGGACGACATG-3', reverse 5'-CGGCTTTGGTCACGTCAC-3'.

A relative quantification was performed using the 2<sup>ΔΔCt</sup> method. The experiments were performed in triplicate and were repeated twice.

### **Statistical analysis**

Data were presented as means ±SD and for comparisons between the groups, ANOVA Sidak analysis of variance and, for dual comparisons, Mann–Whitney U-test were used.

Statistical evaluations were performed using the SPSS package program, version 20.0. A p-value of <0.05 was considered to be statistically significant.

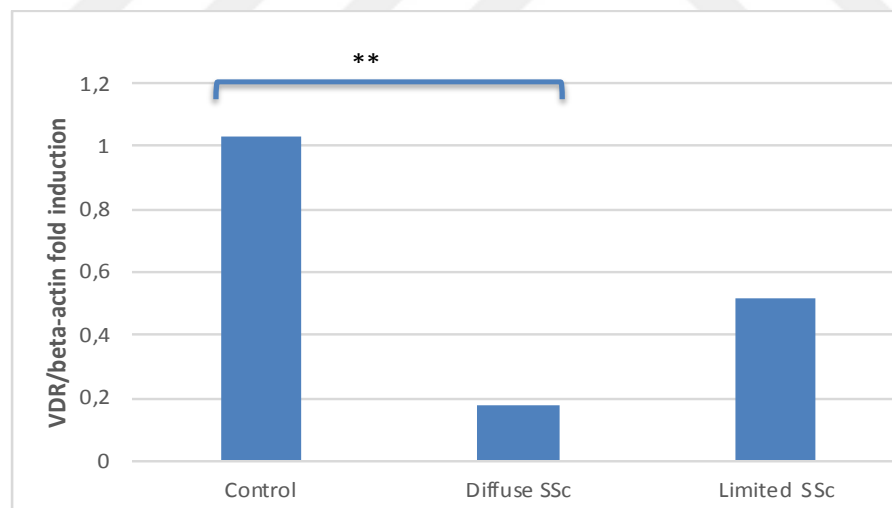
## Results

### Vitamin D status

19 patients with scleroderma were included in this study. In the diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc) (n=8) the mean of vitamin D levels was 16,54 ng/mL and in limited cutaneous systemic sclerosis (lcSSc) (n=11) vitamin D, the mean was 20,50 ng/mL. No patients showed toxic concentrations of vitamin D. Regarding the 25(OH)D serum concentration of the two groups, no statistical differences were observed as assessed by Student's t-test ( $P>0.05$ ).

### VDR expression

VDR expression was decreased in diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc) compared to limited cutaneous systemic sclerosis (lcSSc) (Figure 1),  $**P<0.01$ .



**Figure 1.** Expression of Vitamin D Receptor (VDR) in diffuse and limited Systemic Sclerosis (SSc).

### Discussion

We demonstrate in the present study the VDR signalling and Vitamin D levels in SSc subtypes.

Scleroderma is a multisystem disease mediated by autoimmunity and results in tissue fibrosis [14]. Excessive extracellular matrix (ECM) is synthesized. Several studies from different countries reported significantly reduced levels of vitamin D3 in patients with SSc as compared with healthy individuals [15]. This study has not shown statistically significant differences in Vitamin D levels between SSc patients and healthy controls.

Vitamin D is synthesized in the skin and hydroxylated in two steps in the liver and kidneys. Vitamin D is generated into its active form, 1,25 dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) [16]. 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> activates vitamin D receptor (VDR). VDR is member of the superfamily of nuclear receptors [12]. VDR is best known for its role in calcium and phosphorus metabolism [16]. Besides, VDR signaling is the key regulator of cell proliferation, differentiation and immunomodulation [17]. Cutolo stated that vitamin D deficiency is important in various autoimmune diseases such as scleroderma [18]. Giovannucci in his review [19] pointed out to the fact that Vitamin D deficiency may increase the risk of cancer.

In scleroderma, several researchers suggest that vitamin D3 is significantly reduced [20-27]. Arnson suggested that vitamin D deficiency and VDR signaling may contribute to SSc [20]. This study offers to the scientific literature the finding that VDR expression is decreased in diffuse cutaneous systemic sclerosis (dcSSc) compared to limited cutaneous systemic sclerosis, which is expected to be of value in the design of research on the therapeutic approaches to the different types of SSc.

### **Conflict of interest**

The authors declares that they have not any financial support or benefits from commercial sources or any other financial interests, which could create a potential conflict of interest.

### **References:**

1. Nihtyanova, S.I., et al., Prediction of pulmonary complications and long-term survival in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol*, 2014. 66(6): p. 1625-35.



2. Bhattacharyya, S., J. Wei, and J. Varga, Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol*, 2011. 8(1): p. 42-54.
3. Beyer, C., O. Distler, and J.H. Distler, Innovative antifibrotic therapies in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*, 2012. 24(3): p. 274-80.
4. Kowal-Bielecka, O., et al., EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis*, 2009. 68(5): p. 620-8.
5. Allanore, Y., et al., Systemic sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, 2015. 1: p. 15002.
6. LeRoy, E.C., et al., Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*, 1988. 15(2): p. 202-5.
7. Holick, M.F., Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*, 2007. 357(3): p. 266-81.
8. Corrado, A., et al., Relationship between Body Mass Composition, Bone Mineral Density, Skin Fibrosis and 25(OH) Vitamin D Serum Levels in Systemic Sclerosis. *PLoS One*, 2015. 10(9): p. e0137912.
9. An, L., et al., Vitamin D levels in systemic sclerosis patients: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*, 2017. 11: p. 3119-3125.
10. Belloli, L., N. Ughi, and B. Marasini, Vitamin D in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*, 2011. 30(1): p. 145-6.
11. Saccone, D., F. Asani, and L. Bornman, Regulation of the vitamin D receptor gene by environment, genetics and epigenetics. *Gene*, 2015. 561(2): p. 171-80.
12. Messa, P., C. Alfieri, and M.P. Rastaldi, Recent insights into vitamin D and its receptor. *J Nephrol*, 2011. 24 Suppl 18: p. S30-7.

13. Stagi, S., Rigante, D., Lepri, G. et al. Severe vitamin D deficiency in patients with Kawasaki disease: a potential role in the risk to develop heart vascular abnormalities? *Clin Rheumatol* (2016) 35: 1865.
14. Mulligan-Kehoe, M.J. and M. Simons, Vascular disease in scleroderma: angiogenesis and vascular repair. *Rheum Dis Clin North Am*, 2008. 34(1): p. 73-9; vi.
15. Arnson, Y., et al., Serum 25-OH vitamin D concentrations are linked with various clinical aspects in patients with systemic sclerosis: a retrospective cohort study and review of the literature. *Autoimmun Rev*, 2011. 10(8): p. 490-4.
16. Haroon, M. and O. Fitzgerald, Vitamin D and its emerging role in immunopathology. *Clin Rheumatol*, 2012. 31(2): p. 199-202.
17. Yee, Y.K., et al., Vitamin D receptor modulators for inflammation and cancer. *Mini Rev Med Chem*, 2005. 5(8): p. 761-78.
18. Cutolo, M., Further emergent evidence for the vitamin D endocrine system involvement in autoimmune rheumatic disease risk and prognosis. *Ann Rheum Dis*, 2013. 72(4): p. 473-5.
19. Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). *Cancer Causes Control* 2005;16: p. 83-95.
20. Arnson Y, Amital H, Agmon-Levin N, et al. Serum 25-OH vitamin D concentrations are linked with various clinical aspects in patients with systemic sclerosis: a retrospective cohort study and review of the literature. *Autoimmun Rev* 2011;10:490–4.
21. Belloli L, Ughi N, Marasini B. Vitamin D in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2011;30:145–6.

22. Calzolari G, Data V, Carignola R, et al. Hypovitaminosis D in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2009;36:2844; author reply 2845.
23. Caramaschi P, Dalla Gassa A, Ruzzenente O, et al. Very low levels of vitamin D in systemic sclerosis patients. *Clin Rheumatol* 2010;29:1419–25.
24. Gambichler T, Chrobok I, Hoxtermann S, et al. Significantly decreased serum 25-hydroxyvitamin d levels in a large German systemic sclerosis cohort. *J Rheumatol* 2011;38:2492–3; author reply 2494.
25. Rios Fernandez R, Fernandez Roldan C, Callejas Rubio JL, et al. Vitamin D deficiency in a cohort of patients with systemic scleroderma from the south of Spain. *J Rheumatol* 2010;37:1355; author reply 1356.
26. Rios-Fernandez R, Callejas-Rubio JL, Fernandez-Roldan C, et al. Bone mass and vitamin D in patients with systemic sclerosis from two Spanish regions. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30:905–11.
27. Vacca A, Cormier C, Piras M, et al. Vitamin D deficiency and insufficiency in 2 independent cohorts of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2009;36:1924–9.

## 8.5. Deney Hayvanı Deneyleri Takip Formları

### **Grup 1. Kontrol Grubu**

Her gün ; 100 µL *subkutan (sc)* Fosfatla tamponlanmış salin (FTS) ve ek olarak haftada iki kez 100 µL *intraperitoneal (ip)* serum fizyolojik (SF) uygulandı.

| Günler -            | 1.hayvan<br>(çizgisiz) | 2.hayvan<br>(bir çizgi) | 3.hayvan<br>(iki çizgili) | 4.hayvan<br>(üç çizgili) | 5.hayvan<br>(dört çizgili) | 6.hayvan<br>(beş çizgili) | 7.hayvan<br>(altı çizgili) | 8.hayvan<br>(yedi çizgili) |
|---------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1.gün-<br>13.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 2.gün-<br>14.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 3.gün-<br>15.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 4.gün-<br>16.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 5.gün-<br>17.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 6.gün-<br>18.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 7.gün-<br>19.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 8.gün-<br>20.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 9.gün-<br>21.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 10.gün-<br>22.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 11.gün-<br>23.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 12.gün-<br>24.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | Ex.                        |
| 13.gün-<br>25.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | Ex.                        |
| 14.gün-<br>26.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | Ex.                        |
| 15.gün-<br>27.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | Ex.                        |
| 16.gün-<br>28.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | Ex.                        |
| 17.gün-<br>29.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | Ex.                        |
| 18.gün-<br>30.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | Ex.                        |
| 19.gün-<br>01.05.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | Ex.                        |
| 20.gün-<br>02.03.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | Ex.                        |
| 21.gün-<br>03.03.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | Ex.                        |

## **Grup 2. BLM grubu**

1 mg BLM, 1 mL FTS içerisinde çözdürülerek 100 µL (100 µg) dozunda hergün sc olarak, haftada iki kez 100 µL *intraperitoneal (ip)* serum fizyolojik (SF) uygulandı.

| <b>Günler</b>       | <b>1.hayvan<br/>(çizgisiz)</b> | <b>2.hayvan<br/>(bir çizgi)</b> | <b>3.hayvan<br/>(iki çizgili)</b> | <b>4.hayvan<br/>(üç çizgili)</b> | <b>5.hayvan<br/>(dört<br/>çizgili)</b> | <b>6.hayvan<br/>(beş<br/>çizgili)</b> | <b>7.hayvan<br/>(altı<br/>çizgili)</b> | <b>8.hayvan<br/>(yedi<br/>çizgili)</b> |
|---------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| 1.gün-<br>13.04.15  | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 2.gün-<br>14.04.15  | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 3.gün-<br>15.04.15  | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 4.gün-<br>16.04.15  | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 5.gün-<br>17.04.15  | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 6.gün-<br>18.04.15  | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 7.gün-<br>19.04.15  | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 8.gün-<br>20.04.15  | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 9.gün-<br>21.04.15  | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 10.gün-<br>22.04.15 | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 11.gün-<br>23.04.15 | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 12.gün-<br>24.04.15 | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 13.gün-<br>25.04.15 | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 14.gün-<br>26.04.15 | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 15.gün-<br>27.04.15 | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 16.gün-<br>28.04.15 | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 17.gün-<br>29.04.15 | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 18.gün-<br>30.04.15 | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 19.gün-<br>01.05.15 | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 20.gün-<br>02.03.15 | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |
| 21.gün-<br>03.03.15 | X                              | X                               | X                                 | X                                | X                                      | X                                     | X                                      | X                                      |

### **Grup 3. BLM + EGCG Grubu**

1 mg BLM, 1 mL FTS içerisinde çözündürülerek 100 µL (100 µg) dozunda hergün sc olarak, EGCG ise 20 mg/kg SF içerisinde çözündürülerek *İp* olarak haftada 2 kez uygulandı.

| Günler              | 1.hayvan<br>(çizgisiz) | 2.hayvan<br>(bir çizgi) | 3.hayvan<br>(iki çizgili) | 4.hayvan<br>(üç çizgili) | 5.hayvan<br>(dört çizgili) | 6.hayvan<br>(beş çizgili) | 7.hayvan<br>(altı çizgili) | 8.hayvan<br>(yedi çizgili) |
|---------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1.gün-<br>13.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 2.gün-<br>14.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 3.gün-<br>15.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 4.gün-<br>16.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 5.gün-<br>17.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 6.gün-<br>18.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 7.gün-<br>19.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 8.gün-<br>20.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 9.gün-<br>21.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 10.gün-<br>22.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 11.gün-<br>23.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 12.gün-<br>24.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 13.gün-<br>25.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 14.gün-<br>26.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 15.gün-<br>27.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 16.gün-<br>28.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 17.gün-<br>29.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 18.gün-<br>30.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 19.gün-<br>01.05.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 20.gün-<br>02.03.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | Ex.                        |
| 21.gün-<br>03.03.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | Ex.                        |

#### **Grup 4. EGCG Grubu**

Her gün ; 100 µL *subkutan (sc)* Fosfatla tamponlanmış salin (FTS) ve ek olarak EGCG, 20 mg/kg SF içerisinde çözündürülerek *İp* olarak haftada 2 kez uygulandı.

| Günler          | 1.hayvan<br>(çizgisiz) | 2.hayvan<br>(bir çizgi) | 3.hayvan<br>(iki çizgili) | 4.hayvan<br>(üç çizgili) | 5.hayvan<br>(dört çizgili) | 6.hayvan<br>(beş çizgili) | 7.hayvan<br>(altı çizgili) | 8.hayvan<br>(yedi çizgili) |
|-----------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1.gün-13.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 2.gün-14.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 3.gün-15.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 4.gün-16.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 5.gün-17.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 6.gün-18.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 7.gün-19.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 8.gün-20.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 9.gün-21.04.15  | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 10.gün-22.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 11.gün-23.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 12.gün-24.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 13.gün-25.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 14.gün-26.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 15.gün-27.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 16.gün-28.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 17.gün-29.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 18.gün-30.04.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 19.gün-01.05.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 20.gün-02.03.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |
| 21.gün-03.03.15 | X                      | X                       | X                         | X                        | X                          | X                         | X                          | X                          |