



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

DOKTORA PROGRAMI

**TGF- β 3 PROTEİNİN REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE LAZER
TABANLI TERAPÖTİK UYGULAMALARININ İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

SERKAN YELLİ

Danışman: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

TOKAT– 2023

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan “**TGF- β 3 Proteinin Rekombinant Üretimi Ve Lazer Tabanlı Terapötik Uygulamalarının İncelenmesi** ” konulu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Serkan YELLİ

29Ağustos 2023

Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2021/27 nolu proje ile desteklenmiştir. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma birimine desteklerinden dolayı teşekkür ederim.



JÜRİ KABUL VE ONAY

Serkan YELLİ tarafından hazırlanan “**TGF- β 3 Proteinin Rekombinant Üretimi Ve Lazer Tabanlı Terapötik Uygulamalarının İncelenmesi** ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **29 Ağustos 2023** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim dalında da Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeler

İmza

Danışman
Prof. Dr. İsa GÖKÇE
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Başkan
Doç.Dr. Fikret GEVREK
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Doç.Dr. Yakup ULUSU
Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Dr.Öğr. Üyesi Şeyma TAŞDEMİR
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

ONAY

---/---/2023

Doç. Dr. Yusuf TEMÜR
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Doktora öğrenim süresince sürekli yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmanın yürütülmesi boyunca laboratuvarlarının tüm imkânlarını kullanmama izin veren bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda daima yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen tecrübe ve önerilerinden yararlandığım, bir arkadaş gibi bir dost gibi varlığından memnun olduğum ve varlığının bana güven verdiği bittim dediğimde beni tekrardan ayağa kaldıran çok değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarımın birçok yerinde desteklerini esirgemeyen yeri geldi ağabey gibi davranan, tecrübeleri ile arkamda dağlar gibi duran çok değerli hocam Doç. Dr. Fikret GEVREK'e teşekkürlerimi sunarım. Gece gündüz demeden doktora öğrenim süresince daima yanımda hissettiğim ve bana tecrübeleri ile yön veren, sürekli beni inandıran ve beni aydınlatan çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Sema BİLGİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda sihirli dokunuşlar yaparak daha da güzelleştiren, tecrübeleri ile destekleyen çok kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Yahya TAYHAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışmama katkı sunan görünmeyen kahramanlar olarak nitelendirdiğim Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR'e , Arş. Gör. Özlem KAPLAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Rızvan İMAMOĞLU'na, Aslı YILDIRIM KOCAMAN'a, Derya ATASOY'a, Öğretim Görevlisi Nazan GÖKŞEN TOSUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Derslere gitmemde ve tez çalışmalarımda sürekli beni destekleyen ellerinden gelen her şeyi yapan üzerimdeki fazla yükü alan çok değerli mesai arkadaşlarıma da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini her an hissettiğim değerli zamanlarını benim için harcayan ve beni her konuda destekleyen canım aileme çok sevdiğim eşim Elif YELLİ'ye, çok çok çok sevdiğim canım oğlum Tuna YELLİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

TGF- β 3 PROTEİNİN REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE LAZER TABANLI TERAPÖTİK UYGULAMALARININ İNCELENMESİ

Serkan Yelli

Doktora Tezi

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyomühendislik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsa Gökçe

Ağustos 2023, 98 Sayfa

Canlı organizmalarda istenilmeyen durumların en başında yaralar gelmektedir. Eğer bu yara iyileşme süreci normalin dışında gelişir ya da devam ederse skar doku, hipertrofik dokuya daha sonra keloid dokuya dönüşmektedir. Bu durum hiç istenilmeyen bir süreçtir. Yara iyileşmesini hızlandırmak ve hastanın yaşam kalitesini artırmak amacı ile çeşitli kimyasal ilaçlar, protein içerikli topikal kremler, spreylar, tabletler, biyofilmler, elektrik akımları, radyo dalgaları, lazer ışınları ve ultrason uygulamaları kullanılmaktadır.

Bu tez kapsamındaki çalışmada, yara iyileşmesi için TGF- β 3 + sfGFP füzyonu ve diyod lazer uygulaması karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Rekombinant TGF- β 3 proteinini sfGFP füzyon proteinini ile *E. Coli* bakterisinde üretilmiş ve üretilen protein, diyod lazer eşliğinde hücre kültüründe insan deri hücrelerinde test edilmiştir. Toksik etkilerinin olmadığı anlaşılan protein, benzer şekilde *in vivo* analiz edilmiştir. Sıçanlarda oluşturulan yaralar rekombinant protein ve diyod lazer ile muamele edilmiş ve iyileşme süreçleri histolojik olarak değerlendirilmiştir. Rekombinant TGF- β 3 + sfGFP füzyonu ve bu füzyon ile beraber yara üzerine uygulanan diyod lazer tedavisinin, iyileşme sürecini kontrol gruplarına göre daha iyi şekilde tamamladığı histolojik olarak ortaya konulmuş ve iyileşme kantitatif olarak gösterilmiştir.

TGF- β 3 + sfGFP füzyonunun, diyod lazer eşliğinde yara iyileşmesi için tedavi seçenekleri arasında olabileceği yapılan bu tez çalışması ile ortaya konulmuştur

Anahtar Kelimeler: TGF- β 3, Rekombinant Protein, Diyod Lazer, Yara iyileşmesi

ABSTRACT

RECOMBINANT PRODUCTION OF TGF- β 3 PROTEIN AND INVESTIGATION OF LASER-BASED THERAPEUTIC APPLICATIONS

Serkan Yelli

Doctoral Thesis

Tokatgaziosmanpaşa University Graduate Education Institute

Department Of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. İsa Gökçe

August 2023, 98 Pages

Wounds are one of the most undesirable conditions in living organisms. If the wound healing process develops or continues abnormally, scar tissue turns into hypertrophic tissue and then into keloid tissue. This situation is an undesirable process. Various chemical drugs, topical creams with protein content, sprays, tablets, biofilms, electric currents, radio waves, laser beams and ultrasound applications are used in order to accelerate wound healing and improve the patient's quality of life

In this study, TGF- β 3 + sfGFP fusion and diode laser application were investigated comparatively for wound healing. Recombinant TGF- β 3 protein was produced with sfGFP as a fusion protein in *E.coli* then tested in human skin cells in cell culture with diode laser application. The protein, which was found to have no toxic effects, was also analysed *in vivo*. Wounds created in rats were treated with recombinant protein and diode laser application and then their healing processes were evaluated histologically. Histologically, It has been demonstrated histologically that recombinant TGF- β 3 + sfGFP fusion and diode laser treatment applied to the wound together with this fusion complete the healing process better than the control groups and the improvement was indicated quantitatively.

It has been revealed in this thesis that TGF- β 3 + sfGFP fusion may be among the treatment options for diode laser-guided wound healing.

Keywords: TGF- β 3, Recombinant Protein, Diod Laser, Wound healing

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	5
ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ / KURAMSAL TEMELLER / GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Yara ve Yara İyileşmesi	6
2.1.1. İnflamasyon (Homeostaz) -Yangı Basamağı;.....	7
2.1.2. Proliferasyon (Kollejen Sentez fazı) - Hücresel Çoğalma Basamağı	8
2.1.3. Maturasyon (Remodelizasyon) - Doku Olgunlaşması Basamağı	9
2.2. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF- β)	10
2.3. Rekombinant Protein Üretimi	12
2.4. Yeşil Floresan Proteinler (GFP).....	13
2.5. Fototerapi ve Diyot lazer.....	13
2.5.1. Diyod Lazer	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Kullanılan cihazlar	20
3.1.2. Kullanılan çözeltiler.....	21
3.1.3. Kullanılan kimyasallar ve Sarf Malzemeler	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Yapılan çalışmanın özeti.....	23
3.2.2. Biyoinformatik çalışmalar ve 6xHis-sfGFP-TEV-TGF- β 3 plazmidinin tasarımı	24
3.2.3. FSB'li kompetant hücre hazırlanması.....	27
3.2.4. 6xHis-sfGFP-TEV-TGF β 3 Füzyon Proteininin Transformasyonu	28
3.2.5. İnokülasyon ve Saflaştırma.....	28
3.2.6. SDS-PAGE ile Proteininin Saflaştırılmasının Analizi.....	30
3.2.7. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	31
3.2.8. Hayvan Deneyleri ve Histolojik çalışmalar	36
4. BULGULAR	42
4.1. SDS-PAGE ile Proteininin Saflaştırılmasının Analizi	42

4.2.	Hücre Canlılık Testi	43
4.3.	Hücre Göçü (Rejenerasyon / Yara İyileşme Testi)	44
4.4.	<i>In vivo</i> Çalışmalar	47
4.4.1.	Histolojik İncelemeler.....	56
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	70
6.	KAYNAKLAR.....	77
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	81



SİMGELER

Gr	:	Gram
Mg	:	Miligram
μ M	:	Mikromolar
M	:	Molar
mM	:	Milimolar
Nm	:	Nanometre
Rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
μ L	:	Mikrolitre
nm	:	Nanometre
J	:	Joule

KISALTMALAR

ANOVA	Tek Yönlü varyans analiz testi
BJ	İnsan deri fibroblast hücre hattı
TGF- β 3	Dönüştürücü büyüme faktörü 3 proteini
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribo nükleotid trifosfat
DDL	Düşük doz lazer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EtOH	Etonol
FBS	Fötal sıgır serum
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
E. coli	Escherichiacoli
GFP	Yeşil Floresan Protein
sfGFP	Süper folder Yeşil Floresan Proteini
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium
PBS	Fosfat tamponu
RNA	Ribonükleik asit
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Enstitüsü'nde geliştirilen besi ortamı
UV	Ultraviole

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Normal ve anormal yara iyileşmesi	7
Şekil 2-2: Deri ile lazer etkileşimleri	15
Şekil 2-3: Güneş ışığı, lazer ve LED ışınlarının özellikleri	15
Şekil 2-4: Fotobiyomodülasyon sonrası hücrede meydana gelen değişiklikler	17
Şekil 2-5: Düşük Doz Lazerin tedavi mekanizması	18
Şekil 3-1: Kullanılan pET-22b(+) vektörünün ve klonlama bölgelerinin gösterimi	25
Şekil 3-2: Oluştulan Proteine ait DNA dizisi	26
Şekil 3-3: Oluşturulan amino asit dizisi	26
Şekil 3-4: Restriksiyon enzimler arasındaki düzenlenmiş dizi	27
Şekil 3-5: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan lazer uygulanan pleyt şeması	34
Şekil 3-6: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan lazer uygulanmayan pleyt şeması	34
Şekil 3-7: Çizik testi çalışmalarında kullanılan pleyt şemaları	35
Şekil 3-8: Diyod lazer ve uygulanma şekli	36
Şekil 3-9: Ratların sırtlarında yara oluşturma ve diyod lazer uygulama	38
Şekil 3-10: Havuzcuklar ve Parafin Bloklar	39
Şekil 3-11: Mikrotom ve su ocağı	39
Şekil 4-1: Rekombinant sfGFP-TGF- β 3'ün jel görünümü	42
Şekil 4-2: 24 saat sonrası hücre canlılık oranı	43
Şekil 4-3: 48 saat sonrası hücre canlılık oranı	44
Şekil 4-4: Lazer terapi uygulanmayan BJ hücreleri	45
Şekil 4-5: Lazer terapi uygulanan BJ hücreleri	45
Şekil 4-6: 24 ve 48. Saat lazer uygulanmayan hücrelerin yara iyileşme grafiği	46
Şekil 4-7: 24 ve 48. Saat lazer uygulanan hücrelerin yara iyileşme grafiği	46
Şekil 4-8: Farklı zamanlarda yara alanı iyileşme fotoğrafları	48
Şekil 4-9: Kesi alanlarının karşılaştırılmasını gösteren grafik	49
Şekil 4-10: 3-1 gün iyileşme oranları	50
Şekil 4-11: 3-1 gün iyileşme oranları	50
Şekil 4-12: 7.ve 5. gün aralığı iyileşme yüzdeleri	51
Şekil 4-13: 9.ve 7. gün arası iyileşme oranları	52
Şekil 4-14: 11.ve 9. gün iyileşme oranları	52
Şekil 4-15: 14.ve 11.gün arası iyileşme oranları	53

Şekil 4-16: 14.ve 1.gün arası genel iyileşme oranları	54
Şekil 4-17: Genel iyileşme Oranları	55
Şekil 4-18: Kontrol Grubu Hematoksilen-Eozin Boyama	56
Şekil 4-19: Kontrol Grubu Üçlü Boyama.....	56
Şekil 4-20: Kesi grubu 1.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama	57
Şekil 4-21: Kesi grubu 2.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama	57
Şekil 4-22: Lazer grubu 1.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama	58
Şekil 4-23: Lazer grubu 2.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama	58
Şekil 4-24: sfGFP-TGF- β 3grubu 1.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama	59
Şekil 4-25: sfGFP-TGF- β 3grubu 2.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama	59
Şekil 4-26: T-TGF- β 3 grubu 1.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama.....	60
Şekil 4-27: T-TGF- β 3 grubu 2.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama.....	60
Şekil 4-28: sfGFP-TGF- β 3 +Lazer grubu 1.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama.....	61
Şekil 4-29: sfGFP-TGF- β 3+Lazer grubu 2.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama.....	61
Şekil 4-30: T-TGF- β 3+Lazer grubu 1.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama	62
Şekil 4-31: T-TGF- β 3+Lazer grubu 2.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama	62
Şekil 4-32: Kesi Grubu 1.hafta Üçlü Boyama.....	63
Şekil 4-33: Kesi Grubu 2.hafta Üçlü Boyama.....	63
Şekil 4-34: Lazer Grubu 1.hafta Üçlü Boyama	64
Şekil 4-35: Lazer Grubu 2.hafta Üçlü Boyama	64
Şekil 4-36: sfGFP-TGF- β 3grubu 1.hafta Üçlü Boyama	65
Şekil 4-37: sfGFP-TGF- β 3grubu 2.hafta Üçlü Boyama	65
Şekil 4-38: T-TGF- β 3 grubu 1.hafta Üçlü Boyama	66
Şekil 4-39: T-TGF- β 3 grubu 2.hafta Üçlü Boyama	66
Şekil 4-40: T-TGF- β 3+Lazer grubu 1.hafta Üçlü Boyama.....	67
Şekil 4-41: T-TGF- β 3+Lazer grubu 2.hafta Üçlü Boyama.....	67
Şekil 4-42: sfGFP-TGF- β 3+Lazer grubu 1.hafta Üçlü Boyama	68
Şekil 4-43: sfGFP-TGF- β 3+Lazer grubu 2.hafta Üçlü Boyama	68

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar	20
Tablo 2: Kullanılan kimyasallar	23
Tablo 3: Üçlü boyama protokolü	40
Tablo 4: Hemaotoksilen-Eozin boyama protokolü	42



1. GİRİŞ

Canlı organizmalarda istenilmeyen durumların en başında yaralar gelmektedir. Yaralar fiziksel olarak organizmada ezilme, sıyrık, sert cisim çarpması vb etkenlerle ortaya çıkabileceği gibi kimyasal bileşiklerin organizmaya zarar vermesi ya da mikro organizmalarla enfeksiyon oluşumu durumunda döküntü kaşıntı şişlik gibi semptomlarla birlikte kendini gösterebilmektedir. Tüm bu durumlarda organizmanın cilt mukoza ve hücre bütünlüğünün bozulması organizma tarafından istenilmeyen durumlardır (Mercandetti ve ark., 2013). Yaralar kesik, ezilme gibi cilt üzerinde görünüyorsa açık yara; çıkık burkulma perferasyon gibi görünmeyen kısımlarda ise kapalı yara olarak adlandırılmaktadır. Ek olarak yatalak hastalarda olduğu gibi bazen kapalı yaralar açık yaralara da dönüşebilmektedir. Yaralar cilt, kas, sinir ve hatta kemik dokuda bile görülebilmektedir. Her hangi bir başka sebep bu yaranın oluşmasına sebebiyet veriyorsa öncelikli olarak o sebebin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Canlı organizma istenmeyen bu durumlar için kendisini savunmak zorundadır. Bu savunma sürecinde, bozulan yapıların tekrardan tamir etmek karmaşık reaksiyonların gerçekleşmesini gerektirmektedir. Bu karmaşık reaksiyonların tümüne yara iyileşmesi denilmektedir. Tıp dilinde rekonstrüksiyon yani tamir etme ya da yeniden şekillendirme anlamını da taşımaktadır. Eğer ki bu yaralar yeniden şekillendirilemez ise sonuçlar daha tehlikeli boyutlara ulaşabilmektedir. Canlı organizma, yara kaynaklı enfeksiyondan daha fazla zarar görebilir hatta ölüme kadar giden durumlar ortaya çıkabilmektedir. Canlı organizma yeniden şekillendirme işlemini yaparken çeşitli izler, emareler, kötü görüntüler kalabilmektedir. Özellikle cilt üzerinde kalan bu kötü görüntüler çok dikkat çekmektedir (Macdonald ve ark. 2010).

Doku kaybının olmadığı, bozulan doku bütünlüğünün kendiliğinden yapışarak iyileştiği ve herhangi bir mikrobiyal kontaminasyonun olmadığı iyileşme çeşidine primer iyileşme denilmektedir. Yara iyileşmesinde doku kaybı varsa ve cerrahi işlemler yapılıyorsa, bu tarz iyileşmelere de sekonder iyileşme adı verilmektedir. Bazı sekonder iyileşmeler primer iyileşmeye dönebilmekte ancak sonra cerrahi müdahale gereksinimi ortaya çıkabilmekte ve tam yara iyileşme gerçekleşebilmektedir. Bu şekilde bir iyileşmeye de tersiyer iyileşme denilmektedir (Aksoy ve ark. 2017).

Yara iyileşmesi tamir mekanizmaları bir birini takip eden basamaklar şeklinde ilerlemektedir. Bu basamaklar, homeostaz-inflamasyon, proliferasyon ve matürasyon olarak tarif edilmektedir (Aksoy ve ark. 2017).

Homeostaz, iyileşme sürecinin ilk basamağıdır ve bu basamakta trombositlerin degranülasyonu, agregasyonu, fibrin birikimi, damarların daralması, pıhtının oluşması, trombositlerden bir çok farklı büyüme faktörlerininve inflamatuvar sitokinlerin (trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü TGF- β , epidermal büyüme faktörü (EGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF)) salgılanması olayları görülmektedir (Aydın ve ark.2015).

Proliferasyon, ikinci basamak olarak gelir ve bu evre yaralanma sonrasında 2.günde başlar ve üç hafta kadar sürer. Bu evrede geçirgen bir bariyer oluşturulur, reepitelizasyon ve kontraksiyon gelişir, mikro dolaşım düzenlenir, fibroblastların yerini kollejenler alır. Yara kenarlarında yer alan bazal tabakadan köken alan epitelyum hücreler yaranın üzerini kaplarlar ve pıhtının da yardımı ile kabuklanma denilen olay meydana gelir (Nandi ve ark,2017).

Sonraki faz olan matürasyonun diğer bir ismi remodelizasyondur. Kollejen liflerinin yeniden şekillenmesi anlamına da gelmektedir. Bu evrede kollejen tip III, lifleri daha sıkı olan tip I' e dönüşürler. Yara iyileşme sürecinin son basamağı olsada en uzun süren evresidir. Yara alanının renginin değiştiği skar dokunun oluştuğu bu evrenin 6-12 ay hatta 24 aya kadar devam ettiği bilinmektedir (Nandi ve ark. 2017).

Eğer ki bu yara iyileşme süreci normalin dışında gelişir ya da devam ederse skar doku, hipertrofik dokuya daha sonra keloid dokuya dönüşür. Bu durum hiç istenilmeyen bir süreçtir. Hatta skar doku daha sonra içerisinde metabolik artıklar biriktirebilir ya da başka bir dokuya baskı yapabilir. Bu yüzden yara iyileşmesi sürecinde kullanılan birkaç strateji vardır. Yara iyileşmesini hızlandırmak ve hastanın yaşam kalitesini artırmak amacı ile çeşitli kimyasal ilaçlar, protein içerikli topikal kremler, spreyleyler, tabletler, biyofilmler, elektrik akımları, radyo dalgaları, lazer ışınları, ultrason uygulamaları tercih edilebilmektedir. Yara iyileşmesinde yer alan birçok proteinde benzer şekilde istenmeyen

skar dokularının oluşmaması için kullanılmaktadır. Bu proteinlerden bir tanesi de transforme edici/dönüştürücü büyüme faktör beta (TGF- β) üst ailesidir (Vilorio-Petit ve ark.,2013). TGF- β ailesinin çoğu dimerik yapıya sahiptir ve otuz üç üyeden oluşmaktadır. Ayrıca üç tane prototip izoformu vardır. Bunlar TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3'dür (Richard ve ark.,2016). TGF- β ailesinin bir alt tipi olan TGF- β 3, endoderm gelişimi, organogenez, epitel hiperplazisi, hücre dışı matriks sentezi ve bağışıklık için gerekli bir sitokindir. TGF- β 3, mezenkimal kökenli hücreleri örneğin fibroblastları, osteoblastları uyatarak yeniden şekillenmeyi ve potansiyel skar oluşumunu düzenlemektedir (Valluru ve ark.,2011). Ayrıca düz kas alfa aktini ve keratinositleri toplayıp epiteli inhibe ederek skar dokunun oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Valluru ve ark.,2011). Bu nedenle TGF- β 3, farmakolojik açıdan aktif bir ilaç hedefi haline gelmiştir. Biyoaktif olarak TGF- β 3 proteinini insanda üretimi zor olduğu için araştırmacılar rekombinat teknolojisi ile üretmeye başlamışlardır (Lavery ve ark.,2009).

Yara iyileşmede son zamanlarda sıklıkla kullanılan tedavilerden bir diğeri de fototerapidir. Fotobiyomodülasyon, fotobiyostimülasyon ya da düşük seviyeli lazer tedavisi gibi isimlendirmeleri de mevcuttur. Işık enerjisi yardımıyla yara iyileşmesine yardımcı olmakadır. Lazer ışını,saçılım göstermeyen, tek dalga boyunda, yapısına dışarıdan elektron eklenen bir atomun yaydığı ve birbirine paralel olarak aynı fazda hareket eden foton parçacıklarından oluşan bir ışın demetidir. Tek dalga boyunda ışıma gösterdikleri için belli frekanstaki yoğun enerji ve sınırlı bir alanda etki göstermektedir (Passanezi ve ark.,2015).

Çıkış gücüne bağlı olarak, yüksek (çıkış güçleri 10-100 watt) ve düşük seviyeli (çıkış güçleri miliwatt düzeyde) lazerler olarak iki tip lazer vardır. Yüksek enerjili lazerler dokuları kesmek, yakmak veya ablasyon için cerrahide sıklıkla kullanılmaktadır. Uygulama sonucunda yüksek ısı açığa çıkması nedeniyle sıcak lazerler olarak da isimlendirilebilmektedir. Rejeneratif uygulamalar için tercih edilmedikleri gibi, yüksek ısı açığa çıkması nedeniyle yara iyileştirmesinde olumsuz etkileri de olabilmektedir. (Aimbire ve ark.,2006).

Düşük enerjili lazerler ise dokulardaki sıcaklığı değiştirmezler bu nedenle fotobiyomodölasyonda kullanılabilmektedir (Aimbire ve ark.,2006). Yapılan çalışmalarda belli dalga boyundaki düşük enerjili lazerlerin epitelizasyonu hızlandırdığı, fibroblastların üretimini artırdığı ve hücre içi dolaşımın daha etkin olarak yapıldığını ortaya koymuştur (Mester ve ark.,1971).

Hedef dokuda foton partikülleri ile etkileşime girebilecek bir moleküler kromofor veya fotoakseptör bulunması, ışık enerjisine bağlı yolakların harekete gecebilmesi içinde dokuların ışık enerjisini soğurabilecek optik özellikleri barındırması, ışık enerjisinin doku üzerine fototerapi etkisinin olması için gerekli kriterlerdir (Smith ve ark., 1992).

Canlılarda meydana gelen floresan ışıma olayına biyolüminesans denilir ve floresan proteinleri biyolüminesans özelliği gösteren yani fotoakseptör bulunan proteinlerdir dolayısı ile ışık enerjisini soğurabilirler. Floresan proteinlerin ilk üretileni yeşil floresan proteinidir (GFP). *Aequorea victoria* deniz canlısından üretilen GFP, 1970’li yıllarda ortaya çıkmıştır (Tsien, 1998).

GFP, sitoloji çalışmalarda, gen ışaretlemede, renklerinin yeşil olmasından dolayı rekombinant çalışmalarda hücre ışaretleycisi olarak kullanılmaktadır. Bu protein biyolüminesans özelliğinden dolayı biyosensör yapımında da kullanılmakta olup, biyokimya, biyofizik, moleküler biyoloji ve sitoloji çalışmalarda en çok tercih edilen bir vasıta haline gelmiştir. GFP üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda birçok farklı floresan proteini de elde edilmiştir. Örneğin; mavi floresan protein (BFP), cyan floresan protein (CFP), sarı floresan protein (YFP), GFP varyantlarıdır (Tsien, 1998).

Floresan proteinleri , protein ışaretleycisi olarak rekombinant çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılırlar. Bu kullanımların sağladıkları kolaylıklar kadar getirdikleri zorluklarda mevcuttur. GFP ve mevcut varyantları diğer proteinler ile kaynaştığında genellikle yanlış katlanmaya sebep olurlar. Süper folder yeşil floresan proteinleri (sfGFP) yüksek termodinamik stabilitesi, sağlam katlanma kinetiği ve çözünürlüğüne sahip olduğu için *E.coli* bakterisinde füzyon partnerinin katlanma durumu veya

2. KAYNAK ÖZETLERİ / KURAMSAL TEMELLER / GENEL BİLGİLER

2.1.Yara ve Yara İyileşmesi

Vücudumuzun en büyük organlarından biri olan deri, yaklaşık 2 m² yüzey alanına sahiptir ve dış çevreye karşı vücudumuzu korurken çevre ile de homeostaziyi sağlamaktadır. Organizmayı saran, koruyan ve çevre ile alış verişini düzenleyen bu organın, kesilmesi, delinmesi, ezilmesi, kimyasal maddelere maruz kalıp bütünlüğünün bozulmasına yara denilmektedir (Robson ve Ark,.2001). Bu etkenler dış etkenler olabileceği gibi bazı mikro organizmalar ya da bazı içsel hastalıklar da olabilmektedir. Bu yaralar meydana geldikten sonra acilen vücut tarafından kapatılması gerekmektedir. Vücudun başka dokularının enfeksiyon kapmaması ve sıvı kaybı olmaması için en kısa sürede onarıma gitmesi gerekir Bu onarım mekanizması birden fazla birbiri ile koordineli hareket eden mekanizmaların etkin olduğu kompleks bir süreçtir (Alonso ve Ark,1996).

Yaralar, akut ve kronik yaralar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Akut yaralar, 5- 30 gün süre ile iyileşebilen yaralardır. Bu yaralar dokunun travma sonrası kaybedilmesi ya da cerrahi işlemler sonucu oluşan yaralardır. İyileşme sürecinde bir sıkıntı görülmeyen yaralardır. Kronik yaralar ise kendiliğinden iyileşemeyen, iyileşme sürecinde sıkıntılar olan, zamanında tamir edilemeyen yaralardır. Arteriyel ve venöz yetmezlik, yanık, enfeksiyonun devamı ve diyabet gibi çeşitli nedenlerden kaynaklıdır (Komercevis,2000).

Doku yaralanması sonrasında başlayan sürecin amacı dokunun bütünlüğünün tekrar sağlanmasıdır. Ancak kemik ve karaciğer dokusu dışında, doku bütünlüğünün tam olarak sağlanması mümkün olamamaktadır. Doku iyileşmesi skar-nedbe-iz ve fibrozis, hipertrofik ve keloid oluşumuyla sonlanır bilmektedir. Yara iyileşirken ortaya çıkan dokuya da skar dokusu denilmektedir (Eming ve ark.,2007).

Yara iyileşmesi, sadece yara alanı ile sınırlı değil tüm sistemleri ilgilendiren hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal olayların bütünüdür. Yara iyileşmesi aslında bütün dokularda aynı temel prensiplerde gerçekleşmektedir (Aksoy ve ark,2017).

Yara iyileşmesi temel olarak üç basamakta gerçekleşmektedir

1. İnflamasyon (Homeostazi)-Yangı Basamağı (1-5 gün sürmektedir)
2. Proliferasyon (Kollejen Sentez fazı) - Hücresel Çoğalma Basamağı (5-14 gün sürer)
3. 3.Maturasyon (Remodelizasyon) - Doku Olgunlaşması Basamağı (14.günden sonrası-6 ay,24 ay)



Şekil 2-1: Normal ve anormal yara iyileşmesi (Aksoy ve ark,2017)

2.1.1. İnflamasyon (Homeostaz) -Yangı Basamağı;

İnflamasyon, kompleks bir süreç olan yara iyileşme sürecinin ilk basamağıdır. Travma sonrası dokuda meydana gelen hasar ile başlar ve bu hasar sonucunda dokuda bir çok kimyasal mediatörler ve hücreler arası iletişimi sağlayan sitokinlerin salınımına neden olmaktadır. Bu proteinler bir çok kompleks olayı başlatmaktadır (Viloria-Petit ve ark.,2013). Dokuda kanamanın durması ve hemostaz sağlanır. Yara alanında yıkıma uğramış damarlar hemen daralır, damar duvarları zedelendiğinde trombositler kollajenle temas ederek aktifleşerek o bölgede birikip pıhtıyı oluşturmaktadırlar. Endotel hücreler tarafından üretilmekte ve trombositlerin toplanmasını sağlayan düzenleyici Tromboksan A2 aktivasyonu ile pıhtı /kanama varsa kanamayı azaltmaktadır (Broughton ve ark.,2006). Damarlarda ki vazokonstriktör ajanlarla vazokonstriksiyon gelişerek

kanama azalır. Kanamanın azalması ve damarlardaki daralma sonucunda prostoglandin ve kompleman sisteminin aktivasyonu ile yaygın damar oluşumu ve genişleme yani vazodilatasyonu başlatmaktadır. Bu genişleme ile yara alanına hücrelerin geçişi artarak inflamatuvar eksuda toplanması başlamaktadır. Bu oluşumlarda bir birçok kemotaktik faktörde rol oynamaktadır. PDGF, TGF-beta, fibronektin, serotonin gibi uyarıcı maddelerin salınımı trombositler tarafından yapılmaktadır. Homeostazi yavaş yavaş nötrofil ve monosit hücreleri tarafından yapılmaktadır (Richardson,2004). Bu fazda makrofajların da etkinliği çok büyüktür. Makrofaj sayısındaki azalmanın yara iyileşmesi ile ters orantılı olduğu bildirilmiştir (Eming ve ark,2017).

2.1.2. Proliferasyon (Kollejen Sentez fazı) - Hücresel Çoğalma Basamağı

Homeostaz evresinden sonraki evredir. Ortalama iyileşmenin 5. günü başlayan fazdır. Bu fazı da kendi içinde ayıracak olursak üç başlık ön plana çıkmaktadır. Bunlar, epitelizasyon, anjiyogenez ve granülasyon dokusu oluşumudur. Epitelizasyon epitelyum hücrelerinin çoğalmasındır ve yara alanında yani iyileşmede bazal membran bozulmadan kalırsa oluşan epitelyum hücreler yaraya doğru göç etmektedirler (Şekil 2-1). Bu göç eden öncül hücreler yara alanında bozulmadan kalmakta ve yaklaşık 2-3 gün içerisinde epidermisin tamiratını tamamlamaktadırlar. Bu evrede en önemli işi yapan hücreler fibroblast hücreleridir. Ayrıca kollejen üretiminden de sorumludurlar. Yani iyileşmede fibroblastlar mekanik olarak da görev alırlar (Aksoy ve ark.,2017). Eğer bazal membran bozulmuş tahrip olmuş ise bu sefer deri kenarlarında bulunan epitelyum hücreleri çoğalmaya başlar ve yara alanında koruyucu bir tabaka oluşturmaktadırlar. Bu tabaka kontaminasyonu, sıvı kaybını engeller (Broughton ve ark,2006). Bir önceki fazda önemli rol oynayan makrofajlar ve trombositler bu fazda da kemotaksik olarak etkinliğini sürdürmektedirler. Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) epitelyum proliferasyonda uyarıcı rol oynamaktadırlar (Aksoy ve ark, 2017). Bu evrede dikkat çeken diğer bir oluşum anjiyogenezistir ve TNF- α tarafından uyarılan endotel hücre göçü ve kılcal oluşumu ile meydana gelmektedir. Kılcal damarların oluşması ve yara bölgesine göçü, yara iyileşmesi için çok önemli bir olaydır. Bu alanda çalışan hücrelerin beslenmesi bu damarlar yolu ile sağlanmaktadır. Beslenme sağlanmaz ve iyileşme olmazsa kronik bir tablo ortaya çıkabilmektedir (Goldman,2004).

Yara alanı eğer çok geniş ise epitelleşme kenarlardan değil granülasyon dokusunun üzerinden ilerlemektedir. Granülasyon oluşumunu sağlayan fibroblastlar, yara alanı içerisinde ki sert tıkaç şeklindeki yapılardır. Migrasyon, yara alanındaki iki uç epitellerin birleşmesine kadar devam etmektedir. Daha sonraki aşama ise büzüşme yani kontraksiyondur. Yara kontraksiyonu ile yara alanının büyüklüğü azalmaktadır. Bu olay çoğunlukla miyofibroblastlarca gerçekleşmektedir. Granülasyon dokusunun oluşması ve epitelizasyonun bitmesi proliferasyon aşamasının sona erdiğinin göstergesidir (Öztopalan ve ark., 2017).

2.1.3. Maturasyon (Remodelizasyon) - Doku Olgunlaşması Basamağı

Olgunlaşma ya da yeniden şekillenme anlamına gelen remodelizasyon evresi iyileşmenin son basamağıdır. Bu evrede kollajenlerönemli bir iletişim ağı kurmaktadırlar. Hücre dışı matriksin düzenlenmesi, yeniden sentezlenmesi ve yara alanının gerilme kuvvetini elde etmesi, bu evrenin karakteristik özellikleridir (Broughton ve ark,2006). Ayrıca bu evrede az hücresel ve vasküler yapıda olan skar doku da oluşmaktadır (Li ve ark. 2013). İyileşme sırasında bu evre içinde ekstrasellüler matriks bileşenleri belirli bir şekilsel değişikliğe uğramaktadırlar. Proliferatif aşamada üretilen kollajen tip III, yerini daha güçlü olan kollajen tip I'e bırakmaktadır. Kollajen tip I lifleri, uygulanan strese göre dizilip organize olmaktadırlar (Greenhalgh,1998).

Kollajen tipI oluşuktan sonra hücre içi matriks olgunlaşmakta ve kollajen demetlerinin çapları artmakta, hyaluronikasit ile fibronektin bozulmaktadır. Yaranın gerilme kuvveti, kollajenin toplanması ile doğru orantılı olduğu için giderek artmaktadır (Guo ve Dipietro,2012). Oluşan kollajen lifleri sağlıklı dokuya kıyasla orijinal gücün yaklaşık %80'ini geri kazana bilmekte; ancak orijinal gücü asla geri kazanamadığı görülmektedir (Robson ve ark. 2001). Kollajen üretimi ve bozulması ile oluşan hücre matriksinin şekillenmesi sürekli olarak gerçekleşmektedir. Yaradaki nötrofiller, makrofajlar ve fibroblastlar tarafından üretilen matriks metallaproteinaz enzimleri (MMP), kollajenin bozulmasından sorumludur. MMP enzimlerinin aktiviteleri inhibitör faktörleri tarafından düzenlenmektedir. MMP aktivitesindeki düşüş matriksin birikmesi ile sonuçlanmaktadır.

Kollajen demetlerin ilk birikimleri düzensiz olduğu için iyileşme bölgesi zayıf ve gerilme kuvveti düşüktür. Ama sonrasında kollajen matriksin daha koordineli ve çapraz bağ şeklini alması yara alanına sağlamlık katmaktadır (Baum ve ark,2006). Bu süreçte PDGF, TGF- β ve FGF gibi stokinlerde rol almaktadır. Yara iyileşirken fibroblastlar ve makrofajların yoğunluğu kontrollü hücre ölümü ile azalmaktadır. Zamanla kan damarlarının ve hücrelerin sayısı azalmış, iyileşme bölgesinin gerilme kuvveti artmış ve skar doku oluşmuş olmaktadır (Baum ve ark,2006).

Yara iyileşmesinde meydana gelen olaylar (homeostaz ve koagülasyon, inflamatuvar, çoğalma ve yeniden şekillenme fazları) birbiri ile çok yakından bağlantılı olan hücreler, hücre yüzey reseptörleri, hücre dışı matriks proteinleri ve biyolojik olarak aktif moleküllerin etkileşimini içeren aktif bir süreçle yönetilmektedir. Bu süreçte PDGF, TGF- β ve FGF gibi stokinler de rol almaktadır (Eming ve ark,2014).

2.2.Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF- β)

Normal doku yapısının kalıcı olarak değişmesiyle oluşan yara izi skar doku hipertrofik yapı ya da keloid oluşumu hem yara iyileşmesinde hem de fibrozlanma bozuklukların da istenmeyen sonuçlardır. Bu istenmeyen izlerin önlenmesi ve tedavi edilmesi için çeşitli stratejiler vardır. Dönüştürücü büyüme faktör beta (TGF- β) üst ailesi doku onarımında önemli stratejilerin içinde yer almaktadır (Coşkun ve ark;2016). TGF- β süper ailesinin üyelerinin çoğu dimerik yapıdadır ve yaklaşık otuz üç üyeden oluştuğu bilinmektedir. Üç prototip TGF- β izoformuna (TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3) ek olarak, üst aile ayrıca aktivinler, kemik morfojenik büyüme proteinleri (BMP'ler), büyüme ve farklılaşma faktörleri (GDF'ler), miyostatin, ve Mullerian İnhibitör Substansı (MIS) inhibitörler içermektedir (Antsiferova,2012). TGF- β ailesinin üyeleri, çok hücreli canlılar arasında yaygın olarak anahtar sinyal dönüştürücüleri olarak kabul edilmektedir. Üç prototip TGF- β izoformu, TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3, otokrin ve parakrinde hareket eden ayrı genler tarafından kodlanan yapısal olarak benzer sitokinlerdir (Massague,2012). Büyüme faktörlerinden TGF- β hemen hemen bütün hücrelerde sentez edilen önemli bir sitokindir. Trombositlerin alfa granülleri içinde yoğun miktarda olduğu bilinmektedir. Bu sebeptendir ki hasarlı bölgeye degranülasyonla salınmaktadır (Sprugel ve ark;1987). TGF- β

proteinleri yetişkin dokuların bakım, yenilenme ve düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Yara iyileşmesinde en önemli etkisi inflamatuvar hücre kemotaksisini uyarması ve ekstrasellüler matriks sentezini arttırmalarıdır. Kollajen sentezinin en güçlü uyarıcılarından biri olan bu aile yara kontraksiyonu ve matriksi organize edebilme özelliği nedeni ile yeniden şekillendirme safhasında da rol oynamaktadırlar (Sprugel ve ark;1987). TGF- β 'nın en önemli özelliği fibroblastların yara bölgesine iletilmesini, çoğalmasını ve kollajen üretimini stimüle etmektir. Yine önemli özellikleri arasında inflamasyonu baskılaması, angiogenezis, reepitelizasyon ve bağ doku rejenerasyonu gibi unsurlar sayılabilmektedir (Öztopalan ve ark. 2017).

TGF- β ailesinin bir alt tipi olan TGF- β 3, endoderm gelişimi, organogenez, epitel hiperplazisi, hücre dışı matris sentezi ve bağışıklık için gerekli bir sitokindir. Esasen, kutanöz yaralanmadan sonra, TGF- β 3 mezenkimal soyunu uyarmak için TGF- β 1 / Smad sinyal yoluna bağlanmakta ve TGF- β 1 proteininin etkisini azaltmaktadır. TGF- β 1 yetişkinlerde fibroz bozukluklara neden olan bir sitokindir. Bu sitokinin engellenmesi ile hücreler, onarımı, yeniden şekillenmeyi ve potansiyel skar oluşumunu düzenler. Yani hasarlı bölge yeniden eski halini almasa bile, daha düzenli ve koordineli dizilim için zaman kazanılır. TGF- β 3 makrofajlar için uyarıcıdır ve kollajen sentezinin artırılmasında rol oynamaktadır. Fibroblastlar, osteoblastlar ve Schwann hücreleri gibi mezenkimal kökenli hücreleri stimüle etmektedirler (Valluru,2011).

Ayrıca yapılan çalışmalarda, TGF- β 3 proteininin, yara iyileşmesini önemli ölçüde desteklediği ve önceden kullanılırsa α -düz kas aktini ve keratinositleri toplayıp epitelyali inhibe ederek skar dokunun oluşumunu engellediği belirlenmiştir yani TGF- β 3 anti-fibrotik bir role sahiptir (Valluru,2011).

TGF- β 3, bir sitokin ilacı olarak aktif bir geliştirme hedefi haline gelmiştir. Biyoaktif insanda üretimi zor olduğu için araştırmacılar rekombinat teknolojisi ile üretmeye başlamışlardır (Laverty ve ark,2009).

2.3.Rekombinant Protein Üretimi

Canlı organizmaların hayatsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için çeşitli kimyasal reaksiyonlara ihtiyaçları vardır. Bu reaksiyonlar hücre sinyal mekanizması, bağışıklık sistem ve hücre yaşam döngüsü gibi süreçlerdir ve enzimleri de içeren protein yapısındaki moleküller bu süreçlerde önemli rollere sahiptirler (Gökçe,2006). Bu protein yapıdaki moleküller sadece canlı organizmaların hayatsal faaliyetleri için değil aynı zamanda normal yaşamda da önemli tanı ve tedavinin de parçalarıdır. Bu tanı ve tedavi yapılırken saf proteinler miligram miktarlarda gerekmektedir (Gökçe,2006). Bu proteinik moleküllerin doğal kaynaklardan ekstrakte edilmesi hem yüksek maliyetve düşük verimliliklere dayanmakta hem de kontaminasyonlara neden olmaktadır (Porro,2005). Bu engellerin aşılması biyoteknolojinin gelişmesi ile rekombinant protein terimini ortaya çıkarmıştır. İlk rekombinant protein olan insan insülini *E. Coli*'de üretilmiş ve 1992 yılında klinik kullanım için onaylanmıştır. Üç yüz üzerinde farmasötik protein ve antikor, 100 milyar dolardan fazla satış ve yıllık %15-18 büyüme ile pazarda yerini almaktadır (Langer,2012). Dünya ilaç pazarına 2020 yılında bakıldığında yaklaşık %28'ini biyoteknolojik ilaçların oluşturduğu ve bu payın ilerleyen süreçte artmaya devam ederek 2024 yılında %31'e ulaşacağı düşünülmektedir. Rakamsal olarak ise 2020 yılında yaklaşık 273 milyar dolar iken, 2024 yılında bu rakamın 383 milyar dolar seviyelerine gelmesi beklenilmektedir (TİTCK, 2020). Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ile birlikte rekombinant protein kavramının iyice benimsenmesini sağlamıştır. Rekombinant protein üretimi *E.coli* bakterisinde yaygın olarak gerçekleştirilmektedir. Bunun nedeni ise *E.coli* bakterisinde protein üretimi ve DNA manipulasyonları oldukça basit ve en önemlisi ekonomik olmasıdır. *E. coli* hücrelerinde protein ekspresyonunda karşılaşılan asıl sorun inklüzyon cisimciği oluşumudur. Bu sorunu çözmek için çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bir füzyon etiketinin kullanılması, *E. coli* ekspresyon sisteminde çözünür aktif formda protein elde etmek için kullanılan en güçlü stratejilerden biridir. Superfolder GFP (sfGFP), *E. coli*'de füzyon ortağının çözünürlüğünü artırmak için kullanılan füzyon etiketlerinden biridir (Bilgin,2023).

2.4.Yeşil Floresan Proteinler (GFP)

Osamu Shimomura isimli bilim adamı 1960 yılında Kuzey Amerikanın sahillerinden topladığı deniz analarıda (*Aequorea Victoria*) yapmış olduğu çalışma ile floresan molekülü için bir başlangıç sayılmaktadır. Saflaştırmak için denizbanalarının kenarlarını keserek çıkan sıvı kısmı kağıtlara emdirilerek özütlemişlerdir. Böylece saflaştırma yapabilmişlerdir ve saflaştırılan proteine aequorin adı verilmiştir (Tsien,1998). *Aequorea victoria* deniz canlısından 1970'li yıllarda izole edilen GFP'nin kristal yapısı ortaya çıkartılmıştır (Yang ve ark.,1996). Floresan proteinleri biyolojik belirteçler arasında önemli bir yer edinmiştir. GFP günümüzde sitolojik çalışmalarda, gen işaretleme tekniklerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Üretilmesi istenilen proteine füzyon olarak eklenebilmektedir. (Acıkgöz ve ark.,2014). Bu proteinlerin füzyon olarak eklenmelerinin başlıca sebepleri,proteinlere afinite tag ilavesi ile proteinin saflaştırılması işleminin kolaylaşması, proteinlerin çözünürlüğünün artırılması veya disülfid bağlarının oluşumunun kolaylaştırılması, GFP proteinleri ilavesi ile proteinin nerede üretildiğinin gözlemlenmesini sağlamak olarak sıralanabilir (Gökçe,2006). GFP proteinleri füzyon olarak kullanıldığında yanlış katlanma yani inklüzyon cisimcikleri oluşturabilirler. Bunlar aktif olmayan protein formlarıdır. Rekombinant proteinlerin üretiminde inklüzyon cisimsiği oluşumunu engellemek için moleküler şaperonlar, düşük sıcaklık, uygun promotör, proteinin merdiven etkileri gibi stratejiler kullanılmalıdır. İstenmeyen bu durumun önüne geçilebilmesi için GF proteinlerinden olan süper folder yeşil floresan proteini (sfGFP) füzyon için en uygun stratejilerden bir tanesidir (Fukuda ve ark.,2000). Yüksek çözünürlüğe ve stabiliteye sahip bir floresan proteindir. sfGFP, kümelenme eğilimi ve denatürasyon gibi diğer floresan proteinlerin dezavantajlarına sahip değildirler. sfGFP proteini zayıf katlanmış bir eş peptit ile kaynamış olsa bile katlanabildiğinden yüksek verimlilik ile karakterize edilir. Füzyon yapısındaki ortağının katlanma etkinliğini de artırır (Pedelacq ve ark, 2006).

2.5.Fototerapi ve Diyet lazer

Lazer ışını, doğal ışık kaynaklarından farklı olarak, normal koşullarda evrende yer almazlar. Tek dalga boyunda, monokromatik (tek renk) yapısına dışarıdan elektron

eklenen bir atomun yaydığı ve birbirine paralel olarak aynı fazda hareket eden (koherent) foton parçacıklarından oluşan ve saçılım göstermeyen bir ışın demeti olarak güneş ışınlarından ayrılmaktadırlar. Lazer ışık kaynakları tek dalga boyunda ışıma göstermektedir. Bu nedenle belli frekanstaki yoğun enerji, sınırlı bir alanda etki göstermektedir. Lazer sistemleri, foton partiküllerinin oluşmasını sağlayan aktif elementine göre isimlendirilebilmekte ve belirli dalga boylarıyla tanımlanmaktadırlar (Gumusderelioglu, 2014).

Çıkış güçlerine bağlı olarak günümüzde iki tip lazer kullanılmaktadır. Bunlar;

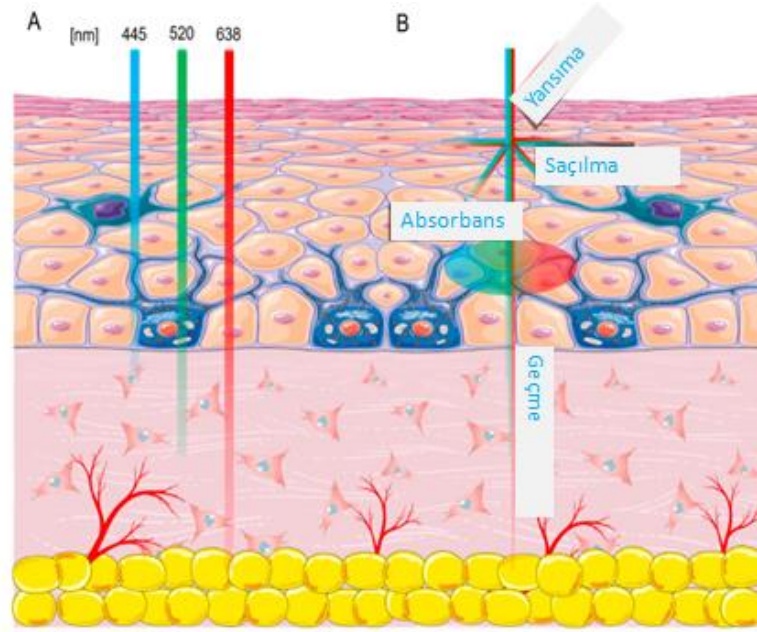
- Yüksek seviyeli lazerler (çıkış güçleri 10-100 watt aralığında)
- Düşük seviyeli lazerler (çıkış güçleri milliwatt düzeyinde) olarak bilinmektedirler.

Yüksek enerjili lazerler dokuları kesmek, yakmak veya ablasyon için cerrahide sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle estetik diş eti görünümünde yada diğer doku estetiklerinde kullanılmaktadırlar. Yüksek ısı açığa çıkması nedeniyle sıcak lazerler olarak da isimlendirilebilmektedir. Rejeneratif uygulamalar için tercih edilmedikleri gibi, yüksek ısı açığa çıkması nedeniyle yara iyileştirmesinde olumsuz etkileri de olabilmektedir.

Düşük enerjili lazerler ise dokularda sıcaklık değişimine neden olmamaları nedeniyle, fotobiyomodülasyonda kullanılabilir. Bu amaçla kullanılan lazerlerin başında kullanılan lazer modaliteleri ve etkin dalga boyları şu şekildedir:

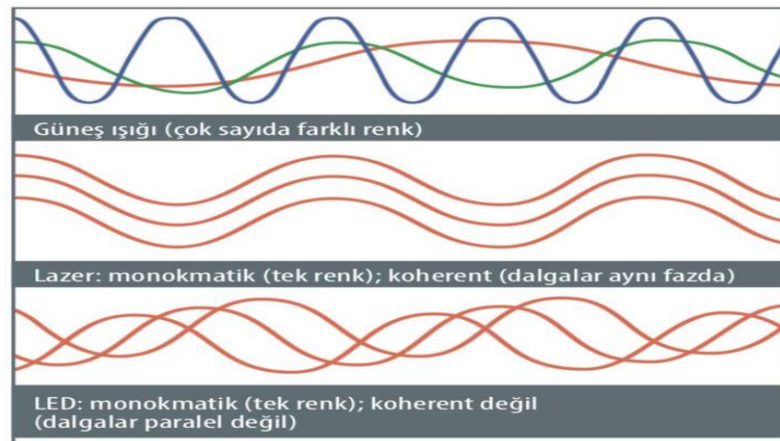
- Helyum-neon lazer (He-Ne: 632,8 nm)
- Galyum-alüminyum lazer (Ga-Al: 630-685 nm)
- Helyum-neon-arsenit lazer (He-Ne-As: 780-870 nm)
- Galyum-arsenit lazer (Ga-As: 904 nm)
- Yakut / Ruby lazerdir (694 nm)

Lazer ışığı ile biyolojik dokuların etkileşimi dört tipte gerçekleşir. Absorbsiyon (emilim), transmisyon (derin dokulara geçiş), refleksiyon (yansıma) ve scattering (saçılma) şeklinde görülen etkileşimlerin hangi şekilde görüleceği lazerin dalga boyuna bağlıdır (Cohen, 2002).



Şekil 2-2: Deri ile lazer etkileşimleri (Lister ve ark.,2012)
 (A) Farklı dalga boylarında ışığın cilde nüfuz etmesi. (B) Deri ile lazer ışını etkileşimi

LED ışık kaynakları ise 1990'lı yıllarda geliştirilmiş ve ışık yayan diyotlar olarak bilinir. LED'lerde lazerlerden farklı olarak elektron geçişini sağlayan iki ayrı yarı iletken bulunmasından dolayı LED ışık kaynaklarından farklı dalga boylarında foton partikülleri yayılır. LED'ler monokromatik (tek renk) ancak koherent olmayan (dalgalarda paralel değil) ışık kaynaklarıdır (Mester ve ark.,1971).



Şekil 2-3: Güneş ışığı, lazer ve LED ışınlarının özellikleri(Gumusderelioglu 2014)

Işık enerjisi yardımıyla travmalar sonrasında (kaza, hastalık vb) meydana gelen hücresel bozuklukların iyileştirilmesi ve biyolojik yanıtın düzenlenmesine fototerapi denilmektedir. ‘Fototerapi’ genel bir kavram olarak ışık enerjisinin iyileştirme ve onarım amacıyla kullanımını tanımlasa da ‘fotobiyomodülasyon’ (Hosseinpour ve ark.,2019), ‘fotobiyostimülasyon’ (Lubart ve ark.,2006), ‘düşük seviyeli lazer tedavisi’ (Aimbire ve ark.,2006) gibi farklı biçimlerde de isimlerin verildiği bilinmektedir.

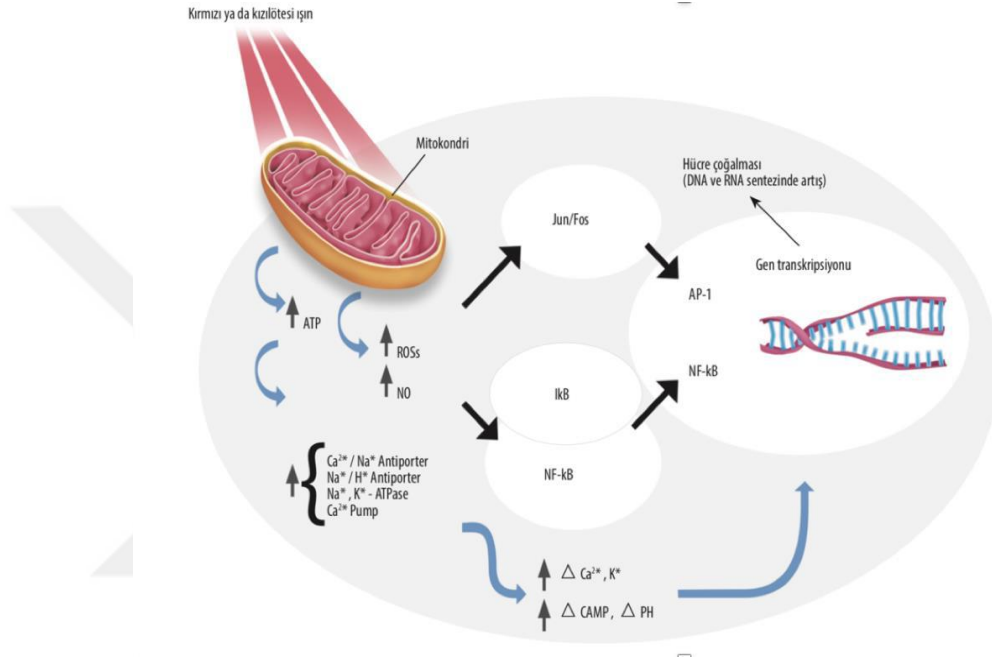
Işık enerjisinin doku üzerinde fotobiyomodülasyon etkisinin olabilmesi için fotobiyojinin iki temel kriterini karşılıyor olması gerekmektedir:

- Hedef dokuda foton partiküller ile interaksyona girebilecek bir moleküler kromofor veya fotoakseptör bulunması gerekmektedir. (hemoglobin)
- Işık enerjisine bağlı yolların harekete geçebilmesi için dokuların ışık enerjisini soğurabilecek optik özellikleri barındırması gerekmektedir.(GFP)

Fotostimülasyon uygulamalarında, dokuların zarar görmemesi için, kırmızı ve kırmızıya yakın dalga boylarında ışık kullanılmaktadır (600-1100nm). Işık dalga boyları ile hücre düzeyde proliferasyonu ve hücre farklılaşmasının gibi birçok biyolojik süreç uyarılmaktadır. Halen bu etkiye yol açan moleküler yollar tam olarak aydınlatılamamış olsa da özellikle etkinin mitokondri düzeyinde gerçekleştiği bilinmektedir (Smith ve ark.,1992).

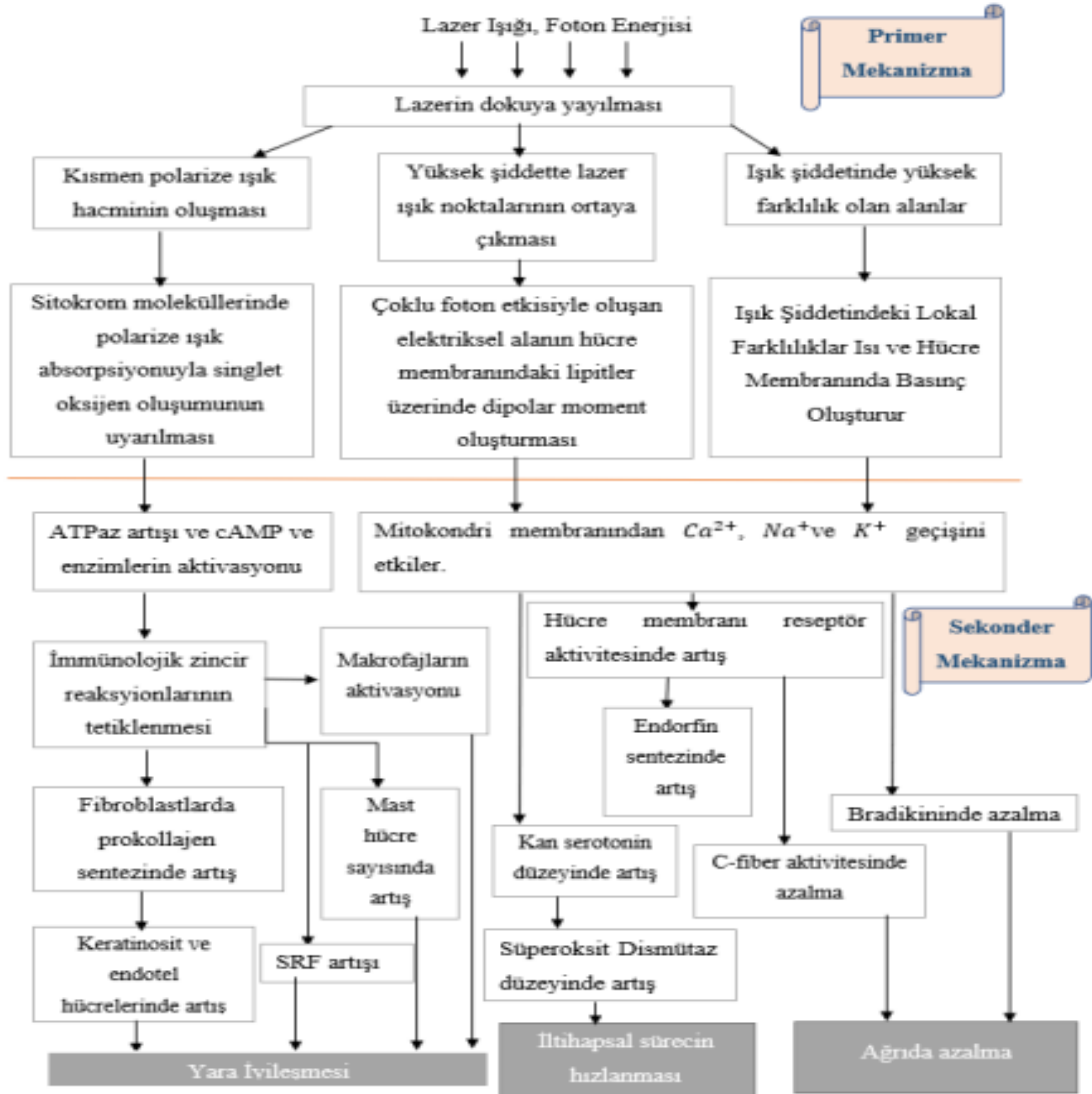
Fotobiyomodülasyon ile aktarılan ışık enerjisi hücrelerin redoks potansiyelini değiştirilerek hücre içi serbest oksijen radikallerinin (ROS) de seviyesinde artışa neden olmaktadır (Smith ve ark.,1992). ROS, serbest radikaller (hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitler), süperoksit ve hidroksil radikalleri içeren oksijen iyonlarıdır. Bu radikaller hücre içinde oksidatif solunum reaksiyonları sonucunda meydana gelmektedirler ve hücre düzeyde aktivitenin düzenlenmesinde aktif rol oynamaktadırlar. Bu aktivitelerin başında, sinyal iletimi, nükleik asit ve protein sentezi, enzim indüksiyonu ve hücre proliferasyonu gelmektedir. ROS/Akt yolu aracılığı ile hücre proliferasyonu indüklenmektedir. Aynı zamanda, sitoplazmik cevaplar aracılığı ile transkripsiyonel değişiklikler de meydana gelmektedir. NF- κ B gibi birçok transkripsiyon faktörü hücre düzeyde redoks seviyesindeki değişimler ile düzenlenmektedir (Szymanska ve ark.,2013).

Fotobiyomodülasyon hücre içi sinyal iletimini etkilediği gibi hücrenin membran geçirgenliğinde olumlu olarak değiştirmektedir (Smith ve ark.,1992). Hücre içinde meydana gelen bu etkileşimlerle beraber dokuda proliferasyon ve rejenerasyon kapasitesinde artış görülmektedir. Yara iyileşmesinde artış, epitelizasyon, anjiyogenez ve mikro dolaşımda iyileşme ile görülmektedir. (Szymanska ve ark.,2013).



Şekil 2-4: Fotobiyomodülasyon sonrası hücrede meydana gelen değişiklikler (Gumusderelioglu 2014)

Fotobiyomodülasyon temelde hücre proliferasyonunda artış ile etkisini göstermektedir.. Her ne kadar fotobiyomodülasyonun hücre proliferasyonunu arttırdığı genel kanı olarak yer alsada hücre proliferasyonunu arttırmadığı yönünde çalışmalar da mevcuttur. 830 nm dalga boyunda Ga-Al-As lazer ile yapılan bir çalışmada, fibroblast ve keratinosit hücrelerinin *in vitro* ortamda proliferasyonlarını arttırmadığını gösterilmiştir (Lagan ve ark.,2001). Bir başka çarpıcı çalışmada ise fotobiyomodülasyonun her hücre tipine aynı oranda etki etmediği ve fibroblastların endotel hücrelerine kıyasla daha fazla cevap verdiği gösterilmiştir. Bu noktadan hareketle, fotobiyomodülasyon çalışmalarında hücre tipinin ve dalga boyunun önemi görülmüştür (Tuby ve ark.,2017).



Şekil 2-5: Düşük Doz Lazerin tedavi mekanizması (Aoki ve ark.,2007'den uyarlanmıştır.)

2.5.1. Diyod Lazer

Diyod lazerler kolay kullanımı, bakımının basit olması, kararlı güç aktarımlarına sahip olmaları ve taşınabilir olmalarından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Arroyo, Neri, Fussuma, &Imamura, 2016; Schena, Saccomandi, &Fong, 2017). Tıp alanında kullanılan cerrahi diyod lazerler 810-980 nm dalga boyundadır. Güçleri 10-60 W'a kadar çıkmaktadır. Diyod lazerler, fotonlar halinde enerjisini yayarak yarı iletken madde aracılığıyla lazer enerjisini üretmektedirler. Aktif ortam olarak yarı iletkenler kullanılmaktadır. Bu yarı iletkenler çoğunlukla alüminyum, galyum, arsenid ya da GaAlAs'dır. Diyod lazer enerjisi sert kuartz çekirdek özelliğine sahip fiber optik kablo

aracılığıyla cerrahi alana non-kontakt ya da kontakt modda yayılmaktadır (Berger, &Eeg, 2006). Dalga boyları hemoglobin, oksihemoglobin, melanin ve hücre içi su tarafından farklı derecede absorbe edilmektedir (Arroyo ve ark., 2016; Berger, &Eeg, 2006). Hedef dokunun içerdiği kromofor miktarının yoğunluğuna göre ışın absorpsiyonu fazla, penetrasyon derinliği ise az olmaktadır. Dokudaki optik termal üretim hızı, absorpsiyon katsayısı ile orantılı olduğundan dolayı 980 nm diyod lazer, dokuda hızlı ve bölgesel ısınma üreterek sınırları belli ablasyon bölgeleri oluşturabilmektedir. Ablasyon bölgeleri oluşturduğu için tümör rezeksiyonlarında etkili kullanılabileceğinin göstergesidir (Ahrar ve ark., 2010). Solgun ve avasküler dokularda, penetrasyon derinliği ve çevre hasarı fazla olmaktadır (Dinç, &Or, 2014). Diyod lazerler, 0,3-0,6 mm derinlikte doku penetrasyonu yaparak 2 mm çapa kadar olan damarlarda iyi bir hemostaz sağlamaktadır. Bu nedenle de yara iyileşmesinde kullanılabilmektedir (Berger, &Eeg, 2006).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1: Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Cihaz	Markası
Laminar Akışlı Kabin	ESCO
CO ₂ li İnkübatör	ESCO
Soğutmalı Masaüstü Santrifüj	Nüve NF800R
Soğutmalı Mikrosantrifüj	Hettich UNIVERSAL 320 R
Soğutmalı İnkübatör	Nüve
Etüv	Memmert
-80 °C Dondurucu	VWR
Otoklav	HMC-Hirayama
Çalkalayıcı İnkübatör	Biosan-ES20
Sirkülatörlü su banyosu	Nüve
Ters-faz mikroskop	Olympus CKX41
UV/VIS Spektrofotometresi	Denovix DS-11 FX+
Hassas Terazı	Radwag
Pipet tabancası	Greiner
Spin vortex	Biosan-Combi Spin FVL 2400N
Mikroplaka Elisa Okuyucu	Tecan
Buz makinası	Vision
Otomatik Pipet	Eppendorf
Nanodrop	DeNovix
Mikrotom	Leica SM 2000R
Diyod Lazer	LZ/SMS-SOLASE
Fotoğraf makinası	TecnoPova

3.1.2. Kullanılan çözeltiler

Amfisilin Antibiyotiği: 1 gram amfisilin alınarak 10 ml saf suda çözülmüştür. Antibiyotik steril 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek mikrotüplere bölündü ve (-20°C) derin dondurucuda saklanmıştır.

FSB çözeltisi: 100 g gliserol, 7.5 g CaCl₂.2H₂O, 7.4 g KCl, 10 mL 1 M (pH:7.5) KCH₃COO alınarak pH:6.5'e ayarlanmıştır ve hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır ve otoklavlanmıştır.

LB çözeltisi: 20 g LB (Luria-Bertani) Broth Base 1000 ml suda çözüldü. Hazırlanan 1000 mL'lik çözelti 250'er mL olacak şekilde iki tane stok şişesine alınmıştır ve üzerine 3.75 g agar ilave edilip karıştırılmıştır, otoklavlanmıştır.

MTT çözeltisi (5mg/ml): 5 mg MTT, 1 ml divalent katyonları içermeyen (Ca⁺² ve Mg⁺²) içermeyen fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde çözülmüştür. -20°C'de karanlıkta saklanmıştır.

SDS Elektroforez Jeli:

Alt Tampon: 182 g Tris (1.5 M), 4 g SDS (%0,4) 1000 mL saf suda çözülerek pH:8.8 olarak ayarlanmıştır.

Üst Tampon: 60.5 g Tris (1.5 M), 4 g SDS (%0,4) 1000 mL saf suda çözülerek pH:6.6 olarak ayarlanmıştır.

Yürütme jeli: 2.7 mL %40 akrilamid, 2.25 ml alt tampon, 4 ml su, 50 µL %10 APS ve 20 µL TEMED.

Yükleme jeli: 0.35 mL %40 akrilamid, 1 mL üst tampon, 2.55 ml su, 50 µL %10 APS ve 10 µL TEMED. Tüm maddeler katılmıştır ve en son TEMED eklenip kasete döküldü. Yürütme jeli polimerleştikten sonra üzerine yükleme jeli döküldü ve polimerleşmesi beklenmiştir.

Elektroforez Tamponu (1X): 3 g Tris, 14.4 g Glisin, 1 g SDS bileşikleri son hacim 1000 mL olacak şekilde saf su eklenerek hazırlanmıştır.

SDS Örnek Yüklem Tamponu (5X): 0.6 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 5 mL gliserol (%50), 2 mL %10'luk SDS, 0,5 mL β-ME (β- Merkaptotanol), 1000 µL %1'lik Bromfenol mavisi ve 0,9 mL saf su karışımından hazırlanmıştır.

SDS Jel boyama (Staining) Çözeltisi: 0,5 g CoomassieBrillant Blue R-250, 450 ml metanol içerisinde çözülüp filtre kâğıdından süzildükten sonra, karışımın üzerine 100 ml asetik asit ve 450 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır

Destaining Çözeltisi: 100 mLmetanol, 100 mL asetik asit ve 800 ml saf su karışımından hazırlanmıştır

Amonyum Persülfat (APS-%10): 0,1 g APS 1 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Parçalama Tamponu : 20nM tris-HCl, 10 nM İmidazol, 300nM NaCl pH 8,0 250 mL hazırlanmıştır.

Yıkama Tamponu: 20 nM Tris-HCl, 10 nM imidazol, 300 nM NaCl pH 8,0 250 mL hazırlanmıştır.

Elisyon Tamponu: 20 nM Tris-HCl,300 nM İmidazol, 300nM NaCl pH 8,0 250 mL hazırlanmıştır.

3.1.3. Kullanılan kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2:Kullanılan kimyasallar

KullanılanSarf	Kullanılan Sarf	Kullanılan Sarf
Agar	LB Broth Base	DMEM (Dulbecco'sModifiedEagleMedium)
Agaroz	EDTA	Fetal BovineSerum(FBS)
Tripton	DNA Ladder	MTT
Tris	DMEM	L-Glutamin
Potasyum Klorür	FBS	TRIzol
Sodyum Klorür	Tripsin-EDTA	Tripsin-EDTAçözültisi
Gliserol	L-glutamin	15 ve 50 ml'likEppendorftüpleri
Maya ekstrakt	Ampisilin	Kloroform
BSA	Monomer1	%10 Formaldehit çözeltisi
DMSO	Monomer2	Isolab lam ve lamel
DTT	Potasyum Asetat	Parafin
Metanol	Kalsiyum Klorür	Ksilen
Etanol	Potasyum Klorür	Distile Su
Endotoksin-FreePlazmid DNA Saflaştırma Kiti	Mangan Klorür	Kan Alma Tüpleri
Asetik Asit	Gliserol	50ml İdrar kapları
HCl	MTT	Ameliyat Eldivenleri
Puromisin	Brom Fenol Blue	Ketamin
Sodyum Dodesil Sülfat	96 kuyucuklu mikroplakalar	Ksilazin
6 kuyucuklu plakalar	Hücre kültürü flakaları (25 ve75cm ²)	Mikrotom Bıçakları

3.2. Yöntem

3.2.1. Yapılan çalışmanın özeti

Tez çalışmalarına başlamadan önce yara iyileşmesinde önemli bir etkisi olan TGF- β 3 proteini ve diyod lazer kullanacağımız için kromotofor özelliği olan sfGFP proteini içeren pET-22b (+) plazmid **6xHis-sfGFP-TEV-TGF- β 3** olacak şekilde ticari olarak temin edilmiştir (Novagen). Gelen plazmid ısı şok yöntemi ile *E.coli* B121 suşlarına aktarılmıştır. *E.coli* bakterilerinde proteinler rekombinant olarak üretilmiş ve saflaştırılarak alınmıştır. Etkinliğini ölçmek ve karşılaştırmak için ticari olarak TGF- β 3 proteini (Sigma) satın alınmıştır. Hücre kültürü çalışılacağından ve yara iyileşmesi üzerinde denemeler yapılacağı için insan deri fibroblast hücreleri (ATCC CRL2522; BJ Skin Fibroblast Human Lot: 70027151) ticari olarak temin edilmiştir. Üretilen

rekombinant ve ticari protein sitotoksik açıdan incelenmiş ve yara iyileşme çalışmalarında olası etkin dozları belirlenmiştir. Ardından *in vivo* çalışmalara geçilmiş ve oluşturulan sıçan gruplarında sırt bölgelerinde açılan yaralar, üretilen rekombinant protein ve ticari protein ile aynı zamanda da diyod lazer kullanılarak tedavi edilmeye çalışılmıştır. 14 günlük deney aşamasından sonra 50 hayvan sakrifiye edilerek kesi yarası yapılan dokular histolojik inceleme için sağlam doku etrafında olacak şekilde % 10'luk formaldehit çözeltisinin içine alınarak fiske edilmiştir. Histolojik basamaklar takip edilerek mikrotom yardımı ile yara bölgelerinin parafin kesitleri alınıp boyamalar yapılmış ve fotoğraflanmıştır. Elde edilen veriler kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.2. Biyoinformatik çalışmalar ve 6xHis-sfGFP-TEV-TGF- β 3 plazmidinin tasarımı

sfGFP(GenBank: ASL68970.1) ve insan TGF- β 3 (UniProtKB - P10600) proteinlerinin DNA dizileri, JCat codon optimization programı (<http://www.jcat.de/>) kullanılarak E. coli K12 organizması için optimize edilmiştir. Histidin kuyruğu (6x-His) ve sfGFP proteini TGF- β 3 DNA dizisinin 5' ucuna ilave edilmiştir. Ayrıca ihtiyaç duyulduğunda füzyon etiketini hedef proteinden uzaklaştırabilmek için 6xHis-sfGFP füzyonu ile TGF- β 3 arasına TEV proteaz tanıma bölgesi konulmuştur. 6xHis Tag, sfGFP, TEV proteaz tanıma bölgesi ve TGF- β 3 arasına esnekliği sağlayabilmek için 2 amino asitlik linker konulmuştur. Tasarlanan DNA dizisi pET-22b(+) vektörüne klonlanmış olarak Biomatik firmasından satın alınmıştır.

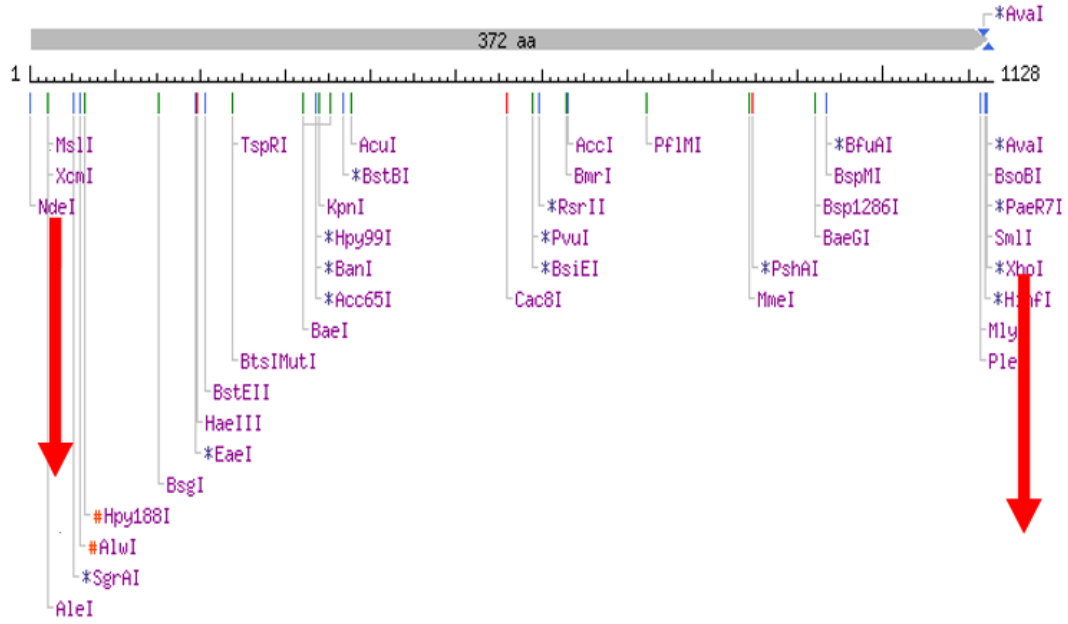
CATATG CACCACCACCACCAC GGTGGT TCTAAAGGTGAAGAACTGTTACCGGTGTTGTT
 CCGATCCTGGTTGAACTGGACGGTGACGTTAACGGTCACAAATTCTCTGTTTCGTGGTGAAGGT
 GAAGGTGACGCTACCAACGGTAAACTGACCCTGAAATTCATCTGCACCACCGGTAAACTGCCG
 GTTCCGTGGCCGACCCTGGTTACCACCCTGACCTACGGTGTTCAGTGCTTCTCTCGTTACCCG
 GACCACATGAAACGTCACGACTTCTTCAAATCTGCTATGCCGGAAGGTTACGTTTCAGGAACGT
 ACCATCTCTTTCAAAGACGACGGTACCTACAAAACCCGTGCTGAAGTTAAATTCGAAGGTGAC
 ACCCTGGTTAACCGTATCGAACTGAAAGGTATCGACTTCAAAGAAGACGGTAACATCCTGGGT
 CACAACTGGAATACAACCTTCAACTCTCACAACGTTTACATCACCGCTGACAAACAGAAAAAC
 GGTATCAAAGCTAACTTCAAATCCGTACAAACGTTGAAGACGGTCTGTTTCAGCTGGCTGAC
 CACTACCAGCAGAACACCCCGATCGGTGACGGTCCGGTCTGCTGCCGGACAACCACTACCTG
 TCTACCCAGTCTGTTCTGTCTAAAGACCCGAACGAAAAACGTGACCACATGGTTCTGCTGAA
 TTTGTTACCGCTGCTGGTATCACCCACGGTATGGACGAACGTACAAA GGTGGT GAAAACCTG
 TACTTCCAGGGT GGTGGT ATGGCTCTGGACACCAACTACTGCTTCCGTAACTGGAAGAAAAC
 TGCTGCGTTTCGTCCGCTGTACATCGACTTCCGTACAGGACCTGGGTTGGAAATGGGTTACAGAA
 CCGAAAGGTTACTACGCTAATTCTGCTCTGGTCCGTGCCCGTACCTGCGTTCTGCTGACACC
 ACCCACTCTACCGTTCTGGGTCTGTACAACACCCTGAACCCGGAAGCGTCTGCTTCTCCGTGC
 TGGCTTCCGCAGGACCTGGAACCGCTGACCATCCTGTACTACGTTGGTTCGTACCCCGAAAGTT
 GAACAGCTGTCTAACATGGTTGTTAAATCTTGCAAATGCTCTCTGGAATGACTCGAG

Şekil 3-2: Oluştulan Proteine ait DNA dizisi

Kodon ve restriksiyon enzimi optimizasyonu sonrası elde edilen sfGFP-TGF-β3 proteinine ait DNA dizisi şekil 3-2’de verilmiştir. Sarı renkli kısımlar restriksiyon enzimlerine (5’ ucunda NdeI ve 3’ ucunda XhoI), gri kısım sfGFP proteinine, kırmızı renkli kısım TGF-β3 proteinine ait DNA dizisini göstermektedir. Orta kısımda yer alan pembe ve gri yerler ise Tef Proteaz enzim tanıma bölgesidir. Optimize edilmiş DNA dizi, biyoinformatik kaynak portalı Expasy kullanılarak (<https://web.expasy.org/translate/frame1>) ifade ettiği amino asit dizisine çevrilmiş (Şekil 3-3), kodon ve restriksiyon enzim optimizasyonu açısından değerlendirilmiştir .

HMHHHHHGGSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGDATNGKLTCLKFICTGKLPVPWPTLVT
 LTYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSA MPEGYVQERTISFKDDGYTKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGN
 ILGHKLEYNFSHNVIYITADKQKNGIKANFKIRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSVL
 SKDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITHG MDELYKGGENLYFQGGG MALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDL
 GWKWWHEPKGYANFCSGPCPYLRSA DTTHTVGLYNTLNPEASASPCCPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQ
 LSN MVKSKCSLE-

Şekil 3-3: Oluşturulan amino asit dizisi



Şekil 3-4: Restriksiyon enzimler arasındaki düzenlenmiş dizi

Restriksiyon enzim optimizasyonu açısından gerçekleştirilen düzenlemeler, restriksiyon enzim analiz aracı olan NEBcutter (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) kullanılarak kontrol edilmiştir (Şekil 3-4).

3.2.3. FSB'li kompetant hücre hazırlanması

- 50 mL steril LB (LuriaBertani-LabM) besi yeri bulunan iki tane erlene gece inkübasyona bırakılan kültürden birer mL alınarak eklenmiş ve hücreler 37 °C ve 250 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.
- Optik yoğunluk, 600 nm'de absorbans yaklaşık olarak 0,7 olduğunda erlenler inkübatörden alınmış ve +4°C 5 000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Süpernatant atılmıştır. Pelet üzerine 50 mL soğuk FSB (dondurulmuş saklama tamponu) çözeltisi eklenmiştir. İyi bir şekilde vortekslenmiş ve sonrasında 1 saat buz banyosunda saklanmıştır.
- 1 saatin sonrasında; +4 °C, 4 000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Tekrardan süpernatant kısım atılmıştır. Pelet üzerine 8 mL soğuk FSB çözeltisi eklenmiş ve tüpe vurarak çözünme sağlanmıştır. Bu aşamada vorteks yapılmamıştır.

➤ Peletin tamamı çözününce üzerine 560 µL DMSO (Sigma) eklenerek, 3 saat buza gömülmüş. 3 saatin sonrasında kompetent hücre hazır hale getirilmiştir.(Sambrook ve Russell, 2006).

3.2.4. 6xHis-sfGFP-TEV-TGFβ3 Füzyon Proteininin Transformasyonu

6xHis-sfGFP-TEV-TGF-β3 taşıyan plazmid *E.coli* BL21 kompetent hücrelerine transformasyonu için aşağıdaki aşamalar uygulanmıştır

- -80 0C’de muhafaza edilen mikrosantrifüj tüplerinin içinde bulunan kompetent hücreler alınmıştır. Alt üst çevire çevire çözünmeleri ve homojenize olmaları sağlanmıştır. Bu aşamada vorteks yapılmamıştır.
- Steril mikrosantrifüj tüplerinin içerisine 200’er µLkompetent hücre konulmuştur.Her birinin üzerine de 0.5 µL plazmid DNA ilave edilmiştir Sonrasında 1 saat süre buz banyosunda tutulmuştur.
- 1 saat sonra buzdan çıkarılarak ve 2 dk 42 0C’de su banyosunda inkübe edilmiştir Sonrasında buza gömülerek 5 dk bekletilmiştir.
- Buzdan alınan ependorflara 300’er µL LB (antibiyotiksiz) eklenmiştir 37 0C’de 210 rpm de 30 dk inkübe edilmiştir.
- Yarım saatlik inkübasyonun ardından her bir tüp içeriği pipet ile seçici (antibiyotikli) LB-agara dökülerek sprader ile yayılmıştır. 1 gece boyunca 37 0C’de inkübe edilmiştir.

3.2.5. İnokülasyon ve Saflaştırma

LB Besiyeri hazırlama: 600 ml’lik dört erlen için LB hazırlanmıştır

Trypton	10 g	x 2.4 = 24 g	
Yeastekstrakt	5 g	x 2.4= 12 g	
NaCl	10g	x 2.4 = 24 g	2400 ml’de çözeltideki miktarlardır.

- 1 gece boyunca 370C’de seçici LB-agarda inkübe edilen tek bir kolonisi alınarak 4 mL ampisilinli LB’ye (100 µg/mL ampisilin içeren) inoküle edilmiştir. Besiyerinde ampisilin olmasının sebebi bakterimizin ampisiline dirençli olmasıdır. 37 0C’de çalkalayıcı inkübatörde 240 rpm’de bir gece bekletilmiştir.

- Yapılan işlemlerin hepsi steril ortamda ve bek alevi yanında yapılmıştır.
- İnkübatörde bulunan 4mL 'lik içerisine koloni bakterisi ekilmiş, LB besiyerinden stok için örnekler alınmış ve -80°C 'ye kaldırılmıştır.
- Hazırlanan ve steril halde bulunn LB besiyerinden 50 mL hazırlanmış, içerisine daha önceden 50 μL ampisilin eklenmiş ve stok attığımız -80°C 'de muhafaza ettiğimiz hücrelerden 8 mL içerisine aktarılmıştır.
- 240 rpm 37°C 'de inkübatöre bırakılmıştır
- 30 dk'da bir OD (optik dansite) değerine spektrometrede bakılmıştır (absorbans 600nm'de). İstenilen OD değeri 0.6'dır.
- Protein üretimi için 1:100 oranında 600 nm'de kültür absorbansı 0.6'ya ulaştığında hücreler, 1 mM'lik bir konsantrasyonda izopropil-1-tiyo-p-galaktopiranosid (IPTG) eklenerek indüklenmiştir.
- İndükleme işlemi yapılmadan önce 1000 μL örnek alınmış ve 15.000rpm de 2 dk santrifüjlenmiştir. Daha sonra 900 μL 'si uzaklaştırılmış ve üzerine 100 μL örnek tamponu konulmuş, vortekslenip 5 dk kaynatılmıştır. SDS-PAGE analizi için indükleme öncesi ve sonrası örnekler aynı şekilde hazırlanmıştır.
- Kültür, 37°C 'de ve 240 rpm'de 3 saat inkübe edilmiştir.
- Hücrelerin toplaması yapılacağından santrifüj tüplerinin kuru ağırlığı ölçülerek not edilmiştir.
- Hücreler daha sonra 10 dakika 8 000 rpm'de santrifüj edilerek toplanmıştır.
- Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet ağırlığı hesaplanmıştır. Sonraki saflaştırma adımı kullarılanı kadar -20°C 'de saklanmıştır.
- Islak pelet ağırlığı başına 5mL (20 nM Tris-HCl,10 nM imidazol, 300 nM NaCl pH 8.0) parçalama tampon çözeltisi ile resüspanse edilmiştir.
- Çalışma konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde 100 mM'lık PMSF ve Benzamidin ilave edilmiştir. 32,8 mg lizozim enzimide karışıma eklenmiştir.
- Cam beherin içinde buzlu su banyosunda sonikatör kullanılarak (BondelinSonoplus HD2070) 9 x 100 cycle'da 45 dk parçalama işlemi yapılmıştır.
- Parçalama sonrası 200 μL örnek alınmış ve örnek tampon eklenerek 5dk kaynatılmıştır.
- Daha sonra 6000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir.

- Bu işlemin ardından 30000 rpm'de 45 dk tekrar santrifüjlenmiş ve SDS için tekrar örnek alınmıştır. Santrifüjden çıkan pelet ve süpernatant kısmı ayrılarak kolon aşamasına geçilmiştir.
- Önce küçük bir kolon içerisine Ni-NTagaroz (Qiagen) 500 µL eklendikten sonra, kolon (20 mM Tris/HCl, 10 mM imidazol, 300 mM NaCl pH = 8) yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Santrifüj sonrasında alınan protein karışımı (süpernatant) kolona tatbik edilmiş ve kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplanmıştır. Protein yüklenmiş kolon 10 ml 100 mM Tris/HCl 10mM imidazol (pH = 7,5) tamponuyla yıkanarak kolonda tutunmuş diğer proteinlerin ayrılması sağlanmıştır. 400 µl 300 mM imidazol içeren, 100 mM Tris/HCl (pH = 7,5) tamponuyla kolona tutunmuş olan protein elde edilmiştir (10000 rpm de 2 dk santrifüj yapılarak elüsyonun verimliliği artırılmıştır)
- Saflaştırılmış sfGFP-TGF-β3 füzyon proteini, 4°C'de 100 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl tamponuna (pH 7.8) karşı gece boyunca diyaliz edilmiştir. Protein konsantrasyonu, 280 nm'de UV absorpsiyonu ile belirlenmiştir. Toplamda 1.5 mL 4.04 mg/mL protein elde edilmiştir.
- 20 mM pH 7.8 Tris-HCL 100 mM NaCl tampon Çözeltisinde 6 mL protein çözeltisi üzerine 2mL Gliserol ilave edilmiş ve böylece %25'lik gliserol stokları (0.77mg/ml) 150'şer µL'lik hacimler halinde -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.6. SDS-PAGE ile Proteininin Saflaştırılmasının Analizi

Toplanan her fraksiyondan alınan 100 µL'lik numuneler 100 µL jel yükleme tamponuyla karıştırılıp, (Elüsyon için 50 µL'lik numuneler 50 µL jel yükleme tamponuyla karıştırılmıştır) 100 °C'de 2 dakika denatüre edilerek önceden hazırlanan SDS PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) jelinin kuyucuklarına 25'er µL yüklenmiştir.. SDS-PAGE tamamlandıktan sonra distile su ile yıkanan jel sonrasında stain çözeltisi ile boyanmıştır. Boyanan jel destain ile iyice temizlendikten sonra bir tarayıcı ile (ChemiDoc İmaging Systems, Bio-Rad) taranarak dijital ortama alınmıştır.

3.2.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücrelerin Pasajlanması

- Tez çalışmasında kullanılmış olan BJ insan deri hücresi ATCC'den sipariş edilmiştir (CRL-2522)
- BJ hücrelerinin kültivasyonu DMEM HG (Dulbecco'smodifiedEagle'smedium, 4,5 g/L glikoz), besi ortamında %10 (v/v) inaktiffetal sığır serumu (FBS) ve %1 (v/v) L-glutamin desteği ile gerçekleştirilmiştir.
- Sıvı azot (-196 °C) içerisinde saklanan kriyotüpler çıkartılır çıkartılmaz, vakit kaybetmeden 37 °C'deki su banyosu içerisinde çözdürülmüştür. İçeriği çözünen kriyotüpbiyo güvenlik kabinine alındıktan sonra üzerine hazırlanan besi ortamı damla damla eklenmiş ve tüp içeriği dikkatlice toplanarak santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- Santrifüj tüpüne aktarılan hücreler 800 rpm (devir/dakika)'de 4 °C'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. Sonra süpernatant atılarak, pellet üzerine taze besi ortamı eklenerek homojenize edilmiştir.
- Homojenize edilen hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ içeren %95 nemli ortamda inkübe edilmiştir. Hücrelerin morfolojileri ters-faz ışık mikroskobu ile incelenmiştir ve hücrelerin besi ortamı iki günde bir değiştirilmiştir.%80-90 konfluensiye ulaşan hücreler pasajlanarak çoğaltılmıştır.
- Yapılan kontrollerde kültür yüzeyini %80-90 oranında kaplamış hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı uzaklaştırılmış ve 37°C'de ısıtılmış olan, steril Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen fosfat tamponu (PBS) ile hücrelerin yüzeyi yıkanmıştır.
- Daha sonra hücrelerin yüzeyden ayrılması için , hücrelerin üzerine 37°C'de tripsin –EDTA çözeltisi eklenmiştir. Hücreler 3-4 dk 37 0C'de %5 CO₂ içeren %95 nemli ortamda inkübe edilmiştir. Daha sonra üzerlerin besi ortamı eklenerek hücreler homojenize hale getirilmiş ve santrifüj tüpüne alınmıştır.
- 800 rpm (devir/dakika)'de +4°C'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Tekrardan süpernatant kısım uzaklaştırılmış vepellet üzerine taze besi ortamı eklenmiştir.

- Süspanse hale getirilen hücreler kültür kabına aktarılmıştır. Hücrelerin bulunduğu kültür kabı 37°C'de, %5 CO₂ içeren %95 nemli ortamda inkübasyona bırakılmıştır.
- Hücrelerin stoklanması için hücreler tripsinize edildikten sonra santrifüj edilen hücre pelleti üzerine hazırlanan dondurma ortamı (%90 (v/v) FBS, %10 (v/v) dimetilsülfoksit, DMSO) eklenmiştir ve hücreler kriyotüplere 1 mL hacimde olacak şekilde paylaştırılmıştır.
- Uygun etiketleme yapıldıktan sonra tüpler, gece boyu köpük kutu içerisinde -86 °C'de bekletildikten sonra ertesi gün hücreler, teorik olarak sonsuza kadar stoklanabilecekleri, -196 °C sıcaklığına sahip sıvı azot tankına kaldırılmıştır.

Hücre Canlılık/Proliferasyon testleri

- Kültür yüzeyini %80-90 oranında kaplamış hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra 37 °C'de ısıtılmış olan, steril Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen fosfat tamponu (PBS) ile hücrelerin yüzeyi yıkanmıştır.
- Daha sonra hücrelerin üzerine 37 °C'de tripsin –EDTA çözeltisi eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmıştır.
- Bu aşamada hücre sayısını hesaplamak için hücre süspansiyonundan 100µL mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
- +4 °C' 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelletinin besi ortamı içinde homojenizasyonu sağlanmıştır. Neubauer Lamı aracılığıyla hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

Hücre sayısı (h/ml)

$$= \frac{\text{canlı hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4}{\text{sayılan kare sayısı}}$$

- Daha önceki bölümlerde belirtilen laboratuvar stoklarından çözündürülerek kültüre edilmiş olan BJ hücre hatları 5×10⁴ hücre/mL konsantrasyonda olacak şekilde dört tekrarlı (n=4), olarak 96 gözlü kültür kaplarına alınmıştır.
- Hücreler %5 CO₂ içeren 37°C'deki nemli inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

- 24 saatlik inkübasyonun ardından hücreler üzerine saflaştırılmış rekombinant sfGFP-TGFβ3 füzyon proteini ve pozitif kontrol olarak ticari TGF-β3 (SRP3171-10UG) proteini 2ng/mL ve 10 ng/mLolarak eklenmiştir.
- Hücreler proteinler ile 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir.
- İki farklı pleyt planı oluşturulmuştur. Lazer tedavisi uygulanan ve uygulanmayan hücreler olarak ikiye ayrılmıştır. 96 kuyucuklu pleytte bulunan hücrelere 24. ve 48. saatlerde lazer tedavisi uygulanmıştır. Diğer grupta bulunan pleytlerdeki hücrelere lazer tedavisi uygulanmamıştır.
- Bu sürelerin sonunda MTT (3-(4,5- dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromid, sarı tetrazolyum tuzu) ile canlılık testi uygulanmıştır.
- MTT'nin mitokondriyal suksinat dehidrogenaz enzimi ile indirgenerek MTT-formazan kristallerine dönüşmesi temeline dayanan MTT testi, aslen mitokondriyal aktiviteyi ölçmesine rağmen dolaylı yoldan hücre canlılığının belirlenmesinde sıkça kullanılan bir yöntemdir (İspir ve ark.,2019).
- MTT testi için, pleytteki kullanılmış besi ortamı çekilmiş ve hücrelerin üzerine %10 MTT (5 mg/mL konsantrasyonda, PBS içerisinde hazırlanmış) içeren besi ortamı eklenmiştir.
- Hücreler karanlıkta 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 3 saat süre ile inkübe edilmiştir. 3 saat inkübasyonun sonunda MTT içeren ortamdan çekilmiş ve hücrelerin üzerine DMSO eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Formazan kristalleri çözündükten sonra pleyt, 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri bir mikropilaka okuyucu kullanılarak kaydedilmiştir. Hücre canlılığı, işlenmemiş hücrelerin yüzdesi olarak hesaplanmıştır.

Lazer verilen siyah 96 gözlü pleyt kabı ve planı

	NK		2ng/ml T		10ng/ml T		2ng/ml R		10ng/ml R	
	NK		2ng/ml T		10ng/ml T		2ng/ml R		10ng/ml R	
	NK		2ng/ml T		10ng/ml T		2ng/ml R		10ng/ml R	
	NK		2ng/ml T		10ng/ml T		2ng/ml R		10ng/ml R	

Şekil 3-5: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan lazer uygulanan pleyt şeması

Siyah pleytlere lazer uygulaması yapıldığı ve kuyucukların birbirine yakın olmasından dolayı hassas davranılmış ve yan kuyucuklar boş bırakılmıştır.

Lazer uygulanmayan şeffaf pleytler

	2ng/ml T	10ng/ml T	2ng/ml R	10ng/ml R	NK	
	2ng/ml T	10ng/ml T	2ng/ml R	10ng/ml R	NK	
	2ng/ml T	10ng/ml T	2ng/ml R	10ng/ml R	NK	
	2ng/ml T	10ng/ml T	2ng/ml R	10ng/ml R	NK	

Şekil 3-6: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan lazer uygulanmayan pleyt şeması

Lazer uygulanmayan şeffaf pleytlerde 4 tekrar çalışılmıştır ama pleytlerin kuyucukları arasında boşluk bırakılmamıştır.

Hücre Göçü (Rejenerasyon)

- Hücre göçü analizinde genel olarak *in vitro* çizik testi kullanılmaktadır. Bu test genel olarak geçerlilik kazanmış ve zaman maliyet açısından da oldukça avantajlıdır (Tayhan ve ark.,2021).

- BJ hücreleri 6 gözlü kültür plakalarına ekilmiş ve hücrelerin %80-90 konfluensiye gelmesi beklenmiştir. Her pleytten ikişer tane hazırlanmıştır ve canlılık testinde olduğu gibi iki grup oluşturulmuştur. Gruplardan birine lazer tedavisi uygulanmıştır ve diğerine lazer tedavisi uygulanmadan takibi yapılmıştır.
- Belirtilen konfluensideki hücrelerin üzerine steril P200 pipet ucu ile bir çizik oluşturulmuştur ve *in vitro* çizik tahlili için BJ hücreleri saflaştırılmış rekombinant sfGFP-TGF-β3 füzyon proteini ve pozitif kontrol olarak ticari TGF-β3 (SRP3171-10UG) proteini 2ng/mL ve 10 ng/mL konsantrasyonlarında besi ortamı ile inkübasyona bırakılmıştır.
- Hücreler proteinlerle 48 saat kültüre edilmiş ve her 24 saatte bir inverted mikroskop altında fotoğraflanmıştır. 48 saat sonunda görüntüler, Image J yazılımı aracılığıyla analiz edilmiş ve % migrasyon oranları alansal olarak hesaplanmıştır. Elde edilen kantitatif değerler negatif kontrolle oranlanarak ve % migrasyon oranları, GraphPadPrism 9.0.0 programıyla grafiklendirilmiştir (Tayhan ve ark.,2018).

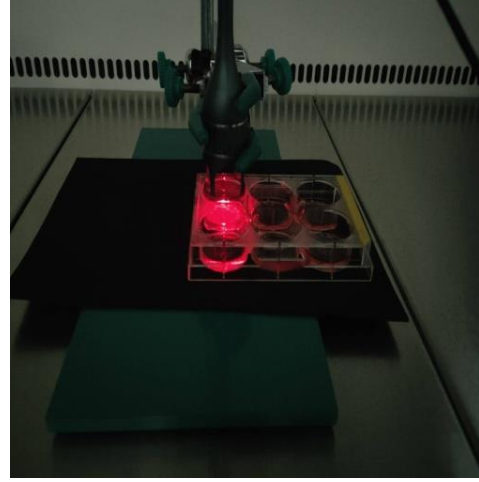
Pleyt planları

2ng/ml T	10ng/ml T	NK
2ng/ml T	10ng/ml T	NK

2ng/ml R	10ng/ml R	NK
2ng/ml R	10ng/ml R	NK

Şekil 3-7: Çizik testi çalışmalarında kullanılan pleyt şemaları

Lazer verilen ve verilmeyen toplam 4 pleyt oluşturulmuştur. 24. saat ve 48 saat periyotlarında lazer uygulama yapılmıştır. Kullanılan lazer Solase lazer cihazı olup uygulaması mobil iletişim aracına yüklenip cihaz yazılımında yüklü “wound healing” protokolünde 60 s her kuyucuğa karanlık bir ortamda uygulanmıştır. Her uygulama sonrası bütün pleytlerin fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 3-8: Diyod lazer ve uygulanma şekli

3.2.8. Hayvan Deneyleri ve Histolojik çalışmalar

Bu çalışmada yer alan in vivo araştırmalar Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı ve Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hayvan Deneyleri Araştırma Biriminde (DETAB) yapılmıştır. Çalışmanın etik onayı, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan alınmıştır (2022 HADYEK-33). Çalışmada kullanılan 50 adet Wistar albino cinsi sıçanlarda, DETAB'dan sağlanmıştır. Deney çalışması 5 grup olarak oluşturulmuştur. 50 adet Wistar albino cinsi sıçanlar karışık cinsiyette çalışmada kullanılmıştır. Toplam hayvan sayısının sınırlı olması sebebi ile hayvan sayıları gruplara minimum sayıda ve yapılacak istatistiksel analizlerin anlamlı olmasına yetecek kadar dağıtılmıştır.

1. Kontrol Grubu: Hiç bir işlem yapılmamıştır. Rast gele 5 hayvan konulmuştur.
2. Kesi grubu: Deney hayvanları uyutulmuş 0,3x 3 cm oranında sırt kısmından kesi oluşturulmuş ve iki günde bir fotoğraf çekilmiştir. 7 adet hayvan bu gruba konulmuş ve iki günde bir yara kısmına bir iki damla serum fizyolojik sıvı damlatılmıştır.
3. Tedavi 1 grubu; lazer grubu olarak da isimlendirdiğimiz bu grupta 10 adet hayvan konulmuştur. Sadece dental diyod lazer tedavisi 0,3x3 cm oluşturulan yaraya 2 günde 1 uygulanmıştır
4. Tedavi 2 grubu; 14 adet hayvandan oluşan gruptur. Sadece sfGFP-TGF- β 3 füzyon proteini oluşturulan 0,3x3 cm kesiye 2 günde bir topikal olarak uygulanmıştır. Bu grupta kullanılan protein rekombinant olarak üretilmiş

proteindir. Karşılaştırmak amaçlı ticari aldığımız TGF- β 3 proteinini de 3 adet hayvanda uygulanmıştır.

5. Tedavi 3 grubu: Oluşturulan 0,3x3 cm kesiye hem sfGFP-TGF- β 3 füzyon proteini hem de dental diyod lazer iki günde bir uygulanmıştır. Hayvan sayısı 14 olan bu grupta da rekombinant olarak üretilen proteinin etkisi ticari olarak alınan protein ile karşılaştırılmak amacı ile 3 adet hayvanda ticari TGF- β 3 proteini uygulanmıştır.

Yapılan literatür çalışmalarında TGF- β 3 proteini 500ng/100 ml, 200ng/100 ml, 50ng/100mL, 6000ng/100 mL olarak uygulandığı, Young ve arkadaşlarının 200ng/100 mL olarak insan skar dokusu çalışmalarında olumlu sonuçlar aldığı ve bu uygulamalardan en iyi sonucun 200 ng/100 mL olduğu anlaşıldığından (Young ve ark.,2009) yapılan *in vivo* deneyde üretilen TGF Beta-3'ü 200 ng/100 mL oranında uygulanmıştır. Söz konusu doz bu çalışmada gerçekleştirilen *in vitro* analizlerinde belirtilen etkin doz ile de uyumluluk göstermektedir.

Gruplar oluşturulup deneye başlanıldığında 1.kontrol grup hariç bütün hayvanlar i.p olarak verilen 30 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin ile derin anestezi yapılarak sırt kısımlarında önce traş edilmiş ve 0,3x3 cm'lik kesi yarası metal makas ile oluşturulmuştur. Oluşturulan gruplara göre her hayvan farklı kafeslere konulmuştur. Oluşturulan yaraları aynı kafeslere konulan gruptaki sıçanların yeme yalama yada kopartma olasılığını ortadan kaldırmak için her hayvan farklı kafese konulmuştur. Kafeslerde hayvanların yemesinde yada içmesinde herhangi bir kısıtlama yapılmamıştır. Bütün uygulamalar Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi DETAB laboratuvarlarında yapılmıştır. Kesi oluşturma işlemleri ve kafesleme bittikten sonra 1. ve 2. Gruba hiç bir işlem yapılmazken 3.Tedavi grubuna diyod lazer, 4.tedavi grubuna ve 5. Tedavi grubuna Hem diyod lazer hemde sfGFP-TGF- β 3 füzyon proteini uygulanmıştır. Tedavi gruplarına protein ayarlı pipet ile 200ng/100 ml oranında verilmiştir. Biyomühendislik Anabilim Dalında mevcut olan Diyod lazer (LZ/SMS-SOLASE ver 1.0) çeşitli klinik uygulamalarda rutinde kullanılmakta olan bir cihazdır. Bu uygulamalar 2 günde bir yapılmış ve oluşturulan yaralar fotoğraf çekimi ile izlenmiştir. 7. gün tüm grupta bulunan hayvanların yarısı sakrifiye edilip yara kısımları sütur edilmiştir. Sütur edilen kısımlar

%10 'lük formolün içinde muhafaza edilmiştir. Canlı hayvanlara tekrardan aynı işlemler iki günde bir yapılmış ve fotoğrafları çekilmiştir. 14. Günün sonunda bütün hayvanlar sakrifiye edilerek yara kısımları % 10'luk formolde muhafaza altına alınmıştır.

Deney hayvanlarına uygulanan her türlü işlem öncesi fotoğraf çekme de dahil acı çekmemeleri için anestetik madde (30 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin) uygulanmıştır. Alınan örnekler %10'luk formolün içinde grup grup toplanıp tespit edilmiştir.



Şekil 3-9:Ratların sırtlarında yara oluşturma ve diyod lazer uygulama

Parafin Bloklama

Tespit edilen dokular bir gece yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Gerekli düzenek kullanılarak dokular karanlık bir ortamda bir gece akarsu altında yıkamaya bırakılmıştır. Çalışılan dokular deri olduğu için yapılan işlemler diğer dokulardaki protokollerle kıyaslandığında biraz daha uzundur. Yıkamadan sonra sırası ile %70, %80, %90, %99'luk alkollerde birer gece bekletilmiş ve dokulardaki suyun giderilmesi sağlanmıştır. Daha sonra alkolden çıkartılan dokular trimleme yapılarak şeffaflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Birer saat ksilol içerisinde bekletilen dokular etüv içerisinde sıvı parafin içine bırakılmıştır. Parafin içerisinde 2 gece bekleyen dokular 2 gecede dışarıda bekletilmiştir. Bu işlem birkaç defa yapılmıştır. Böylelikle parafinin deri dokusunda her yere nüfus etmesini ve boşlukları tamamıyla doldurması beklenmiştir. Bu işlemlerin ardından hazırlanan havuzcuklara her bir grup parafin bloklar halinde gömülmüştür.



Şekil 3-10:Havuzcuklar ve Parafin Bloklar

Kesitlerin Elde Edilmesi ve Üçlü Boyama

Çalışmaya dahil edilen doku örnekleri tespit edilip yukarıda belirtilen rutin histolojik doku takibinden geçirildikten sonra bloklanıp mikrotom (Leica SM 2000R) ile 4-5 μ m kalındığında seri kesitler alınarak lamlara alınmıştır.



Şekil 3-11:Mikrotom ve su ocağı

Parafin bloklardan 4-5 μ m kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alınmıştır. Üçlü boyama protokolu olduğu gibi kesitlere uygulanmıştır.

Tablo 3: Üçlü boyama protokolü

1. Ksilen	5dk (3 değişim)
2. %100 Alkol	4dk (2 değişim)
3. %96 Alkol	3-5dk
4. %80 Alkol	3-5dk
5. %70 Alkol	3-5dk
6. Distile suda beklet	1dk
7. Weigert hematoksilen	8-10dk
8. Akan suda yıka	5 dk
9. Distile suya daldır-çıkar	2 kez
10. Asit fuksin	1dk
11. Distile suya daldır-çıkar	2 kez
12. Fosfotungstik asit	10 dk (bağ doku beyazlaşana kadar
13. Distile suya daldır-çıkar	2 kez
14. Toludin mavisi	Daldır Çıkart
15. Distile suya daldır-çıkar	2 kez
16. %80 Alkol daldır-çıkar	
17. %96 Alkol daldır-çıkar	
18. %100 Alkol	5dk
19. %100 Alkol	10dk (ksilene girmeden biraz beklet)
20. Ksilen	5dk
21. Ksilen	5-10dk
22. Ksilen	1 saat
23. Entallan ile kaplama	

Asit fuksin-Oranj G solusyonu

Asit fuksin	0,7 g
Oranj G	0,3 g
Distile su	200 cc
Timol	0,13 g
Asetik asit	2 cc

Asit fuksin ve orange G gibi sülfonlanmış boyalar, proteinlerin bazik gruplarına kuvvetli affinitesi vardır. Kuvvetli differansiyasyon isteyen güçlü bağlar oluşturarak proteinlerle bağlanırlar.

Weigert'in Hematoksilen solusyonu

Solusyon A

Hematoksilen kristal	1 g
% 95 Alkol	100 cc

Solusyon B

Demir III klorür	1 g
Hidroklorik Asit	1 cc
Distile su	99 cc

Weigert' in demirli hematoksileni kullanıldığında, demiyelinizasyon alanları ayırt edilebilir.

Fosfotungstik Asit solusyonu

Fosfotungstik Asit	3 g
Distile su	100 cc

Asetik Asit solusyonu

Asetik Asit	2 cc
Distile su	100 cc

Hemaotoksilen-Eozin Boyama

Mikrotomdan alınan kesitler bir gece etüvde bekletilmiştir. Dokuda bulunan parafin uzaklaştırılmıştır. Daha sonra aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

Tablo 4:Hemaotoksilen-Eozin boyama protokolü

1. Ksilen	30 dakika (4 x 7,5 dk)
2. % 99,5'lik Alkol	5 dakika
3. % 96'lık Alkol	5 dakika
4. % 80'lik Alkol	5 dakika
5. % 70'lik Alkol	5 dakika
6. Distile Su	5 dakika
7. Hematoksilen	10 dakika
8. Distile Su	5 dakika
9. Akar Su	Renk eflatuna dönene kadar
10. Eozin	1-2 saniye
11. Distile Su	5 dakika
12. Akar Su	Lamdan boya çıkana kadar
13. Distile Su	5 dakika
14. % 70'lik Alkol	5 dakika
15. % 80'lik Alkol	5 dakika
16. % 96'lık Alkol	5 dakika
17. % 99,5'lik Alkol	5 dakika
18. Ksilen	5 dakika
19. Ksilen	5 dakika
20. Ksilen	5 dakika
21. Ksilen	uzun süre kalabilir
22. Entellan ile kapama	

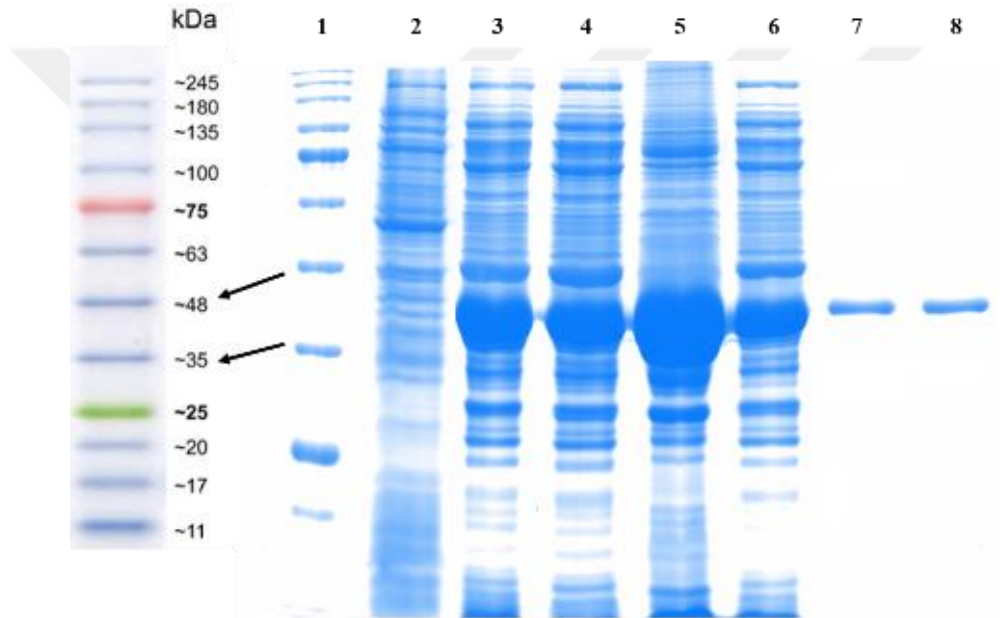
Fotoğraflama

Üçlü boyama ve Hematoksilen-Eozin boyama sonucunda hazır hale gelen preparatlar Leica ve Nikon markalı mikroskop altında incelendi ve yara alanlarının fotoğraflaması yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1.SDS-PAGE ile Proteininin Saflaştırılmasının Analizi

sfGFP -TGF- β 3 füzyon proteininin ekspresyonu SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Çalışma sonunda sfGFP -TGF- β 3 füzyon proteininin çözünür formda üretildiği ve yüksek saflıkta elde edildiği görülmüştür.

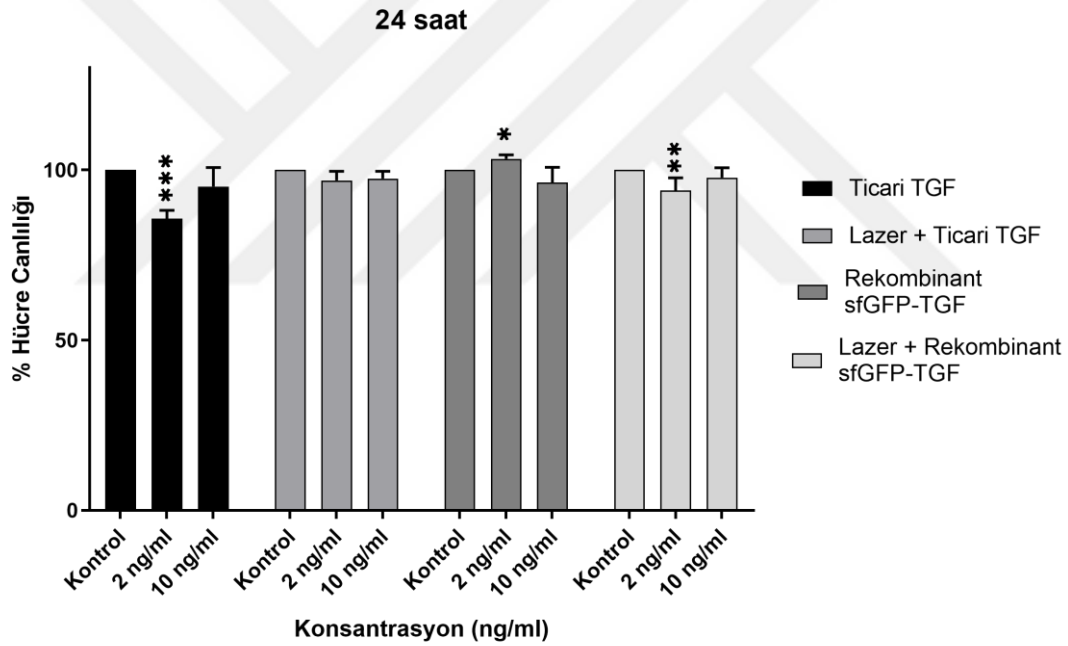


Şekil 4-1:Rekombinant sfGFP-TGF- β 3'ün jel görünümü (1. İşaretleyici (GoldBioBLUEstain™ Protein merdiveni) 2. IPTG ilavesinden önce bakteriyel hücre lizatları, 3. IPTG ilavesinden sonra bakteri hücre lizatları 4. Lizatın santrifüjlenmesinden sonra toplanan pelet 5. Lizatın santrifüjlenmesinden sonra toplanan süpernatant, 6. Akış- aracılığıyla (Ni-NTA Agaroz sütunundan sonra), 7-8. Elüsyonlar.)

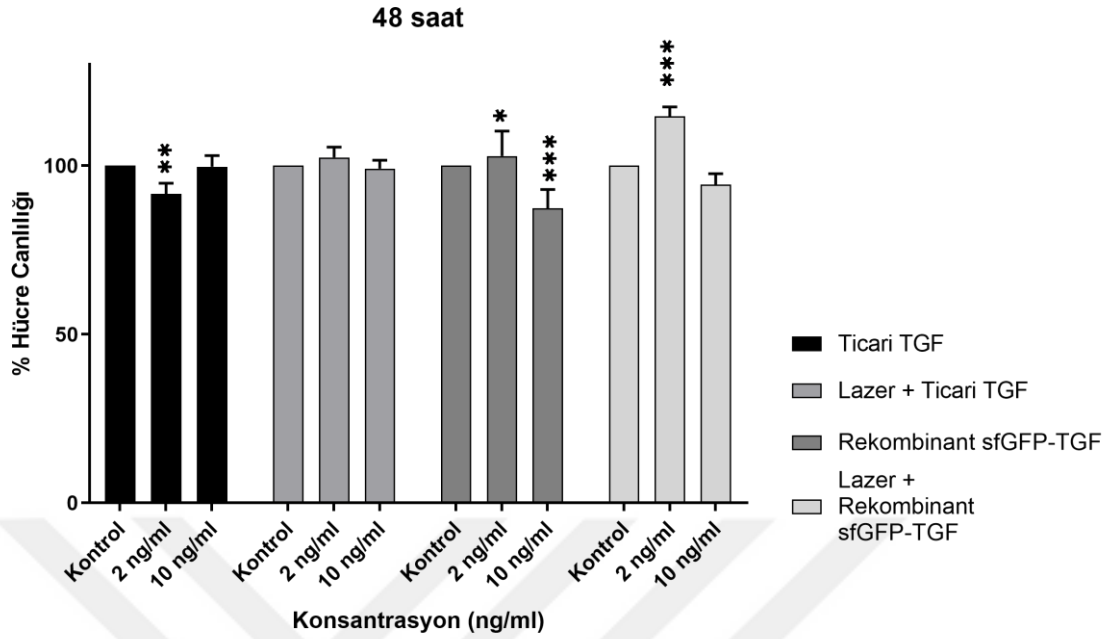
sfGFP -TGF- β 3 füzyon proteininin moleküler ağırlığı ve molar absorpsiyon katsayısı “ExPASyProtParam aracı” kullanılarak sırasıyla 41876.26Da ve 43945 M⁻¹cm⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Daha sonra UV spektrofotometrede 280 nm’de absorbans ölçülerek saflaştırılmış rekombinant proteinin toplam verimi 4.04 mg/ml olarak belirlenmiştir. SDS-PAGE analizi ile rekombinant proteinin deneysel olarak belirlenen moleküler ağırlığı, hesaplanan moleküler ağırlığa çok yakın olduğu jel görüntüsünden de anlaşılmıştır.

4.2.Hücre Canlılık Testi

Rekombinant olarak üretilen sfGFP - TGF- β 3 proteininin toksik olup olmadığını anlamak ve ileriki basamaklarda gerçekleştirilecek *in vivo* analize dayanak olacak sonuçları elde edebilmek için BJ hücreleri üzerinde MTT testi bir önceki bölümde anlatıldığı gibi yapılmış ve ortaya çıkan grafikler şekil 4-2 ve 4-3'de gösterilmiştir. Çalışmada 2 ve 10 ng/mL olmak üzere iki farklı doz test edilmiştir. Rekombinant olarak üretilen proteinin yanında ticari olarak temin edilen ürün de denenmiş ve elde edilen veriler birlikte değerlendirilmiş, karşılaştırmalar yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak ticari TGF- β 3 proteinini kullanılmıştır.



Şekil 4-2: 24 saat sonrası hücre canlılık oranı [Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. (*** $P \leq 0.0005$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ vs Kontrol)]



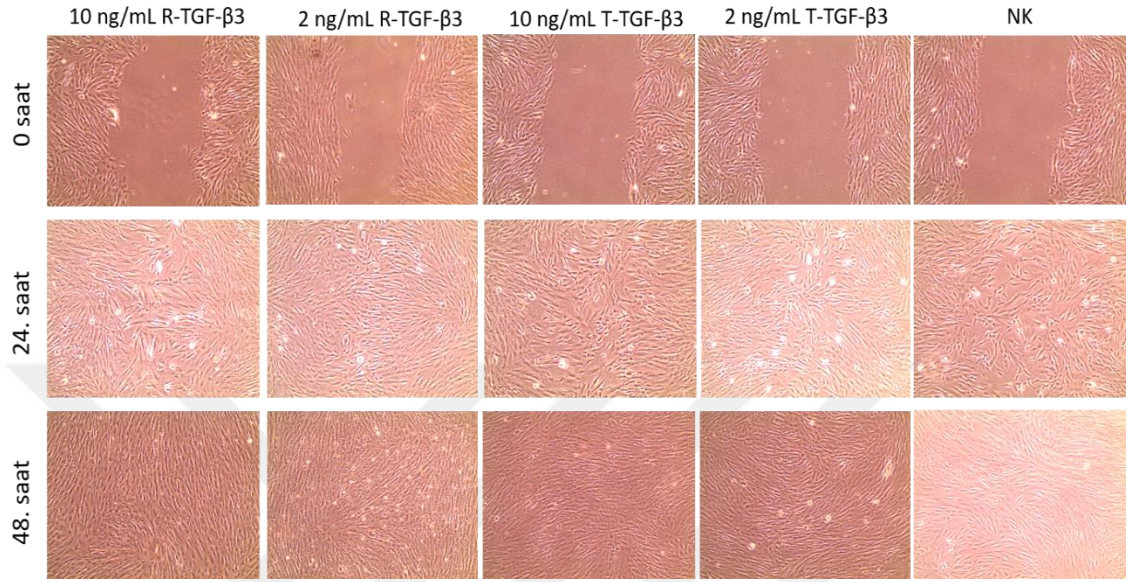
Şekil 4-3: 48 saat sonrası hücre canlılık oranı [Sonuçlar Two-way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. (***) $P \leq 0.0005$, (**) $P \leq 0.01$, (*) $P \leq 0.05$ vs Kontrol)]

Çalışmalar sonucunda rekombinant olarak üretilen proteinin proliferasyona etkisinin çok fazla olmadığı ama toksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. 48. saat sonrasındaki grafiğe bakıldığında en iyi sonucu 2ng/mL dozaj uygulanan ve aynı zamanda lazer işlemi yapılan hücrelerin vermiş olduğu görülmüştür. Uygulanan diğer dozajlarda hücre canlılık testinde olumlu sonuç vermiş ve toksik etki oluşturmadığı kanısına varılmıştır. İlgili sonuçlar grafiklerde istatistiki değerlendirmeleri ile birlikte gösterilmiştir.

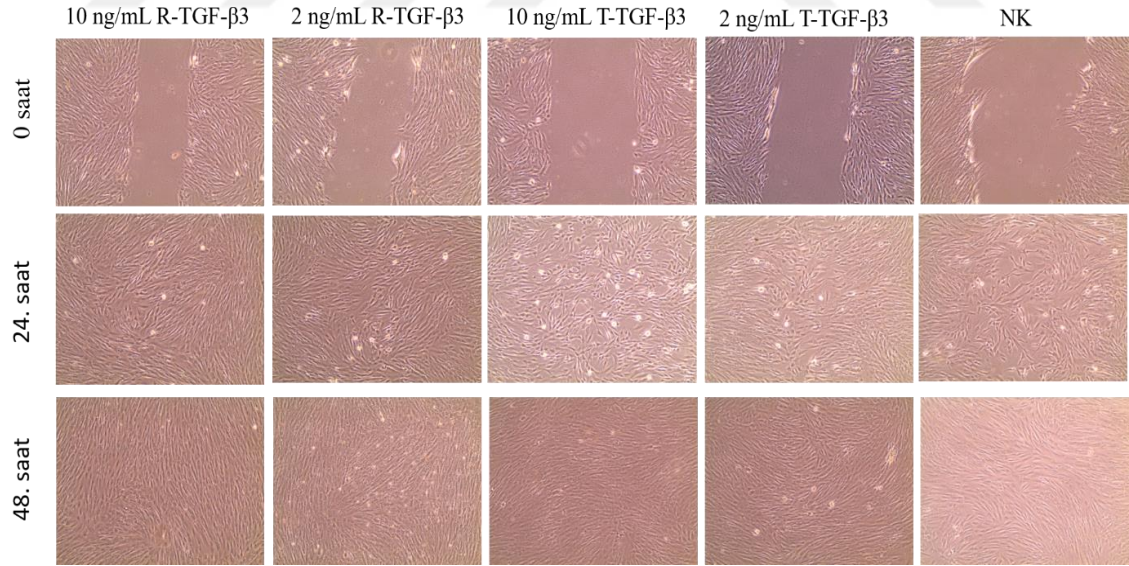
4.3.Hücre Göçü (Rejenerasyon / Yara İyileşme Testi)

Daha önce canlılık testinde açıklanan MTT analizinde hesaplanan 24. ve 48. saat EC50 değerleri dikkate alınarak hücre göçü (rejenerasyon) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizde genel geçerlilik gören, zaman ve maliyet açısından oldukça avantajlı bir yöntem olan in vitro çizik testi kullanılmıştır. Hücreler ilgili bileşenlerle 48 saat kültüre edilmiş ve her 24 saatte bir inverted mikroskop altında fotoğraflanmıştır. 48 saat sonunda görüntüler, Image J yazılımı aracılığıyla analiz edilmiştir ve % migrasyon oranları alansal olarak hesaplanmıştır. Lazer verilen ve verilmeyen toplam 4 pleyt oluşturulmuştur. 24. Saat ve 48. saat periyotlarında lazer uygulama yapılmıştır. Kullanılan lazer solase lazer cihazı olup uygulaması mobil iletişim aracına yüklenmiş ve WoundHealing protokolünde

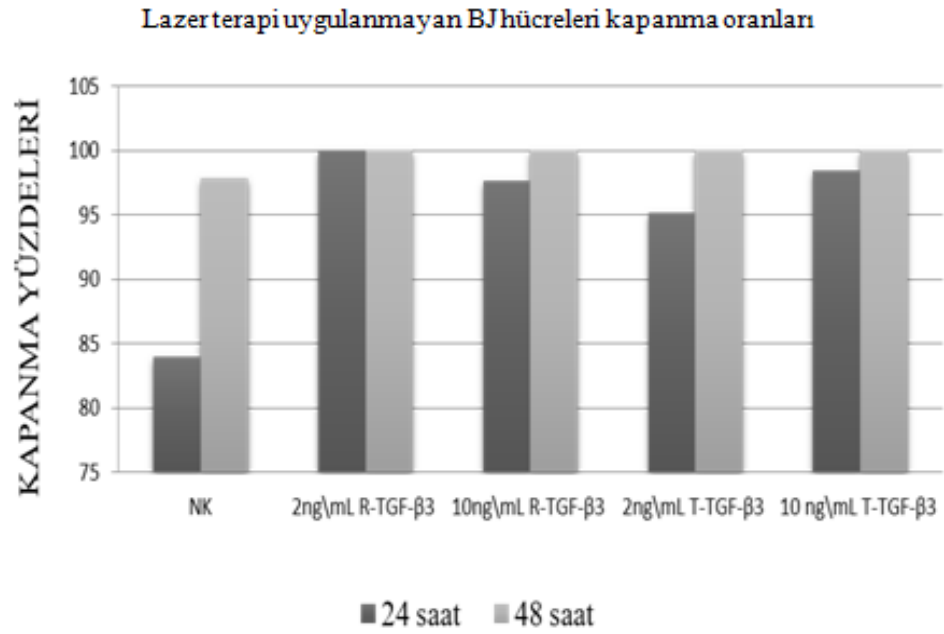
60 s her kuyucuğa uygulanmıştır. Her uygulama sonrası bütün pleytlerin fotoğrafları çekilmiştir.



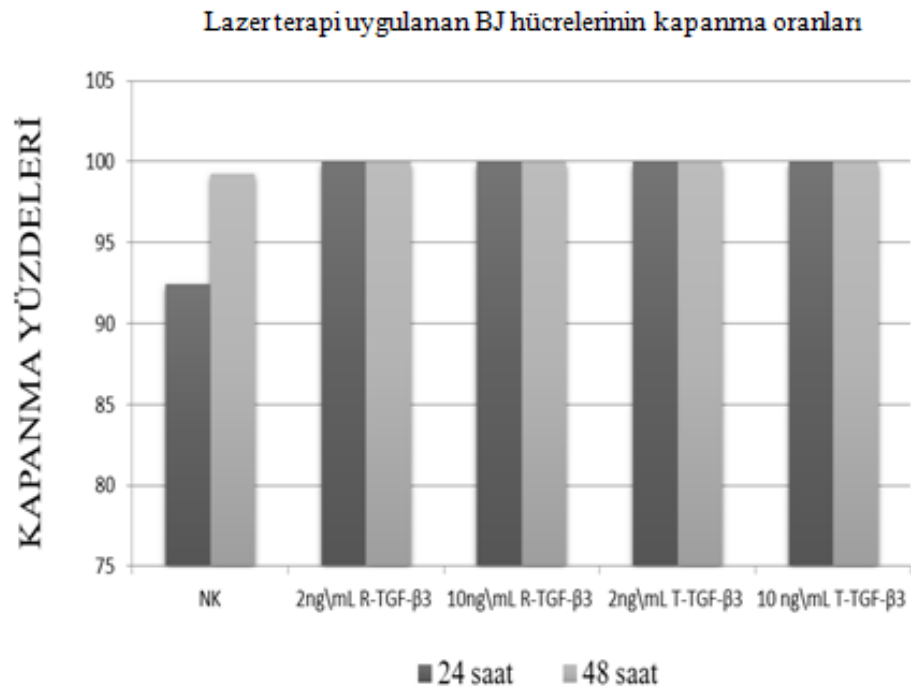
Şekil 4-4: Lazer terapi uygulanmayan BJ hücreleri (NK negatif kontrol 4x büyütme)



Şekil 4-5: Lazer terapi uygulanan BJ hücreleri (NK negatif kontrol 4x büyütme)



Şekil 4-6: 24 ve 48. Saat lazer uygulanmayan hücrelerin yara iyileşme grafiği



Şekil 4-7: 24 ve 48.Saat lazer uygulanan hücrelerin yara iyileşme grafiği

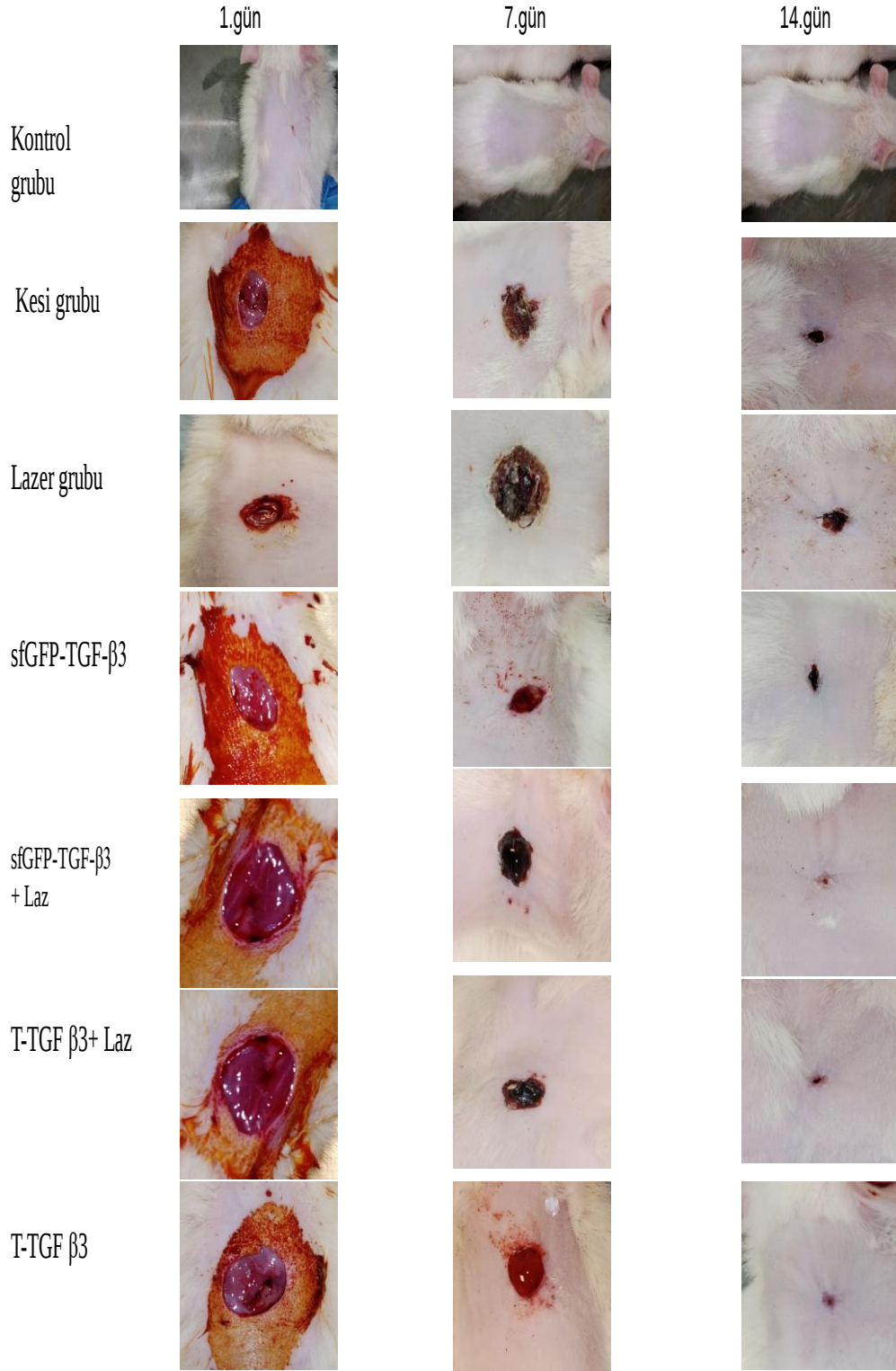
24. saat sonunda elde edilen veriler incelendiğinde lazer terapi uygulanmayan BJ hücrelerinin çizik olarak oluşturulan yüzeyde yara bölgesine göç ettiği; ancak, açık bölgeyi tamamen kapatmadığı, lazer terapi uygulanan gruplarda oluşturulan yara alanının ise tamamen kapandığı görülmüştür (Şekil 4-4, 4-5).

48. saat sonunda elde edilen verilere bakıldığında çizik yara alanı oluşturulan BJ hücrelerinde lazer terapi uygulanan ve uygulanmayan pleytlerde yara alanlarının tamamen kapandığı görülmektedir. Yapılan incelemelerde lazer terapi uygulanan yara alanlarının hücre yoğunluğunun lazer terapi uygulanmayan kapanan yara alanlarından daha fazla olduğu görülmektedir. Yapılan çalışma sonucunda lazer terapi uygulanan BJ hücrelerinin daha çabuk rejenere olduğu ve verilen lazerin toksik etki oluşturmadığı belirlenmiştir. Rekombinant olarak üretilen sfGFP-TGF- β 3'ün uygulandığı hücrelerde yara kapanma oranının negatif kontrole göre de daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4.4. In vivo Çalışmalar

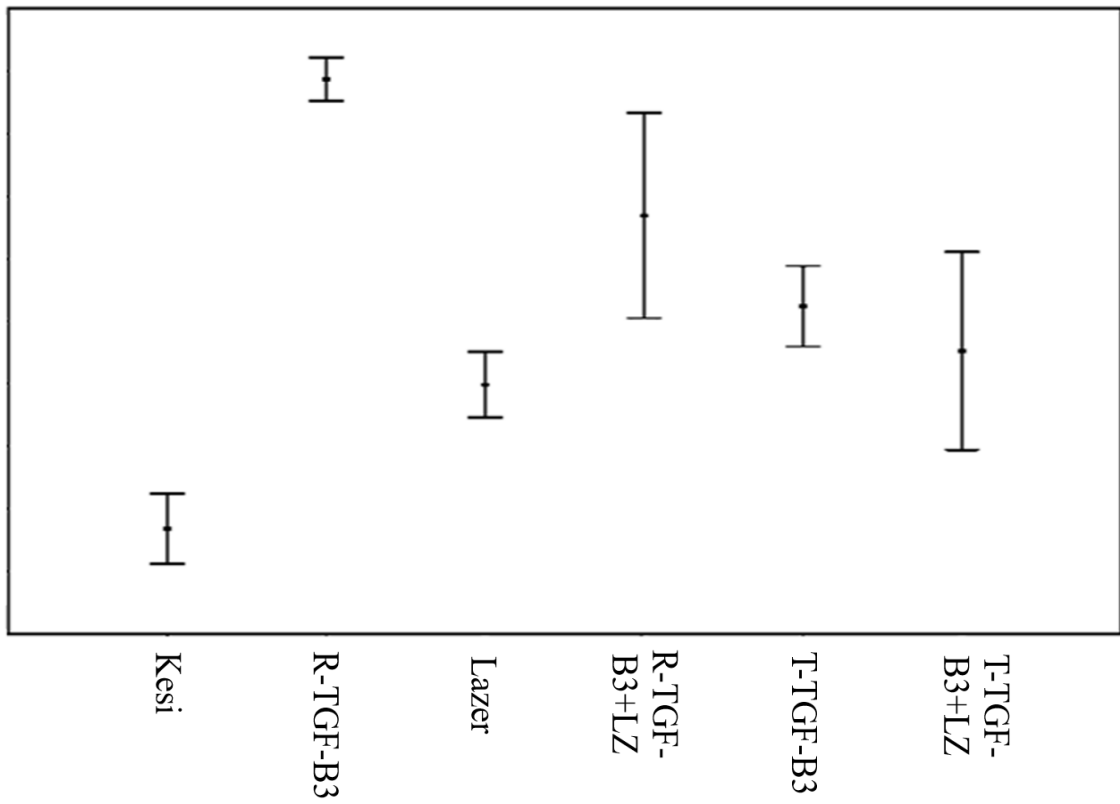
Rekombinant protein üretimi ardından yapılan hücre kültürü çalışmaları ile gerçekleştirilen yara iyileşme analizleri sonucunda elde edilen verilerin ışığında in-vivo deneylere geçilmiş ve çalışma 5 hayvan grubu ile tasarlanmıştır. Toplam hayvan sayısının sınırlı olması sebebi ile hayvan sayıları gruplara minimum sayıda ve yapılacak istatistiksel analizlerin anlamlı olmasına yetecek kadar dağıtılmıştır. Materyal metod bölümünde anlatılan şekilde işlemler sıçanlara uygulanmıştır. Bütün uygulanan işlemlerin öncesinde hayvanların acı çekmemesi için anestezi madde uygulanmıştır.

Yapılan işlemler sonrasında yani 1,3,5,7,9, 11 ve 14. gün sonlarında bütün hayvanların sırtlarında oluşturulan yaralar fotoğraflanmış ve iyileşmeleri incelenmiştir. Fotoğraflanan yara alanları Image J yazılımı aracılığıyla ölçülmüştür. Her bir fotoğraf 3 tekrardan ölçülüp gruplar olarak kayıt edilmiş ve iyileşme eğrileri grafiklere dökülmüştür.



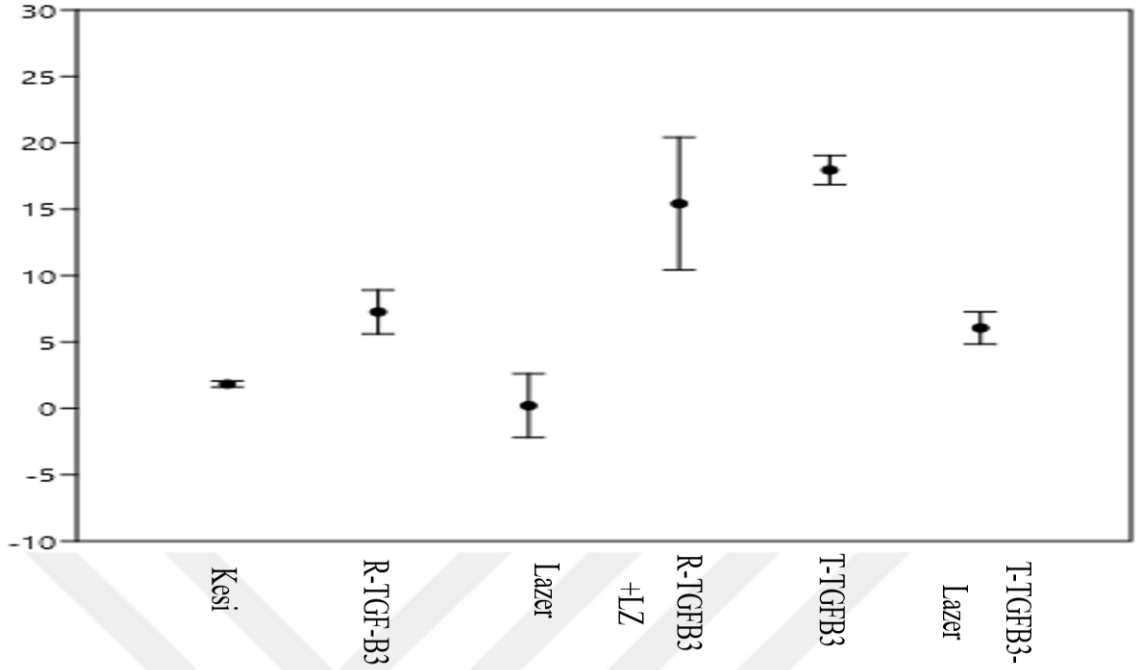
Şekil 4-8: Farklı zamanlarda yara alanı iyileşme fotoğrafları

In vivo yara çalışmalarında standart kesi oluşturmak oldukça zordur. Bunun sebebi ise sıçan derisinin esnek olmasından dolayı kesilmeye karşı dirençli olmasıdır. Bu nedenle oluşturulan yara alanlarının gruplar arası aynı olup olmadığını ANOVA testi ile incelenmiştir. Yapılan testin sonucunda kesik alanlarının gruplar arasında aynı olmadığı azda olsa farklılıkların olduğu tespit edilmiştir. (F: 5,691; P <0.05; Bayes Faktörü: 31,34, (Şekil 4-9)). Oluşturulan yara alanlarının aynı olmamasından ötürü sonrasında yapılacak olan karşılaştırmalarda gruplar olarak yüzdesel iyileşme oranı üzerinden verilecektir.



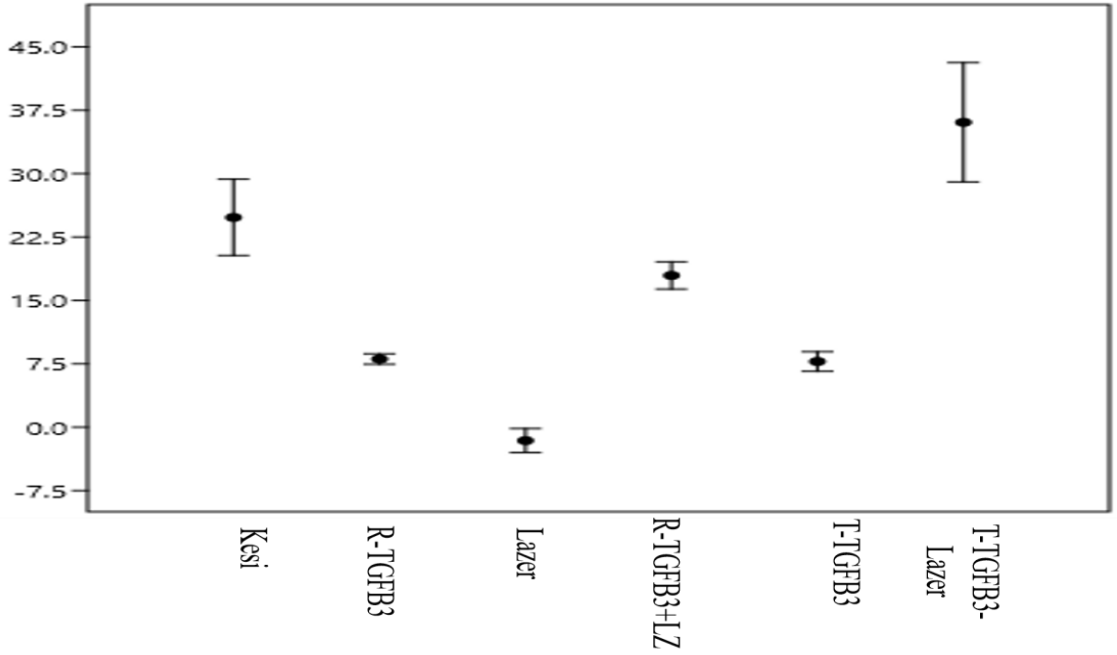
Şekil 4-9: Kesi alanlarının karşılaştırılmasını gösteren grafik

1 ve 3. Gün ölçümlerinin iyileşme oranları gruplar arsında yapılan karşılaştırmaya göre iyileşme oranları birbirinden farklılık göstermektedir (F:8,28 ; P<0.05 ; BF : 274,5)



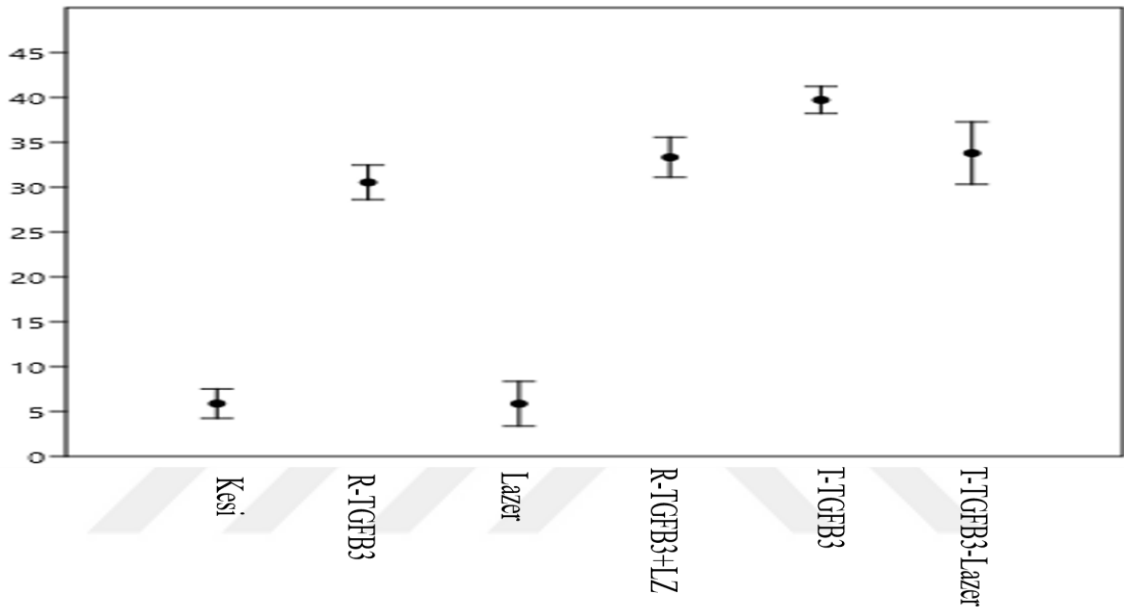
Şekil 4-10: 3-1 gün iyileşme oranları

Şekil 4-10'da 3-1. Gün iyileşme oranlarına bakıldığında küçükten büyüğe doğru sırası ile Lazer < Kesi < T-TGF-β3+LZ < R-TGF-β3 < R-TGF-β3+LZ < T- TGF-β3 olarak sıralanmıştır. Lazer grubu en az iyileşme yüzdesini gösterirken, T- TGF-β3 grubu en fazla iyileşme yüzdeliğine sahiptir.



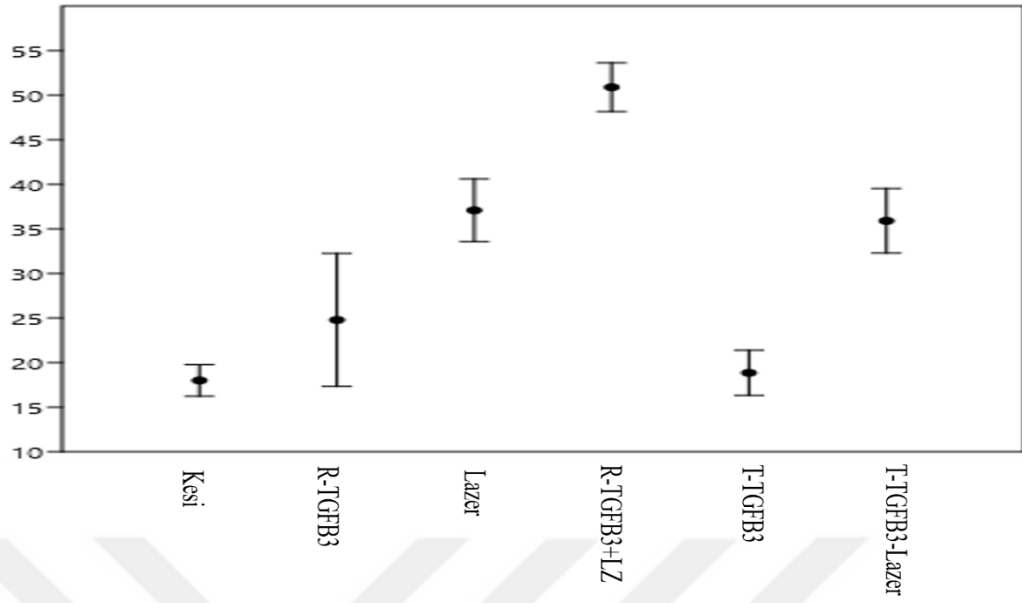
Şekil 4-11: 3-1 gün iyileşme oranları

Ve 3. Gün iyileşme yüzdeliklerine bakıldığında iyileşme oranlarında ki farklılıklar devam etmektedir (F:14,47; P < 1,402E-06 ; BF: 1,684E04). Şekil 4-11’de elde edilen grafikte yüzey alanı iyileşme grupları küçükten büyüğe doğru sırası ile Lazer < T- TGF- β 3 < R-TGF- β 3 < R-TGF- β 3 +LZ < Kesi < T- TGF- β 3 +LZ ‘dir. Lazer grubu en az iyileşme yüzdesini gösterirken, T- TGF- β 3+ LZ grubu en fazla iyileşme yüzdeliğine sahiptir.



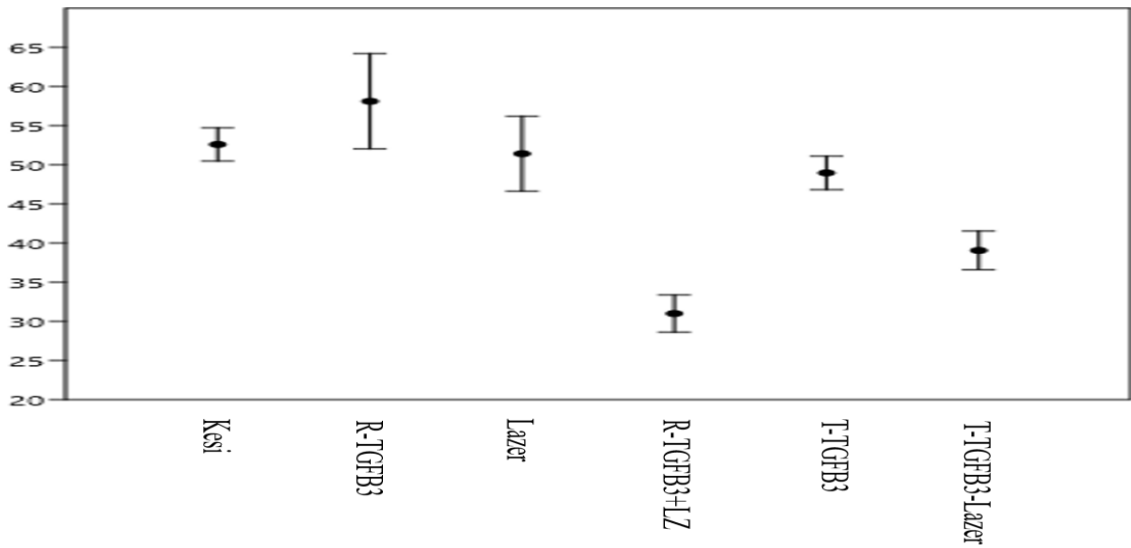
Şekil 4-12: 7.ve 5. gün aralığı iyileşme yüzdeleri

7.ve 5.gün arasındaki gruplar arasında görülen iyileşme yüzdeleri şekil 4-12’de verilmiştir. (F:42,27; P< 3,952E11; BF: 3,097E08). Şekil 4-12’de elde edilen grafikte yüzey alanı iyileşme grupları küçükten büyüğe doğru sırası ile Kesi < Lazer < R-TGF- β 3 < R-TGF- β 3+LZ < T-TGF- β 3 < T- TGF- β 3 +LZ ‘dir. Kesi grubu en az iyileşme yüzdesini gösterirken, T- TGF- β 3+ LZ grubu en fazla iyileşme yüzdeliğine sahip olduğu görülmektedir.



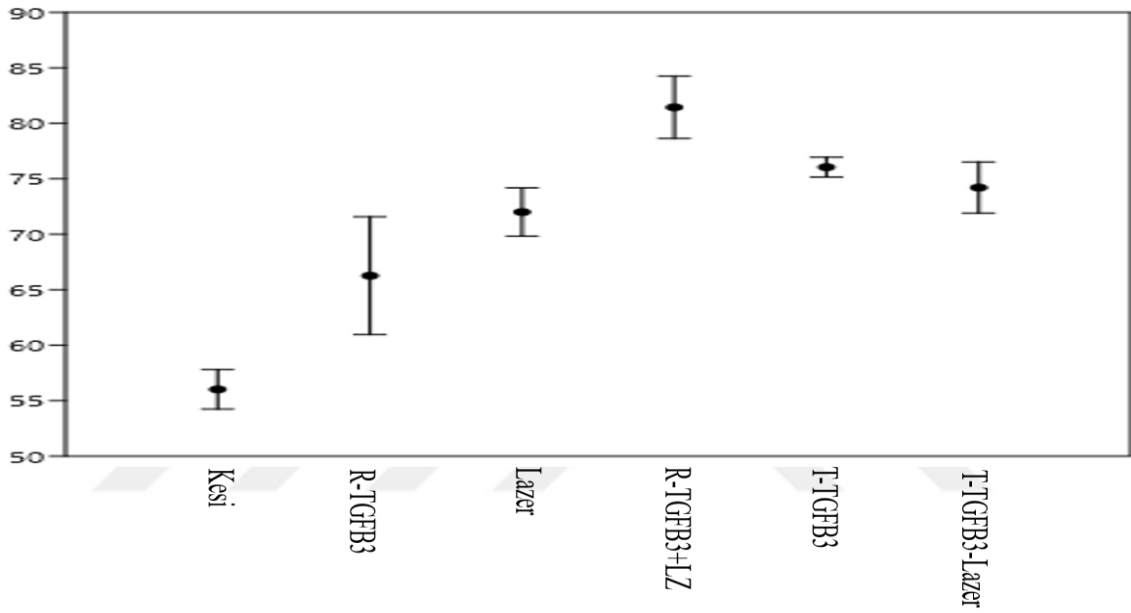
Şekil 4-13: 9.ve 7. gün arası iyileşme oranları

9.ve 7.gün arasındaki gruplar arasında görülen iyileşme yüzdeleri şekil 4-13’de verilmiştir. (F: 9,931 ;P< 3,04E05 ; BF: 989,5). Şekil 4-13’de elde edilen grafikte yüzey alanı iyileşme grupları küçükten büyüğe doğru sırası ile Kesi < T- TGF-β3 < R-TGF-β3 <T-TGF-β3+LZ <Lazer< R-TGF-β3 +LZ ‘dir. Kesi grubu en az iyileşme yüzdesini gösterirken, R-TGF-β3 + LZ grubu en fazla iyileşme yüzdeliğine sahip olduğu görülmektedir. 7.günden sonra Lazer verilen grupların hepsinde gözle görülür bir iyileşme oranı olduğu görülmektedir.



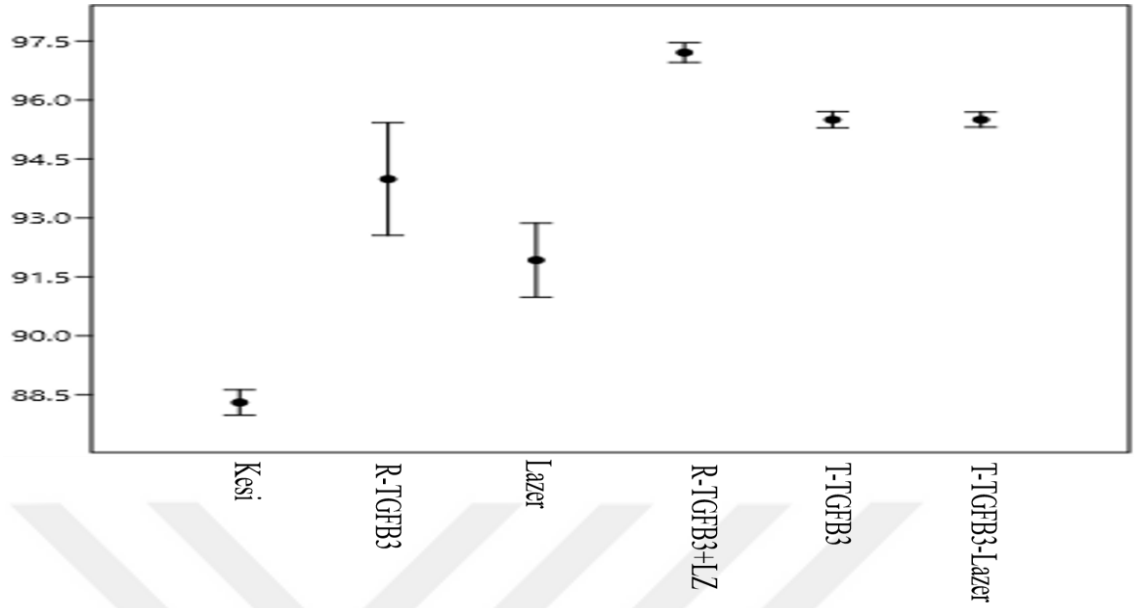
Şekil 4-14: 11.ve 9. gün iyileşme oranları

11.ve 9.gün arasındaki gruplar arasında görülen iyileşme yüzdeleri şekil 4-14’de verilmiştir. (F: 7,383; P < 0,0002577; BF: 140,4). Şekil 4-14’de elde edilen grafikte yüzey alanı iyileşme grupları küçükten büyüğe doğru sırası ile R-TGF- β 3 +LZ < T- TGF- β 3+LZ < T-TGF- β 3 < Lazer < Kesi < R-TGF- β 3 ‘dir. TGF- β 3 +LZ grubu en az iyileşme yüzdesini gösterirken, R-TGF- β 3 grubu en fazla iyileşme yüzdeliğine sahip olduğu görülmektedir.



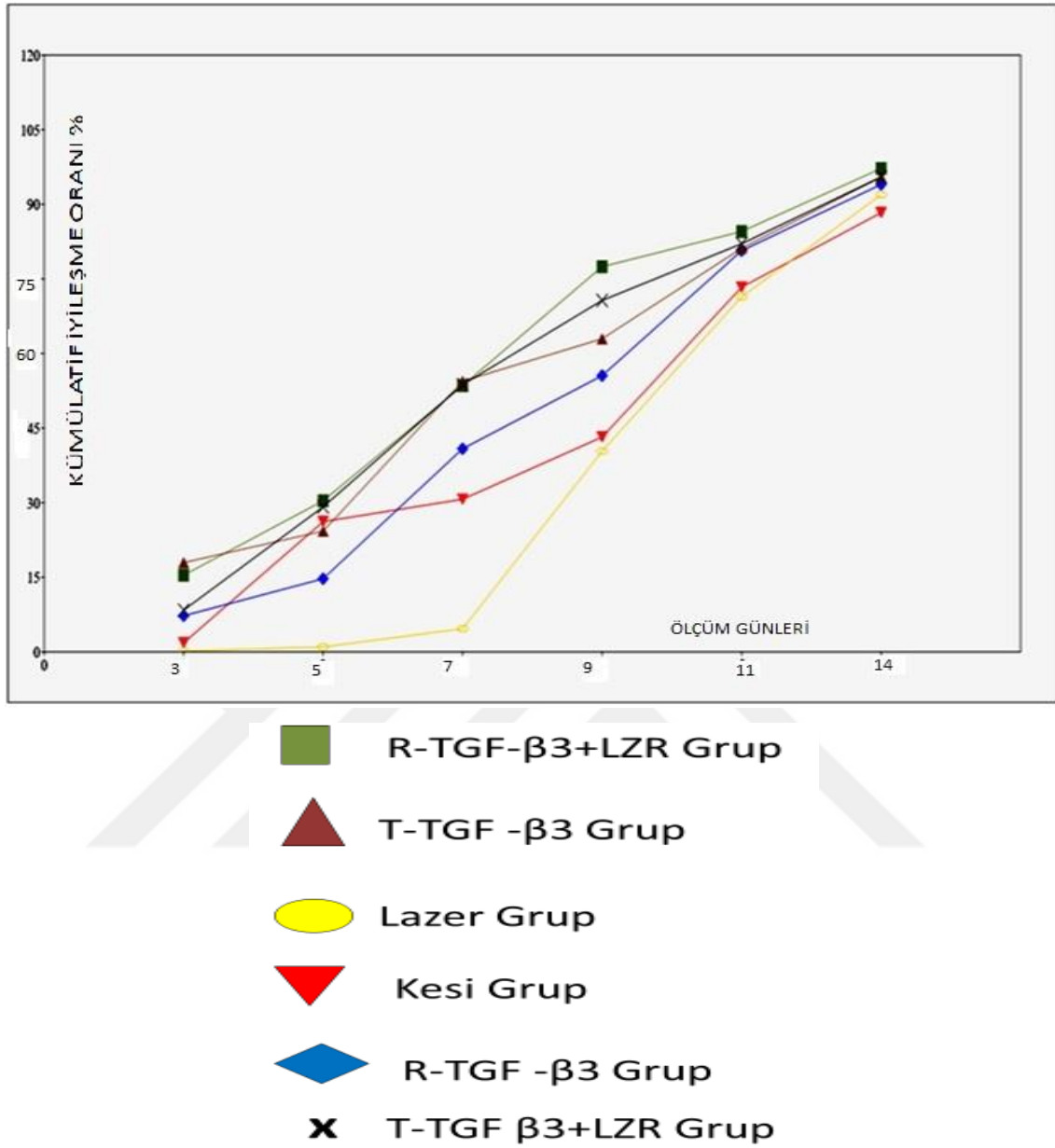
Şekil 4-15: 14.ve 11.gün arası iyileşme oranları

14.ve 11.gün arasındaki gruplar arasında görülen iyileşme yüzdeleri şekil 4-15’de verilmiştir. (F: 9,39; P < 4,643E05; BF: 671,2). Şekil 4-15’de elde edilen grafikte yüzey alanı iyileşme grupları küçükten büyüğe doğru sırası ile Kesi < R-TGF- β 3 < Lazer < T-TGF- β 3+LZ < T-TGF- β 3 < R-TGF- β 3+LZ’ dir. Kesi grubu en az iyileşme yüzdesini gösterirken, R-TGF- β 3+LZ grubu en fazla iyileşme yüzdeliğine sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4-16: 14.ve 1.gün arası genel iyileşme oranları

14. gün sonunda ölçülen yara alanlarının gruplara göre iyileşme oranları şekil 4-16'da verilmiştir. Bu yüzdeliklere göre gruplar arasında anlamlı farklar vardır. (F: 19,24 ; $P < 1,073E07$; BF: 1,83E05). Şekil 4-16'da elde edilen grafikte yüzey alanı iyileşme grupları küçükten büyüğe doğru sırası ile Kesi < Lazer < R-TGF- β 3 < T- TGF- β 3 < T-TGF- β 3+LZ < R-TGF- β 3+LZ 'dir. Kesi grubu en az iyileşme yüzdesini gösterirken, R-TGF- β 3+LZ grubu en fazla iyileşme yüzdeliğine sahip olduğu görülmektedir. Hücre kültüründe olduğu gibi gruplar arasındaki kıyaslanan iyileşme yüzdeliklerinde de beklenen sonuç çıkmıştır. R- TGF- β 3+LZ grubu yüzdesel olarak yara alanı en çok iyileşen gruptur.

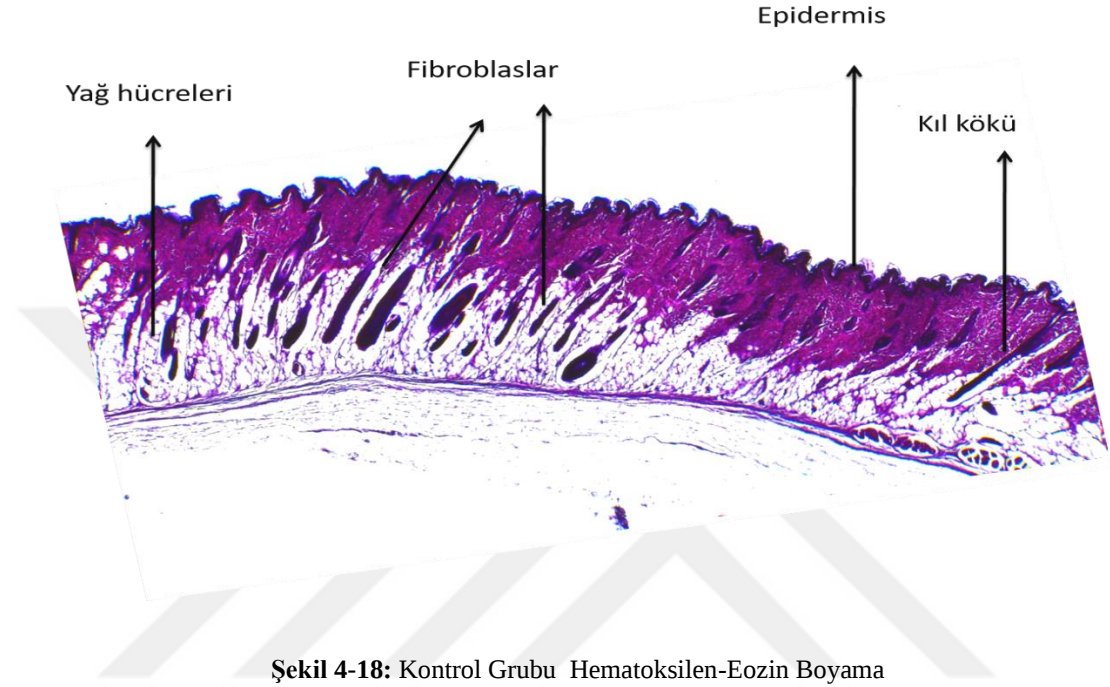


Şekil 4-17: Genel iyileşme Oranları

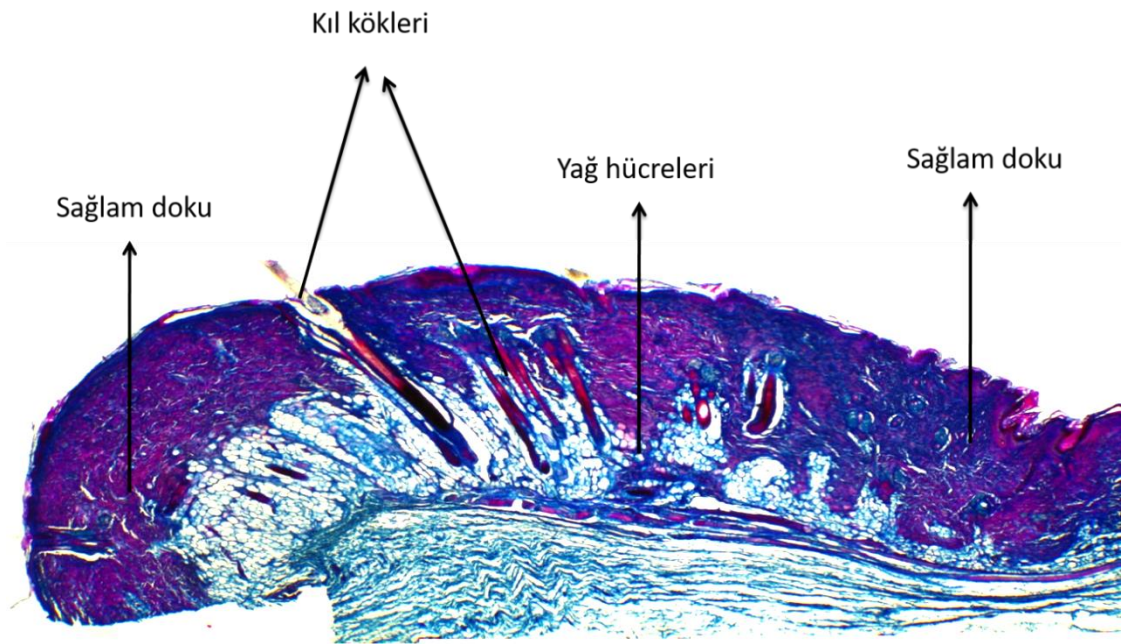
Şekil 4-17'e bakıldığında oluşturulan grupların yara iyileşme alanı ölçüm günlerine göre oluşturulan grafikte en az iyileşme eğrisi Kesi grubunda görülürken en fazla iyileşme oranı sfGFP-TGF-β3 +LAZER grubunda görülmektedir. Bu sonuç beklenen bir sonuç olup, uygulanan diyod lazerin ve rekombinant olarak üretilen sfGFP-TGF-β3'ün yara iyileşmesinde aktif rol oynadıkları literatür özetlerinde olduğu gibi bu grafikte ve Şekil 4-8'de oluşturulan yara alanı iyileşme fotoğraflarında da gösterilmektedir.

4.4.1. Histolojik İncelemeler

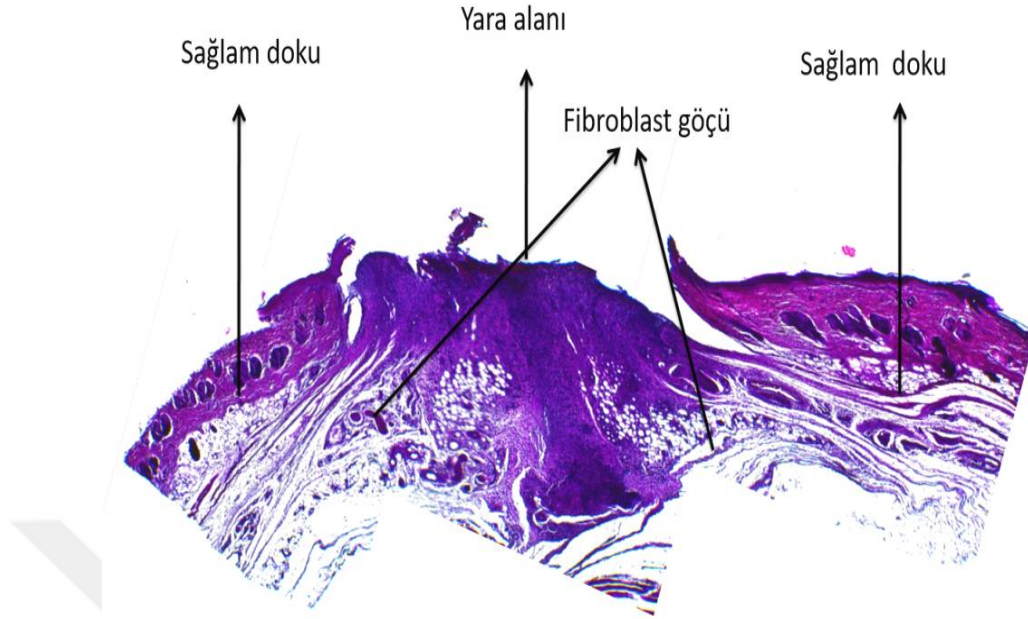
Hemotoksilen Eozin ve Üçlü Boyama Örnekleri



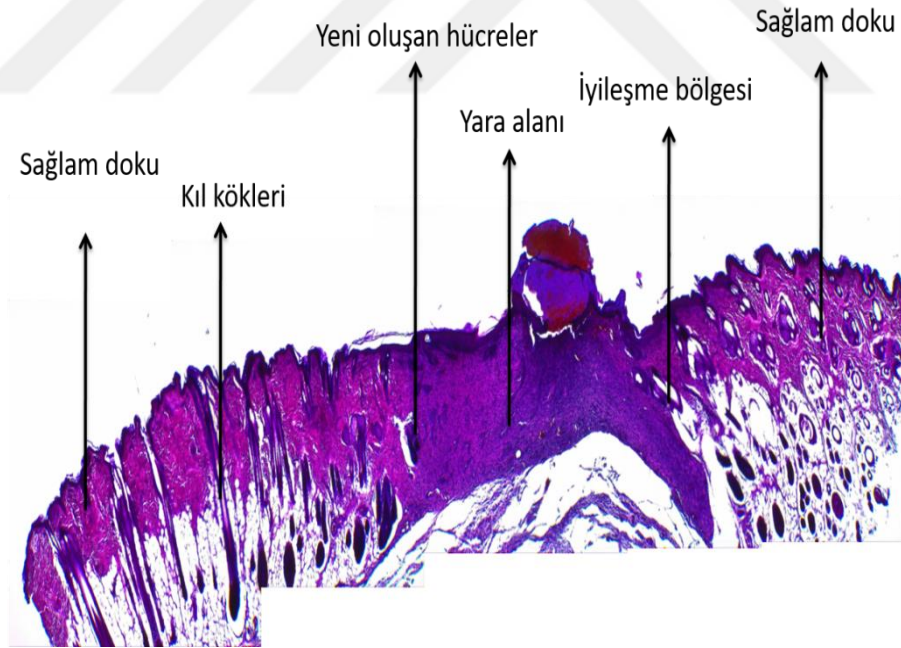
Şekil 4-18: Kontrol Grubu Hematoksilen-Eozin Boyama



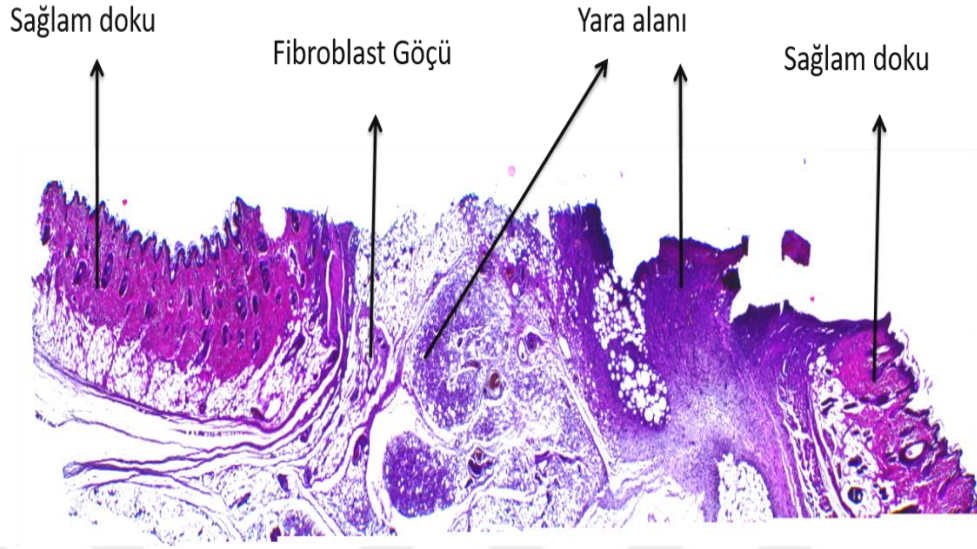
Şekil 4-19: Kontrol Grubu Üçlü Boyama



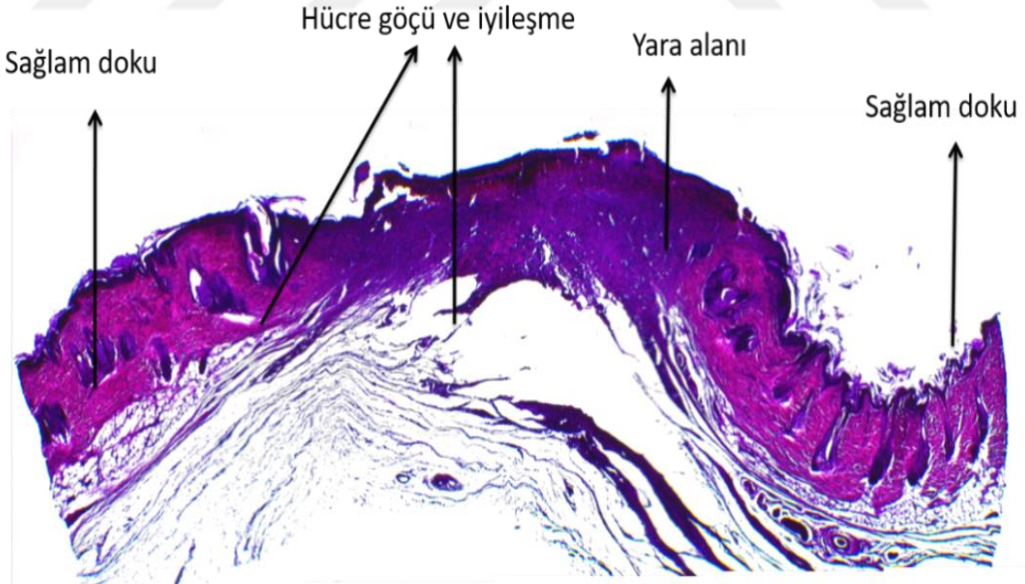
Şekil 4-20: Kesi grubu 1.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama



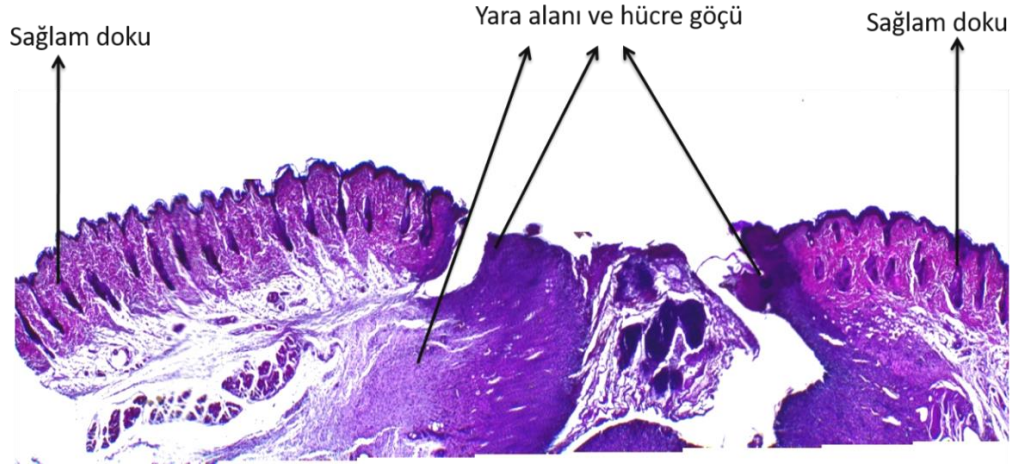
Şekil 4-21: Kesi grubu 2.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama



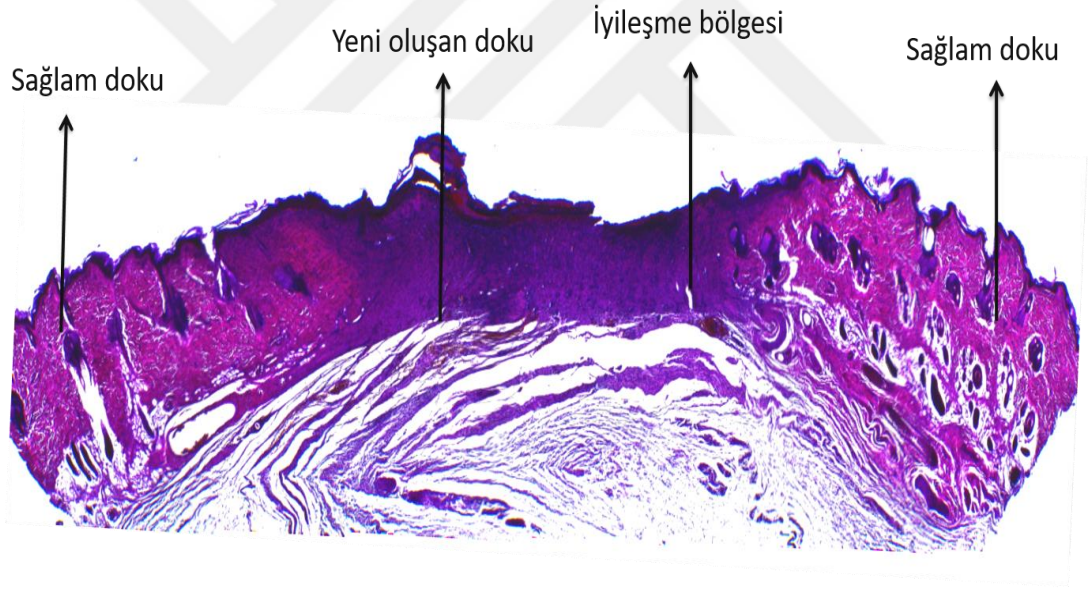
Şekil 4-22: Lazer grubu 1.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama



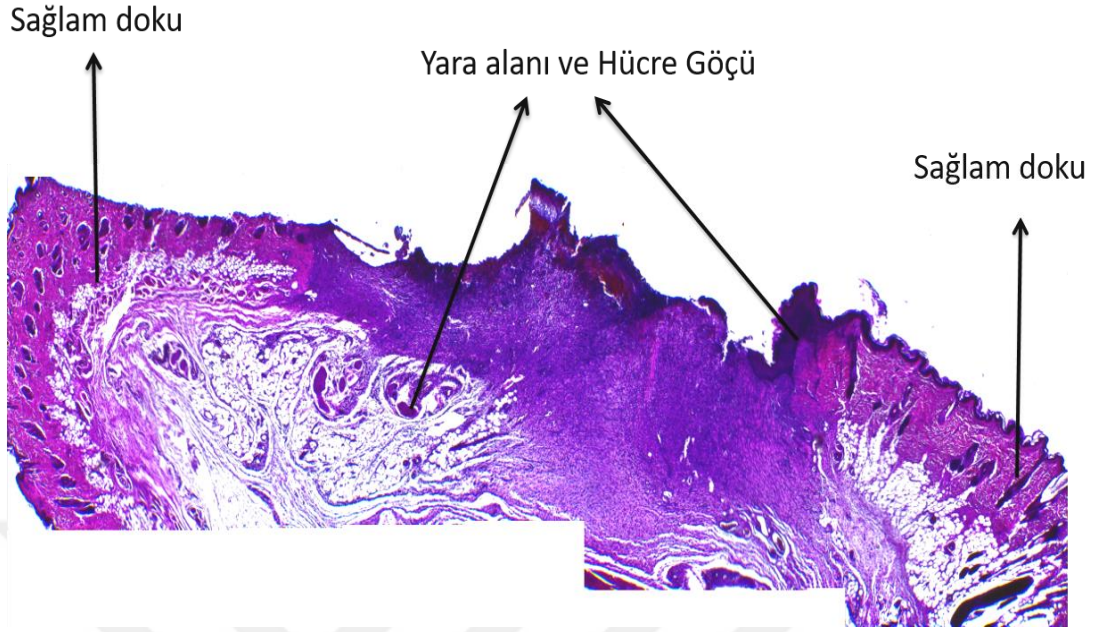
Şekil 4-23: Lazer grubu 2.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama



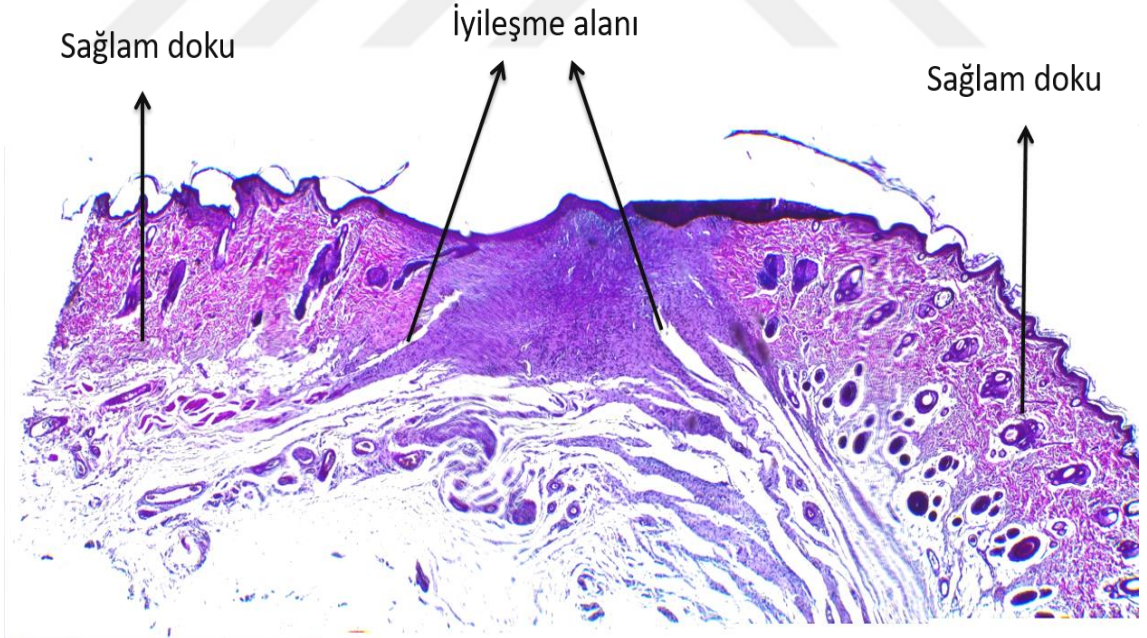
Şekil 4-24:sfGFP-TGF- β 3 grubu 1.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama



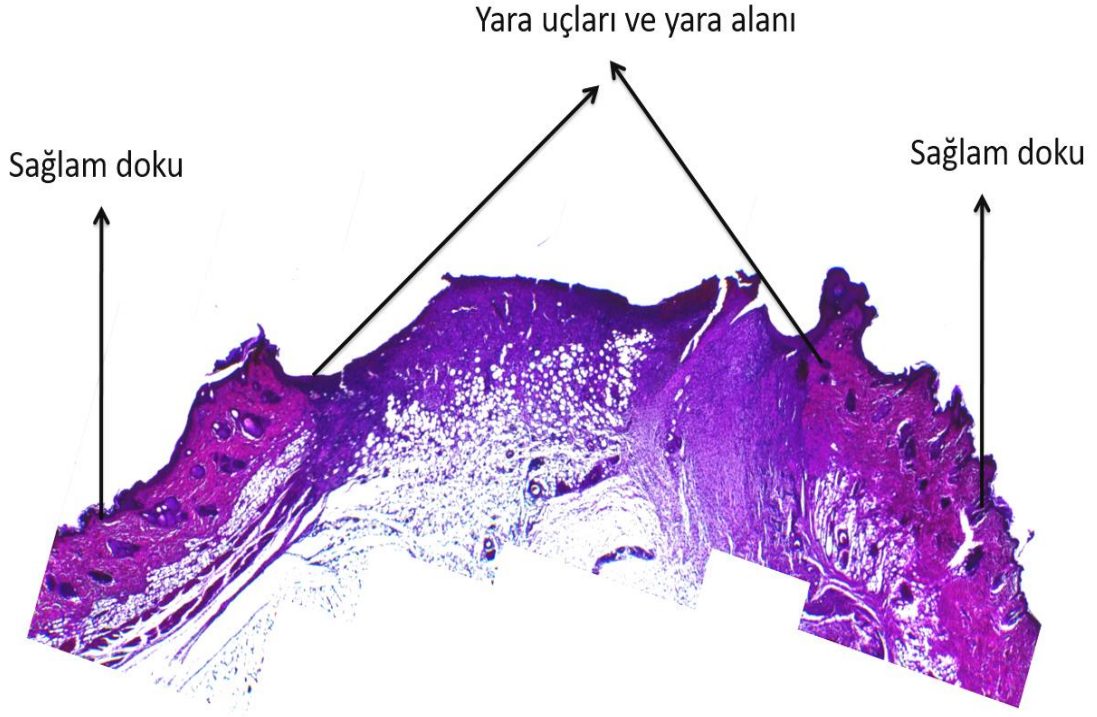
Şekil 4-25:sfGFP-TGF- β 3 grubu 2.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama



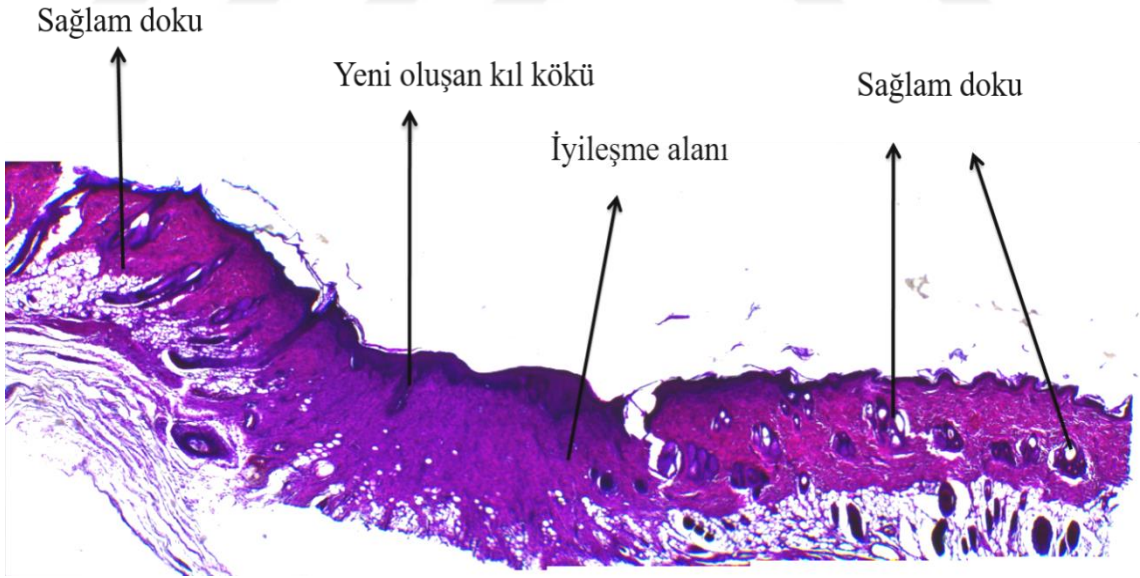
Şekil 4-26: T-TGF- β 3 grubu 1.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama



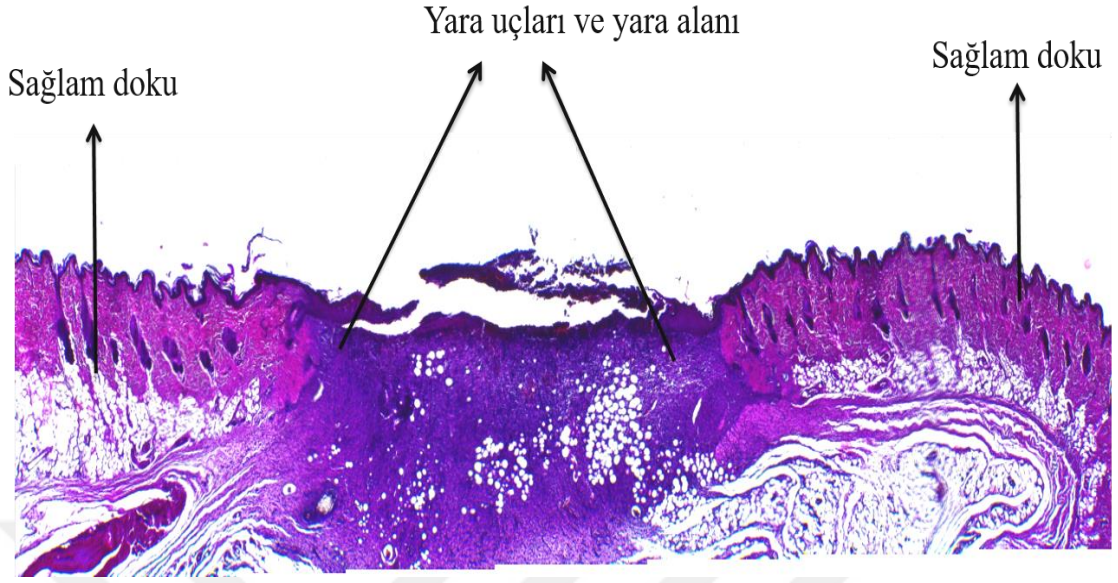
Şekil 4-27: T-TGF- β 3 grubu 2.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama



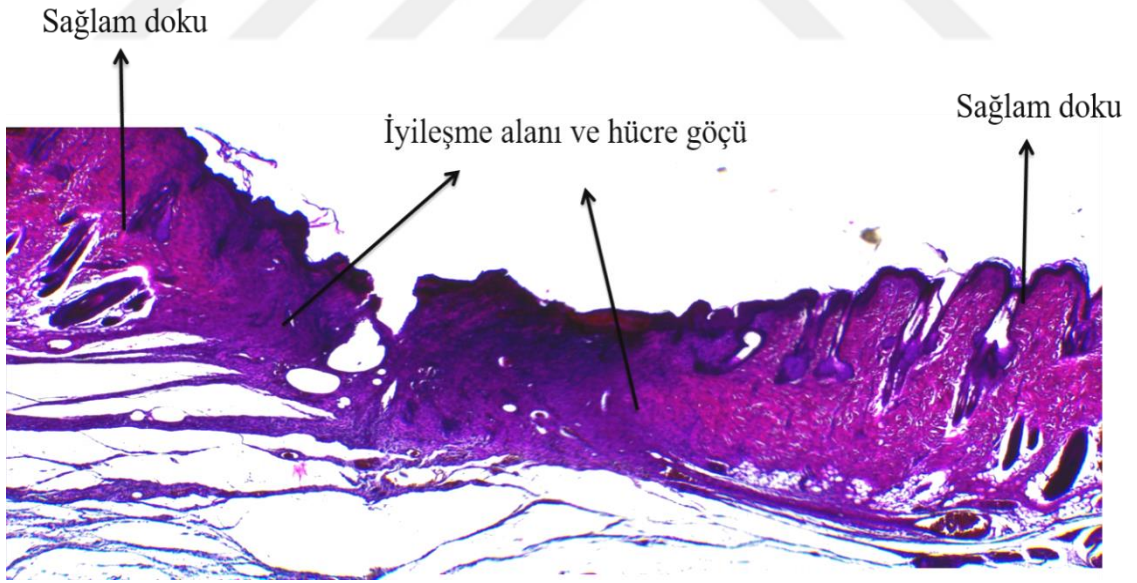
Şekil 4-28:sfGFP-TGF- β 3 +Lazer grubu 1.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama



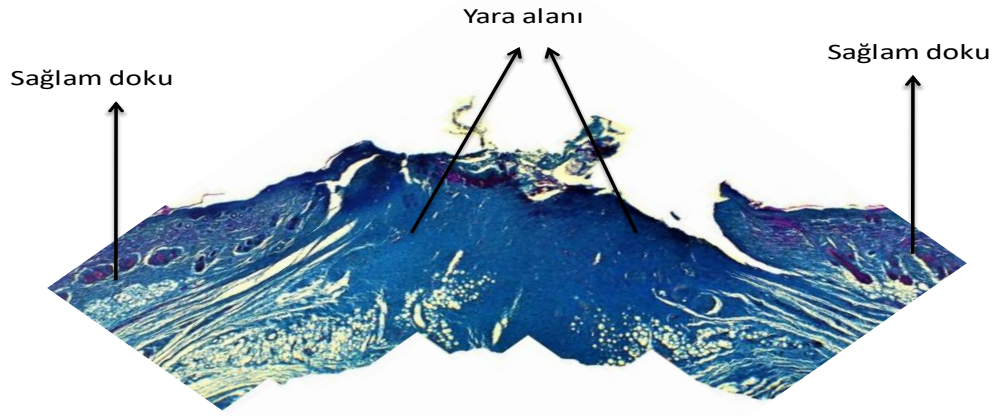
Şekil 4-29:sfGFP-TGF- β 3+Lazer grubu 2.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama



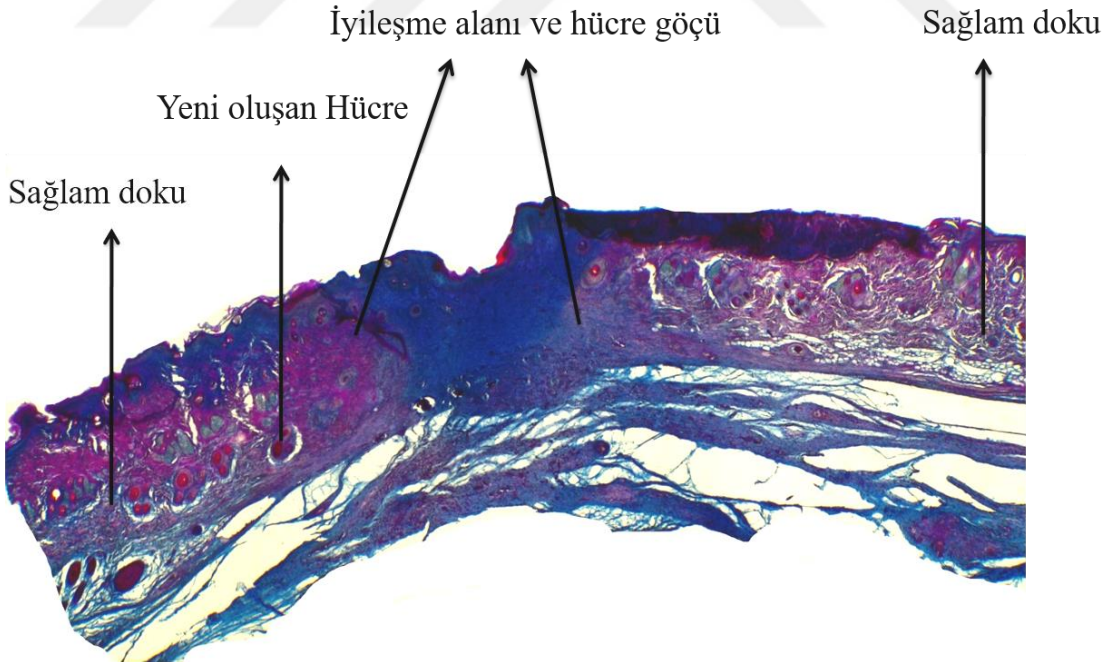
Şekil 4-30: T-TGF- β 3+Lazer grubu 1.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama



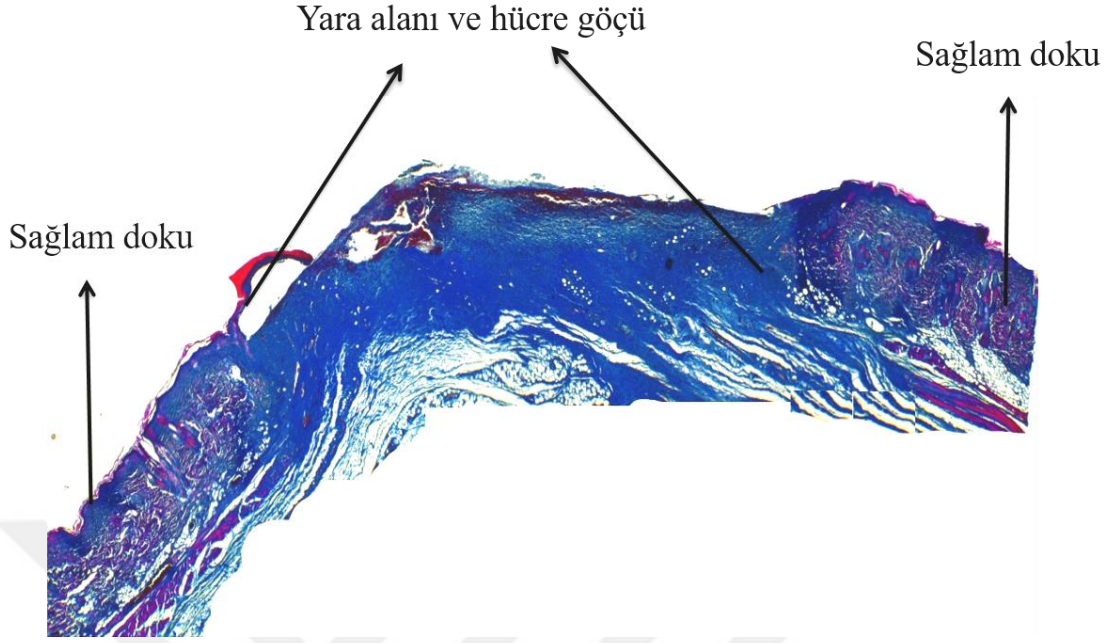
Şekil 4-31: T-TGF- β 3+Lazer grubu 2.hafta Hemotoksilen-Eozin Boyama



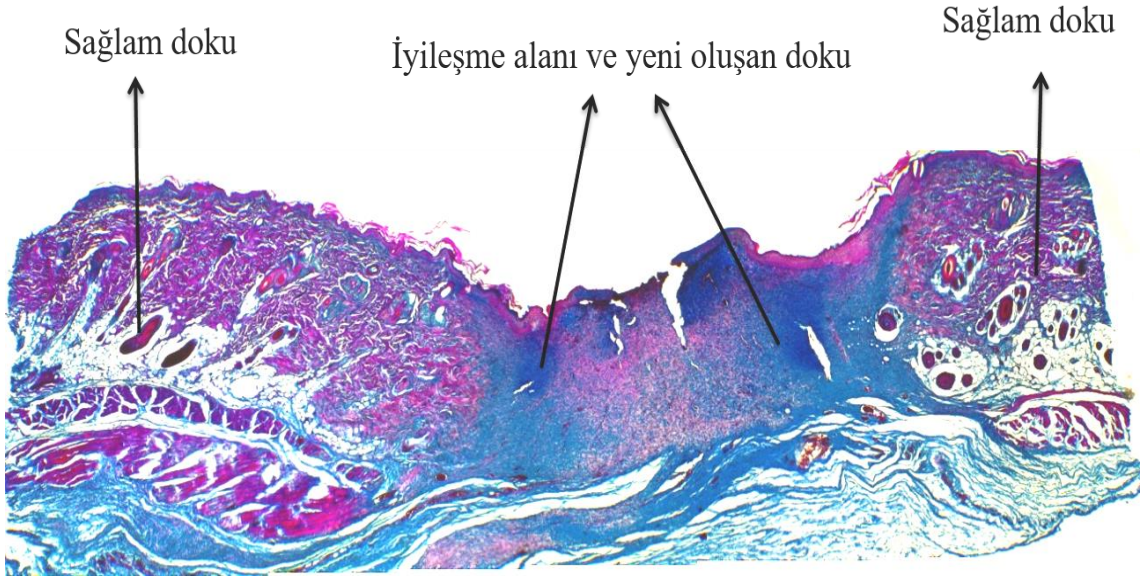
Şekil 4-32: Kesi Grubu 1.hafta Üçlü Boyama



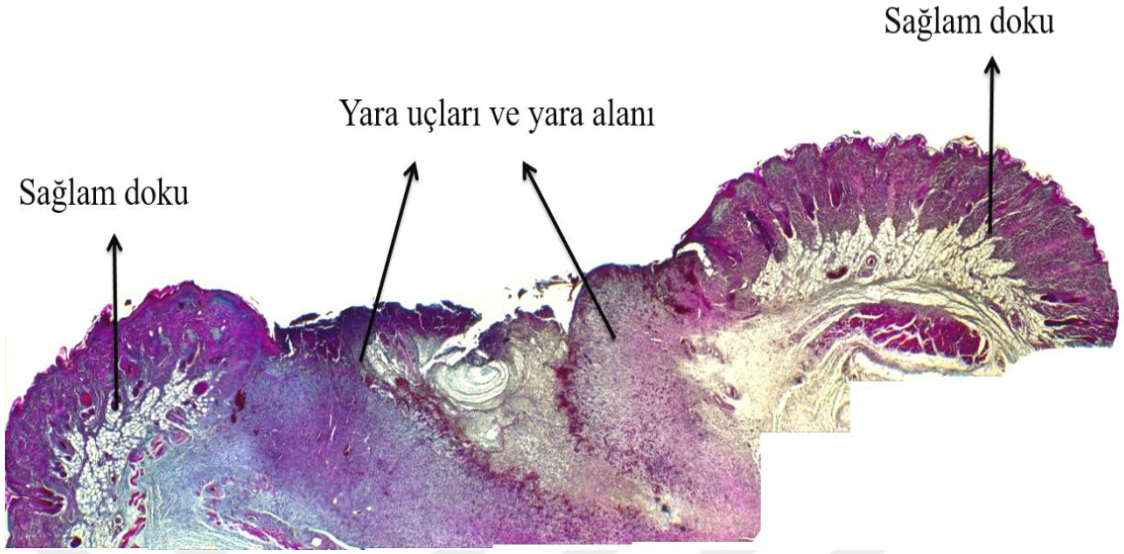
Şekil 4-33: Kesi Grubu 2.hafta Üçlü Boyama



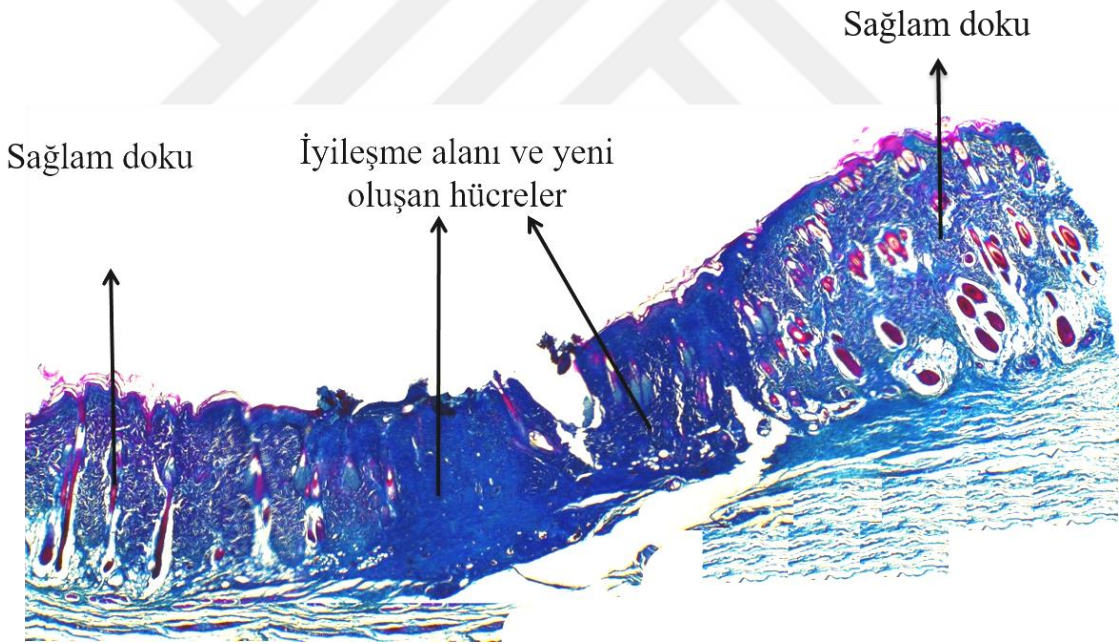
Şekil 4-34:Lazer Grubu 1.hafta Üçlü Boyama



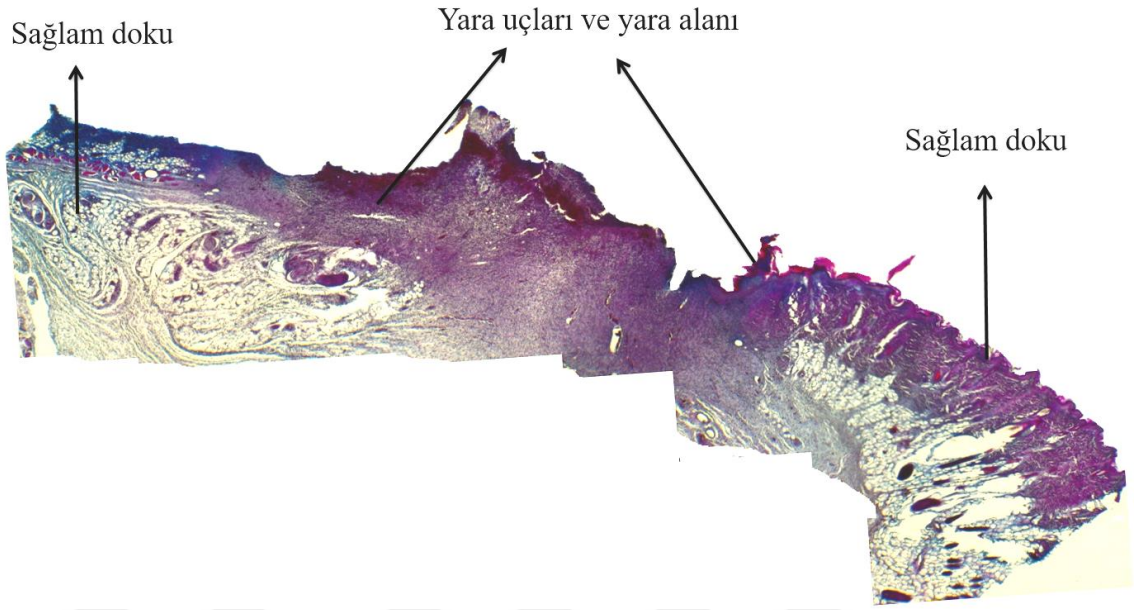
Şekil 4-35:Lazer Grubu 2.hafta Üçlü Boyama



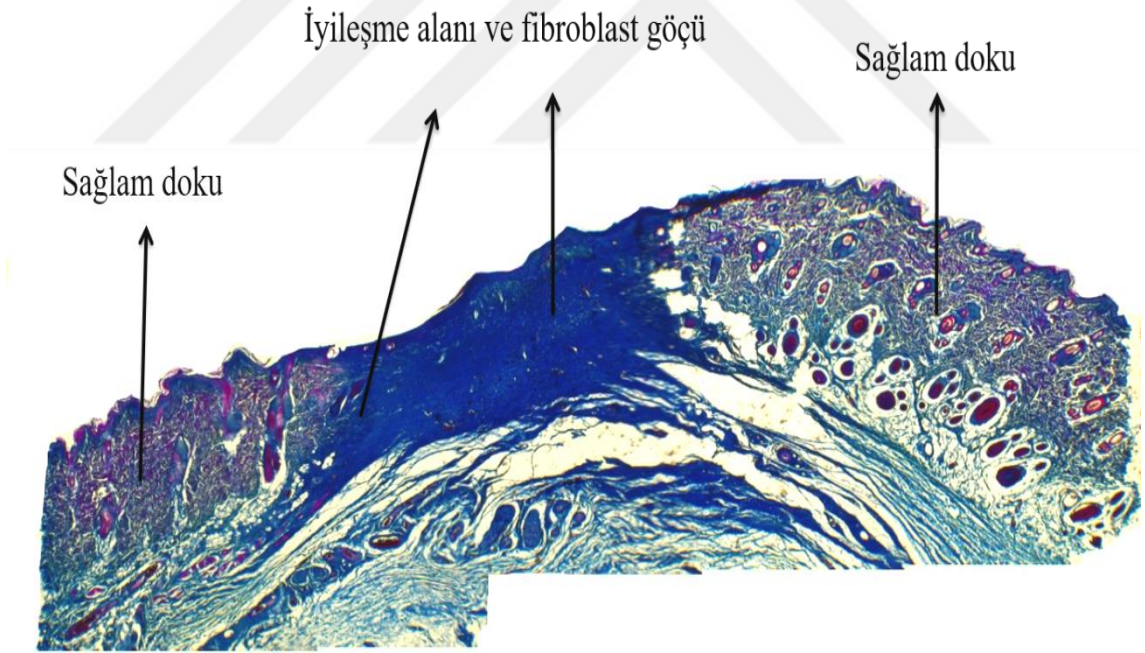
Şekil 4-36:sfGFP-TGF- β 3 grubu 1.hafta Üçlü Boyama



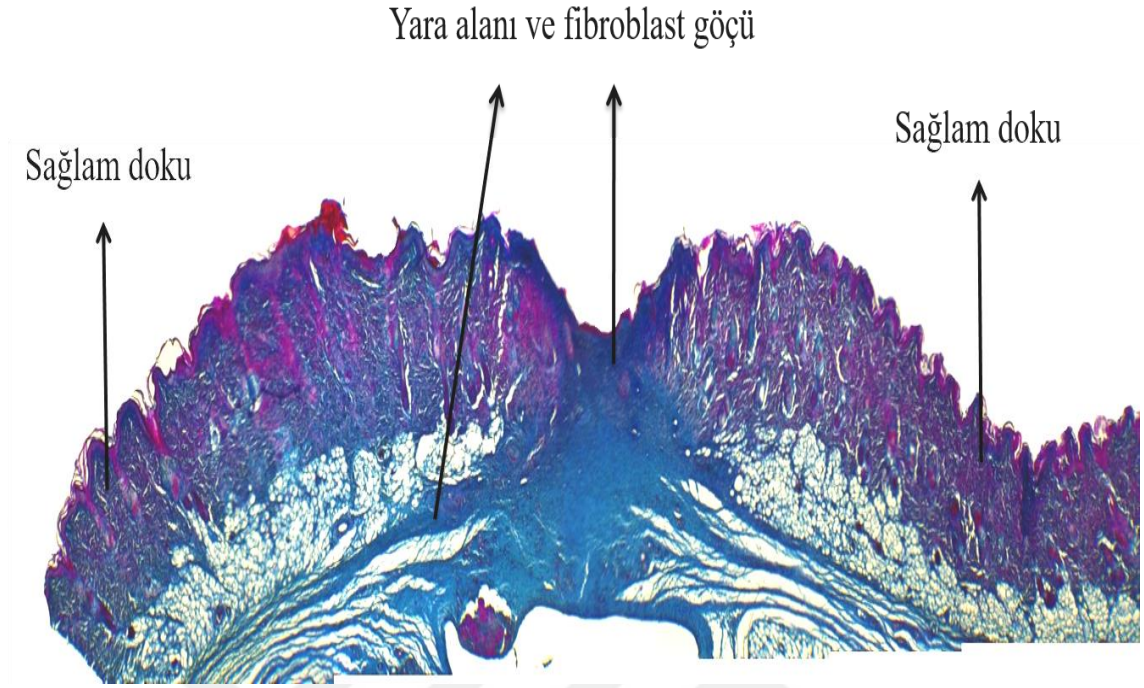
Şekil 4-37:sfGFP-TGF- β 3 grubu 2.hafta Üçlü Boyama



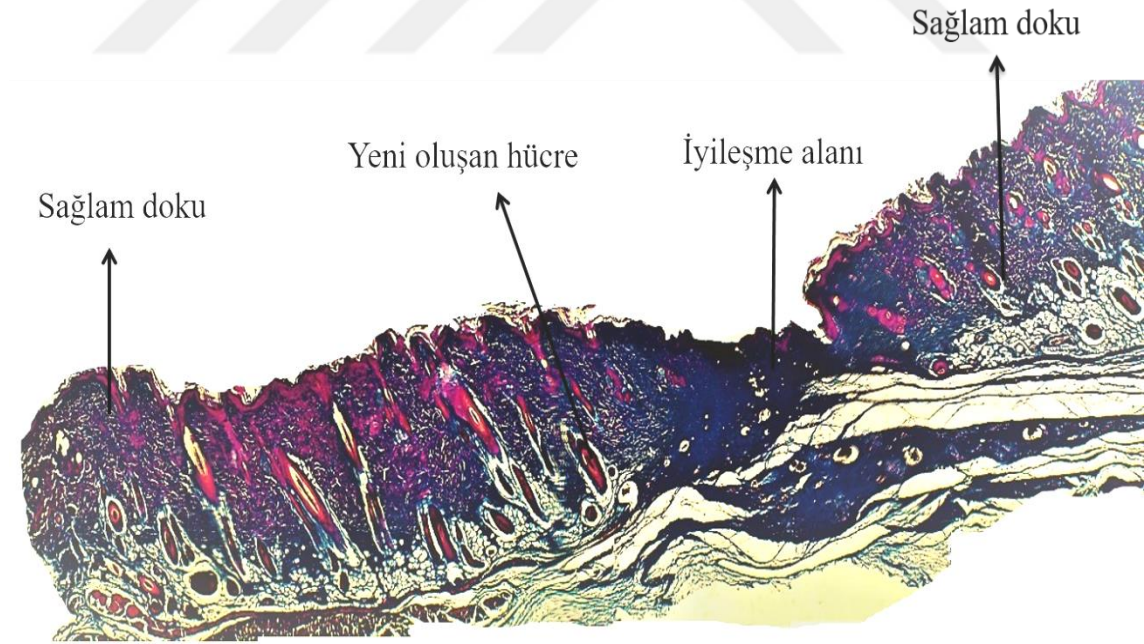
Şekil 4-38: T-TGF- β 3 grubu 1.hafta Üçlü Boyama



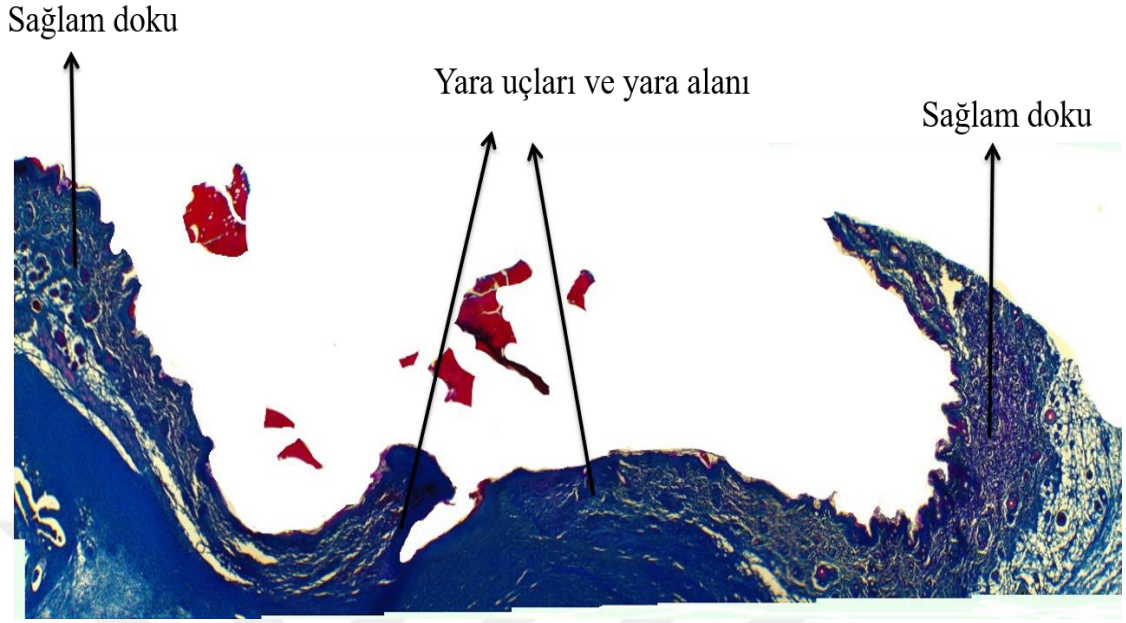
Şekil 4-39: T-TGF- β 3 grubu 2.hafta Üçlü Boyama



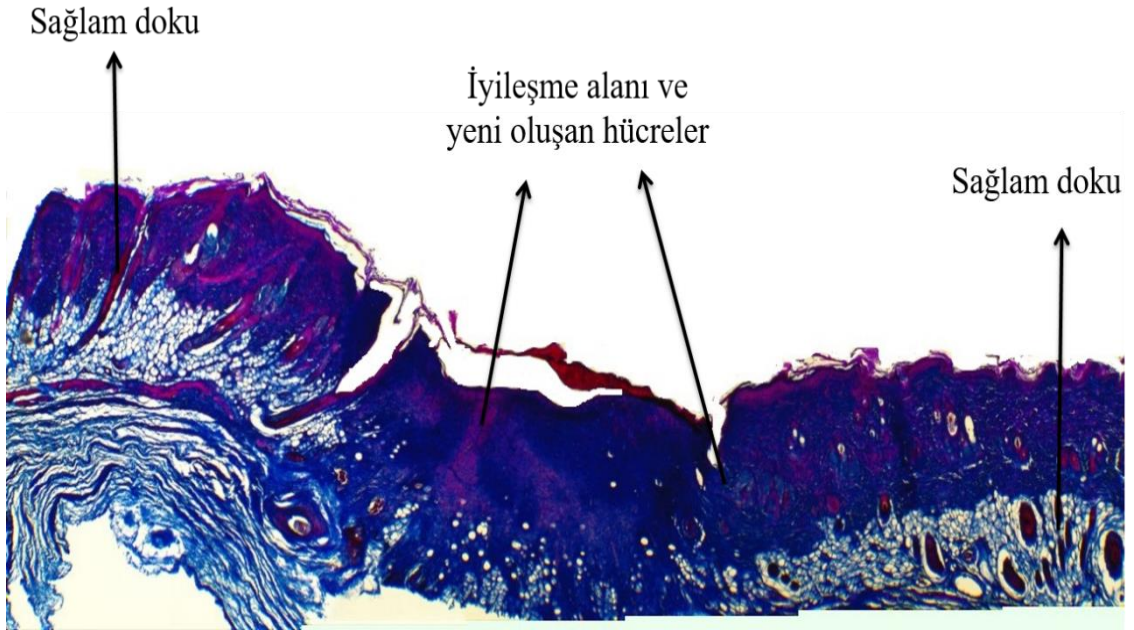
Şekil 4-40: T-TGF- β 3+Lazer grubu 1.hafta Üçlü Boyama



Şekil 4-41: T-TGF- β 3+Lazer grubu 2.hafta Üçlü Boyama



Şekil 4-42:sfGFP-TGF- β 3+Lazer grubu 1.hafta Üçlü Boyama



Şekil 4-43:sfGFP-TGF- β 3+Lazer grubu 2.hafta Üçlü Boyama

Derinin ana katmanları olan dermis,epidermis ve hipodermis ayrıca epidermisin katmanları olan bazal katman, spinozum katmanı,granülozum katmanı, lusidum katmanı ve korneum katmanı, dermisin retiküler ile papiller dermisin , bu tabakalarda bulunan kıl folikülleri, yağ bezleri de her iki boyamada da sağlam dokularda belirgin olarak görülmektedir. Ancak oluşturulan yara alanında bu yapılar ilk haftaya kadar çok belirgin bir şekilde görülmemektedir. Oluşturulan bütün preparatların ilk haftasında yara alanı bölgesinde yara eksudası sonrası oluşan kabuk tabaka dikkat çekmiştir. İyileşme bölgeleri oluşmuştur. Dermis kısımlarında yer alan fibroblastların oluşturduğu kollejenler dikkat çekmektedir. Yara alanına oldukça yoğun hücre göçleri yapılan boyamalarda mor ve mavi renk olarak gösterilmektedir. Tedavi gruplarındaki iyileşme hızları kontrol grubundan daha hızlı olduğu yapılan her iki boyamada da dikkat çekmektedir. Yara alanları yani iyileşme bölgeleri mavi ve mor olarak daha koyu boyanmışlar ve oluşan kollejenler belirginleşmiştir. İlk haftalarda epidermis dokusu bütün preparatlarda tam olarak oluşmamış yani yara uçları karşılıklı olarak birleşmemiştir. Ancak yara alanında oluşan pıhtı açık olan epidermis tabakasının yerini almıştır. Bunun yanı sıra reepitelizasyon ve kollejen dönüşümünün başladığı yapılan boyamalardan anlaşılmaktadır (Şekil 4-20, 4-22, 4-24, 4-26 , 4-28, 4-30, 4-32, 4-34, 4-36, 4-38, 4-40, 4-42).

Hazırlanan ikinci hafta (14.gün) preperatlarından kontrol grubu olarak oluşturulan kesi grubunda, epidermisin tamamen kapandığı ama tabakalarının tam olarak belirginleşmediği, hipodermisin ve dermisin olduğu, kollejen dönüşümlerinin başladığı ve iyileşme alanının kollajence zengin olduğu her iki boyamada da görülmektedir (Şekil 4-21, 4-33). Tedavi gruplarından olan lazer grubunda da epidermis kapanmış yani yara uçları tamamen birleşmiş olup dermis ve hipodermis belirgin olarak görülmektedir. Yara alanına hücre göçü devam etmekte ve kontrol grubuna göre daha koyu boyanmakta ve tabakalar daha belirgin haldedir (Şekil 4-23, 4-35). sfGFP-TGF- β 3 füzyon proteini uygulanan grup ikinci hafta örnekleri incelendiğinde epidermis tabakasının tamamen kapandığı, dermis ve hipodermisin ayrıştığı ve belirgin bir hat şeklinde durduğu, yara alanında kollajen birikiminin olduğu, yeni kıl köklerinin oluşmaya başladığı her iki boyamada da görülmektedir (Şekil 4-25, 4-37). Ticari olarak temin edilen ve pozitif kontrol olarak kullanılan TGF- β 3 tedavi grubu örnekleride , rekombinant olarak üretilip uygulanan tedavi grubu ile aynı ölçüde iyileşme sağladığı her iki boyamada da

görülmektedir. Rekombinant olarak üretilen sfGFP-TGF- β 3 protein tedavi grubunun yara alanının daha çabuk iyileştiği ve daha çok kollajene sahip olduğu dermisin ve hipodermisin daha düzenli olduğu örneklerde görülmektedir (şekil 4-27, 4-39) sfGFP-TGF- β 3 + lazer tedavi gruplarının da hemen hemen aynı şekilde iyileşme gösterdiği, yara alanlarının kapandığı, epidermisin oluştuğu hatta diğer gruplara kıyasla epidermisin üst iki tabakasının lüsidum ve korneumun oluştuğu, dermiste ve hipodermisteki yapıların folikül hücrelerin retiküller ağların, yağ hücrelerinin de oluştuğu her iki boyamada da görülmektedir. Pozitif kontrol için kullandığımız ticari olarak temin ettiğimiz TGF- β 3 + lazer tedavi grubunda da hemen hemen aynı gelişmeler görülmektedir. Ancak şekiller incelendiğinde sfGFP-TGF- β 3 + lazer tedavi gruplarının iyileşmeleri daha düzenli ve daha baskın olduğu görülmektedir. (Şekil 4-29, 4-41, 4-31, 4-43). Oluşturulan grupların her iki günde bir çekilen fotoğrafları Şekil 4-8’de verilmiştir. Kıyas amaçlı oluşturulan fotoğrafların dizilmesi ile izlenen yara alanı iyileşmeleri, yapılan boyamalar ile de gösterilmiştir. Tedavi gruplarının kontrol grubuna göre daha hızlı iyileştiği gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Görünsün ya da görünmesin cilt üzerinde bulunan izler, yanlış iyileşme sonucu oluşan skar dokuları çok dikkat çekmekte ve kişinin yaşam kalitesini bozmaktadır. İstenmeyen bu durumlar için çeşitli tedavi yöntemleri vardır. Yapılan literatür çalışması sonucunda son zamanlarda terapötik proteinlerin kullanımının arttığı görülmektedir. Hatta yüksek maliyet ve canlı organizmada üretmek çok zaman aldığından rekombinant DNA teknolojisi ile düşük maliyetli ve yüksek miktarda üretilmesi ile de araştırmaların yönünü terapötik proteinlere çevirmiştir. Terapötik proteinlere artı olarak çeşitli lazer, radyasyon ve ışık tedavileri de kötü görünüm sağlayan skar dokuları ile mücadelede yer almaktadır(Pham, 2018).

Etkili bir terapötik protein olan TGF- β 3, akut ve kronik yaralar ve fibrozan bozukluklar için yara izi azaltıcı bir antifibrotik ajan olarak kullanılmaktadır ve farklı ekspresyon sistemlerinde rekombinant olarak üretilmektedir. Rekombinant üretimdeki çeşitli avantajları nedeniyle yaygın olarak kullanılan Escherichiacoli (E. coli) ekspresyon sisteminde üretilen TGF- β 3 ticari olarak temin edilebilmektedir. Ancak E. coli hücrelerinde protein ekspresyonunda karşılaşılan asıl sorun inklüzyon cisimciği oluşumudur. Bu sorunu çözmek için çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Füzyon olarak üretim bu stratejilerden birisidir. Superfolder GFP (sfGFP), E. coli'de füzyon ortağının çözünürlüğünü artırmak için kullanılan füzyon etiketlerinden biridir. Yapılan çalışmada; sfGFP füzyon etiketli TGF- β 3 (sfGFP-TGF- β 3), E. coli BL21'de (DE3) çözünür formda ilk kez yüksek verim ve saflıkta başarıyla üretilmiştir (Bilgin,2023). Yapılan bu çalışmalar, tez çalışmalarımızın rekombinant basamağı olan E.coli hücrelerinde rekombinant sfGFP-TGF- β 3proteinini üretimi ile örtüşmekte ve üretilen sfGFP-TGF- β 3 füzyon proteini literatürde gösterilen çalışma (Bilgin,2023) gibi inklüzyon cisimciği oluşturmamaktadır (Şekil 4-1). Ayrıca sfGFP proteinleri renginden dolayı nerede üretildiğini görmek ve saflaştırma kısmında belirginliğinden dolayı ayrıca istenmeyen durum olan inklüzyon oluşumunun önüne geçilebilmesi için en uygun stratejilerden bir tanesidir (Fukuda ve ark.,2000). Yüksek çözünürlüğe ve stabilizeye sahip bir floresan proteinidir. sfGFP, kümelenme eğilimi ve denatürasyon gibi diğer floresan proteinlerin

dezavantajlarına sahip değildirler. sfGFP proteini zayıf katlanmış bir eş peptit ile kaynamış olsa bile katlanabildiğinden yüksek verimlilik ile karakterize edilir. Füzyon yapısındaki ortağının katlanma etkinliğini de artırır (Pedelacq ve ark.,2006).

Fibroblast hücreleri, bağ dokusunda en çok bulunan hücrelerdir. Yara iyileşmesinde ve bağ dokusunun dönüşümünde aktif rol oynarlar. Hücre dışı ürettikleri matrisler hem diğer hücreleri bağlar hemde yıkacak enzim oluştururlar. İnflamatuvar bir cevap verirler (Chiquet ve ark.,2015). Karoussis ve arkadaşları 810 nm diyot lazer ile fotobiyomodülasyonun çeşitli enerji yoğunluklarının insan diş eti fibroblastları üzerine etkisini invitro olarak çalışmışlardır. HGF hücrelerini plastik doku kültürü üzerine ekildi ve 2, 4, 6 ve 12 j/ cm² ile 810 nm diyot lazer uygulaması yaparak büyüme faktörü ekspresyonu üzerindeki etkilerini 72 saat incelemişlerdir. Hücre proliferasyonu, MTT analizini kullanılarak 24, 48 ve 72 saat sonra değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda 810 nm'lik diyod lazerin insan diş eti fibroblast hücrelerinde proliferasyon, kollejen üretimi ve büyüme faktörü ekspresyonu üzerinde faydalı olduğunu belirtmişlerdir. Tez çalışmasında rekombinant olarak üretilen sfGFP-TGF-β3 proteini BJ hücreleri üzerinde MTT canlılık testi yapılmış ve ortaya çıkan grafikler Şekil 4-2, 4-3'de gösterilmiştir. Çalışılan konsantrasyonlar 2ng/mL ve 10ng/mL olmak üzere iki farklı konsantrasyonda çalışılmıştır. Ayrıca diyod lazer uygulanan ve uygulanmayan olmak üzere iki pleytoluşturulmuş ve diyod lazer bir pleyte 60 saniye boyunca yara iyileşmesi protokolü programı kapsamında uygulanmıştır. Elde edilen veriler Şekil 4-2, 4-3'de grafik olarak gösterilmiş ve sonuçlar gayet olumlu çıkmıştır. 48. Saat sonrasındaki şekil 4-3'de yer alan grafiğe bakıldığında en iyi sonucu 2ng/mL dozaj uygulanan ve aynı zamanda lazer işlemi yapılan hücrelerin vermiş olduğu görülmüştür. Çıkan sonucun literatür özetleri ile örtüşmesi uygulanan diyod lazerin fibroblastlar üzerine etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Zhu ve arkadaşlarının sıçan submandibuler bez hücrelerinin amilaz salgılanmasında TGF- β3 proteininin etkisinin araştırıldığı çalışmada, submandibuler bez hücrelerini kullanarak 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 ve 25.0 ng/mL dozajlarda 24, 48, 72 ve 96. saatler aralığı ile MTT kolorimetrik yöntemini uygulamışlar ve 0.5-10 ng/mL konsantrasyonlarında amilaz salgılanmasında önemli ölçüde uyarıldığını ama yüksek dozajlarda bu uyarının

olmadığını bulmuşlardır(Zhu ve ark.,2004). Yu ve arkadaşlarının renal fibrogenizde TGF-beta izoformlarının etkilerine baktıkları çalışmada, MTT testi kullanılmış ve üç TGF-Beta izoformunda 0.001 ila 10 ng/mL konsantrasyonlarında kullanılmış ve TGF-Beta 3 proteinin en etkili olduğu konsantrasyon 10 ng/mL olarak bildirilmiş ve böbrek fibroblastlarda fibronetik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Yu ve ark.,2003). Yapılan başka bir çalışmada rekombinant olarak üretilen insan sfGFP-TGF- β 3 proteinini, BJ hücrelerinde MTT tahlili ile test edilmiş ve test edilen konsantrasyon aralıkları 150 ng/mL-2.34 ng/mL olarak belirlenmiştir. Kullanılan dozajlarda BJ hücrelerinde sitotoksik olmadığı gösterilmiştir (Bilgin,2023).Rekombinant olarak üretilen sfGFP-TGF- β 3 proteininin toksik olup olmadığını anlamak için BJ hücreleri üzerinde MTT testi yapılmıştır. 2ng/mL ve 10ng/mL olmak üzere iki ayrı konsantrasyonda çalışılmıştır. Rekombinant olarak üretilen protein ticari olarak da temin edilmiş ve hücre kültür çalışmalarında pozitif kontrololarak kullanılmıştır. Çalışmalar sonucunda rekombinant olarak üretilen sfGFP-TGF- β 3 füzyon proteininin proliferasyona etkisinin çok fazla olmadığı ama toksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4-2). 48. saat sonrasındaki grafiğe bakıldığında en iyi sonucu 2ng/mL dozaj uygulanan ve aynı zamanda lazer işlemi yapılan hücrelerin vermiş olduğu görülmüştür (Şekil 4-3). Bunun sebebinin ise rekombinant protein füzyonunda bulunan sfGFP proteininden kaynaklandığı düşünülmektedir. Uygulanan diğer dozajlarında hücre canlılık testinde toksik etki oluşturmadığı kanısına varılmıştır. Bu çalışmada; sfGFP-TGF- β 3 füzyon protein dozajının literatür çalışmaları(Bilgin,2023, Zhu ve ark.,2004, Yu ve ark.,2003) ile uyumlu olduğunu ve sitotoksik etkiye sahip olmadığını göstermektedir (Şekil 4-2, 4-3).

Embriyonik dönemde damak gelişimine palatogenez denir. Palatogenezde en yaygın görülen deformite de yarı damaktır. Damak mezenkimal hücrelerinin birleşmesi için gerekli olan damak orta hat epitelyum dikişi (MES) hücrelerinin apoptoz ile parçalanması gerekir. TGF- β 3 bu parçalanmada ve parçalanma sonucunda hücre göçlerinden de sorumludur. Ahmed ve arkadaşları tarafından TGF- β 3 ile epitelyum dikiş parçalanma mekanizmaları konulu yapılan çalışmada; CF1 fare embriyolarından toplanan tek damak rafları karşıt damak rafi ile birlikte yerleştirilmiş ve 72 saate kadar 5 ng/mL TGF- β 3 proteinini ile inkübe edilmiştir (Ahmed ve ark.,2007). MES hücreleri her 24 saatte bir faz kontrast mikroskobu ile kontrol edilmiştir. Çalışmanın sonucunda MES

hücrelerinin kontrol gruplarına kıyasla hareketli olduğu ve boşlukları kapattığı gözlemlenmiştir. Benzer bir çalışma da Jalali ve arkadaşları tarafından yapılmış ve aynı miktarda yani 5 ng/mL TGF- β 3 proteini kullanılmıştır(Jalali ve ark.,2012). Bu çalışmada da damak gelişimi için özellikle MES parçalanması ve mezenkimal birleşmenin olmasında TGF- β 3 proteininin büyük bir rol oynadığını ispatlamışlardır. Nawshad ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise damak yara iyileşmesinde 2, 5 ve 10 ng/mL TGF- β 3 proteini çizik yara modelinde uygulamışlardır. MES hücreleri 12 saat sonra göç etmeye başlamışlardır. Yapılan çalışmada protein konsantrasyonunun artması, hücre göçünü artırmıştır (Nawshad ve ark.,2004). Bilgin tarafından üretilen rekombinant sfGFP-TGF- β 3 proteinini yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini incelemek için 2 ng/mL ve 10 ng/mL proteinin BJ hücrelerinin göçü üzerindeki etkilerini araştırmak için in vitro çizik yara iyileşme testi yapmıştır. Deney sonucunda 24. Saatte bütün çizik yara alanı kapanmış ve üretilen proteinin hücre göçünde etkili olduğu kontrol grupları ile karşılaştırıldığında anlaşılmıştır (Bilgin,2023). Yapılan çalışmamızda lazer verilen ve verilmeyen toplam 4 pleyt oluşturulmuştur. 24. Saat ve 48. saat periyotlarında WoundHealing protokolünde 60 s her kuyucuğa lazer uygulama yapılmıştır. Her uygulama sonrası bütün pleytlerin fotoğrafları çekilmiştir. 24. Saat sonunda lazer terapi uygulanmayan BJ hücrelerinin hepsi tamamen kapanmazken lazer terapi uygulanan gruplarda oluşturulan yara alanının hepsinin tamamen kapandığı görülmüştür (Şekil 4-4, 4-5, 4-6, 4-7). Yapılan çalışma sonucunda lazer terapi uygulanan BJ hücrelerinin daha çabuk kapandığı ve verilen lazerin toksik etki oluşturmadığı yada BJ hücrelerini yakmadığı, rekombinant olarak üretilen proteinin sfGFP-TGF- β 3'ün hücrelerde negatif kontrole göre de daha fazla kapanma oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Çıkan bu sonuçlar; literatür özetleri (Bigin,2023, Nawshad,.2004, Ahmed ve ark.,2004, Jalali ve ark.,2003) ile örtüşmekte olup üretilen rekombinant proteinin sfGFP-TGF- β 3'ün yara iyileşmesinde etkili olduğu ve ikinci bir etken olarak lazer terapi bu iyileşme hızını daha da artırdığını göstermiştir.

Povidon-iyot (PVI) esas olarak bir antimikrobiyal ajan olarak bilinmektedir. Basınç yaralarının neden olduğu tıkanıklık ödem ve ağrıyı azaltabildiği kabul edilmektedir. Wang ve arkadaşları PVI ve TGF- β proteininin cilt yaraları üzerine yapmış olduğu kıyaslamada, sıçanların sırt kısımlarını 10 mm steril zımba ile delerek dört adet yara

oluşturmuşlardır. Oluşturulan yaraların ikisine hiçbir işlem yapmayıp diğer ikisine PVI ve TGF- β içeren gazlı bez ile 5 gün boyunca birer saat pansuman yapmışlardır. Deneyin sonucunda TGF- β proteininin akut cilt yaralarında etken rol oynadığını saptamışlardır (Wang ve ark.,2017). Mori ve arkadaşları lavanta yağının yara iyileşmesindeki etkilerini araştırırken, sıçanlarda oluşturdukları deri yaralarına 14 gün boyunca topikal olarak lavanta yağı uygulamışlar ve yara iyileşmesinde olumlu sonuçlar almışlardır. Lavanta yağı ile işlem yapılan yaralarda TGF- β 3 proteininin daha fazla olduğunu ve daha hızlı iyileştiğini belirlemişlerdir (Mori ve ark.,2016). Yapılan tez çalışması ile literatür sonuçları (Wang ve ark.,2017, Mori ve ark.,2016) kullanılan dozaj miktarı ile örtüşmektedir. Sıçanların dorsal kısmında açılan yaralara iki günde bir uygulanan 200 ng\ mL sfGFP-TGF- β 3 proteininin 14 gün sonunda kontrol gruplarından daha hızlı ve daha fazla yüzey alanı iyileşme oranı gösterdiği şekil 4-5 ve 4-7’de görülmektedir.

Vidinski ve arkadaşları tarafından diyod lazerin cilt yara iyileşmesine etkisinin olup olmadığı ile ilgili yapılan çalışmada; 24, 48, 120, 168 saat aralıkları ile 21 Sprague-Dawley sıçanları kullanılarak genel anestezi altında sıçanların omurgalarının sol ve sağ taraflarına 3,5 cm uzunluğunda paralel iki cilt insizyonu yapılmış ve hemen dikilmiş. Sol yaralar günlük olarak diyot lazer (670 nm) ile uygulaması yapılmış. Sağ yaralar kontrol olarak kullanılmıştır. Ameliyattan 72, 96 ve 144 saat sonra deri yaralarının örnekleri histolojik değerlendirme için çıkarılmış. Biyolojik örnekler hematoksilen ve eozin ile boyanmış ve histopatolojik olarak değerlendirilmiş. Lazer uygulama sonrası 72, 96, 144 saat değerlendirmelerde sol tarafta bulunan yaraların daha hızlı iyileştiği ve sağ taraftaki yaraların daha yavaş iyileştiği saptanmıştır. Histolojik değerlendirmelerde ise, enflamatuvar fazın daha erken gerilediğini, yeniden epitelizasyonun daha hızlı tamamlandığını ve olgunlaşma fazında hızlanma olduğu kanısına varılmıştır. Biyostimülasyonun in vivo cilt yara iyileşmesinin tüm aşamaları üzerindeki olumlu etkilerinin olduğu kanısına varılmıştır. Tez çalışmasında 5 farklı gruplar oluşturulmuş ve ikişer gün ara ile toplamda 14 gün protein ve diyod lazer uygulaması yapılmıştır. 5 gruptan bir tanesi olan sadece lazer uygulaması yapılan tedavi grubumuz 1. gün lazer uygulamasından başlayarak 14. Gün lazer uygulamasına kadar kontrol grupları ile kıyaslandığında literatür ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Şekil 4-17 genel iyileşme oranları grafiğinde 14 gün aralıklı iyileşme verileri verilmiştir. Bu iyileşme verilerine

bakıldığında 14.gün sonunda kontrol grubu olarak ayarlanan sadece kesi oluşturulup hiçbir işlem yapılmayan kontrol grubundan daha hızlı ve daha fazla iyileşme yüzey alanına sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuçlarda literatür ile uyumlu olup diyod lazer uygulamasının yara iyileşmesinde etkin olduğu gösterilmiştir.

Tez çalışmasında oluşturulan 5 gruptan birisi olan tedavi grubuna hem üretilen sfGFP-TGF- β 3 proteini hem de diyod lazer iki günde bir uygulanmıştır. Bu grup üyelerinde yer alan yaralar hem alan hem de iyileşme hızı olarak kıyaslandığında kontrol gruplarından ve sadece lazer uygulanan gruptan da yüksektir. Bu sonuçta bize yara iyileşme sürecinde TGF- β 3 proteininin aktif rol oynadığını göstermektedir. Safavi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da düşük doz lazerin TGF-Beta gen ekspresyonunu uyarıcı etkisini ortaya koymuştur (Safavi ve ark.,2008). Şekil 4-17 genel iyileşme grafiğinde de bu sonuçlar doğrulanmaktadır. 1- 14 gün arasındaki iyileşme yüzdelere bakıldığında sfGFP-TGF- β 3 proteini ve lazer uygulanan grubun değerleri literatür özetleri ile uyumlu sonuçlar vermektedir.

Sonuç olarak gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında TGF- β 3 proteini rekombinant olarak sfGFP proteini ile birlikte inklüzyon cisimciği oluşturmaması için füzyon şeklinde *E.coli* hücrelerinde üretilmiştir. sfGFP-TGF- β 3 füzyon proteini ve diyod lazer in vitro çalışmalarında literatür özetleri ile örtüşen sonuçlar vermiştir ve toksik bir etki oluşturmamış ve yara iyileşmesinde etkin rol aldığı BJ hücrelerinde uygulanan kapanma oranlarından ve hazırlanan grafiklerden anlaşılmıştır. Tez çalışmasının diğer bir aşaması olan in vivo canlı hayvan deneylerinde 5 grup oluşturulmuş ve 50 adet sıçan bu gruplara dağıtılmıştır. Bütün grupların dorsal kısmına yaralar oluşturulup 2 günde bir tedavi için hem sfGFP-TGF- β 3 füzyon proteini hem de diyod lazer gruplarına göre uygulanmıştır. 7. Günde hayvanların yarısı, 14.günde de diğer kalan denekler kurban edilerek histolojik incelemeler için örnekler alınmıştır. Alınan örnekler histolojik olarak incelenmiş ve Üçlü boyama, hematoxilen-eozin boyama uygulanmıştır. Yapılan işlemler sonrasında, sfGFP-TGF- β 3 proteini, diyod lazer uygulaması ayrı ayrı yara iyileşme sürecinde kullanılabilecek stratejilerden olabileceği düşünülmektedir. Fakat hem sfGFP - TGF- β 3 hem de diyod lazer uygulanan grup bütün aşamalarda elde edilen verilerde dikkat çekmiştir ki; Diyod lazerin büyüme faktörü ekspresyonu proteinleri artırıcı etkiye sahip

olduğu, yara iyileşmesinde artış, epitelizasyon, anjiyogenez ve mikro dolaşımda etkin olduğu, sfGFP-TGF-β3 proteininin fotobiyomodölasyon özelliğinin olduğu, TGF-β3 proteininin yara iyileşmesinde de aktif bir ajan olduğundan kaynaklandığı düşünölmektedir.

Çalışma sonucuna göre E. coli ekspresyon sisteminde çözünür formda üretilen sfGFP - TGF-β3 füzyon proteini, Diyod lazer uygulamasının ve sfGFP - TGF-β3 + Diyod lazer uygulamasının yara iyileşme sürecini destekleme potansiyeline sahip ajanlar olabileceğı düşünölmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Acikgoz, S.; Ulusu, Y.; Akin, S.; Sonmezoglu, S.; Gokce, I.; Inci, M. N. Photoinduced electron transfer mechanism between green fluorescent protein molecules and metal oxide nanoparticles. *Ceram. Int.* 2014, 40, 2943-2951.
- Ahmed S, Liu CC, Nawshad A. Mechanisms of palatal epithelial seam disintegration by transforming growth factor (TGF) β 3. *Dev Biol.* 2007 Sep 15;309(2):193-207. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.06.018. Epub 2007 Jun 29. PMID: 17698055; PMCID: PMC2084085.
- Ahrar, K., Gowda, A., Javadi, S., Borne, A., Fox, M., McNichols, R., ... Stafford, R.J. (2010). Preclinical assessment of a 980-nm diode laser ablation system in a large animal tumor model. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 21(4), 555-561. doi:10.1016/j.jvir.2010.01.002
- Aimbire F, Albertini R, Pacheco MT, Castro-Faria-Neto HC, Leonardo PS, Iversen VV, et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF α levels in acute inflammation. *Photomedicine and laser surgery.* 2006;24(1):33-7. Epub 2006/03/01.
- Aksoy G, Kanan N, Akyolcu N. Cerrahi hemşireliği I. (4. Basım). Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul, 2017: 79-114.
- Alonso JE, Lee J, Burgess AR, et al: The management of complex orthopaedic injuries. *Surg Clin North Am* 1996; 76: 879 – 903.
- Anderluh G, Gokce I, Lakey H 2003 expression of proteins using the third domain of the Escherichia coli periplasmic protein TolA as a fusion partner. *Protein Expression and Purification* 28, 173-181
- Antsiferova, M.; Werner, S. The bright and the dark sides of activin in wound healing and cancer. *J. Cell Sci.* 2012, 125, 3929–3937.
- Aoki A, Takasaki AA, Nagai S, Yoshida I, Zeredo JL, Mizutani K, et al. Current status of clinical laser applications in periodontal therapy. *General dentistry*, 2008;56(7):674
- Arroyo, H.H., Neri, L., Fussuma, C.Y., & Imamura, R. (2016). Diode laser for laryngeal surgery: a systematic review. *International Archives of Otorhinolaryngology*, 20, 172-179. doi:10.1055/s-0036-1579741.
- Aydın OE, Tan Ö, Çinal H, Kara M, Çakmak MA. Deneysel Yara Modelleri. *Türkiye Klinikleri J Plast Surg-Special Topics* 2015; 4: 5-11
- Baum CL, Arpey CJ: Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005; 31: 674 –86
- Berger, N., & Eeg, P.H. (2006). *Veterinary laser surgery a practical guide* (pp.3- 182). United States, Blackwell Publishing.
- BİLGİNS.; (2023), Expression Strategy of Soluble Recombinant Human TGF- β 3 in Escherichia coli: sfGFP -FusionTag. *Sakarya University Journal of Science*, 27(1), 204-213, DOI: 10.16984/sofenbilder.1096298
- Broughton G, Janis JE, Attinger CE: The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(7 suppl): 12S – 34S

- Chiquet M, Katsaros C, Kleetsas D. Oral yara iyileşmesi ve onarımında dişeti ve mukoperiosteal fibroblastların çoklu fonksiyonları. *Periodontol* 2000. 2015; 68 (1):21–40. doi: 10.1111/prd.12076
- Cohen R. The Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology, Lasers in periodontics (Academy report). *J Periodontol*, 2002;73:1231-9
- Coşkun Ö, Uzun G, Dal D ve ark. Kronik yarada tedavi yaklaşımları *Gülhane Tıp Derg* 2016;58:207-28
- Dinç, B., & Or, E.M. (2014). Farklı tipte lazerlerin veteriner hekimlikte kullanımı. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 7(3), 1-10.
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007; 127(3):514–25.
- Eming SA, Martin P, Canic MT: Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine* 2014; Vol. 6, Issue 265, pp. 265-6
- Fukuda H., Arai M., Kuwajima K. Folding of green fluorescent protein and the cycle3 mutant. *Biochemistry*. 2000;39:12025–12032. doi: 10.1021/bi000543l
- Gökçe I, Protein Ekspresyonu İçin Yeni Bir Füzüyon Sistemi, XX. Ulusal Kimya Kongresi Erciyes Üniversitesi, 4-8 Eylül 2006, Kayseri
- Gökçe I, Raggett, E.M., Hong Q, Virden R, Cooper A, Lakey JH 2000 The TolA recognition site of colicin N: ITC SPR and stopped flow fluorescence defines a crucial 27 residue segment *Journal of Molecular Biology* 304 (4), 621-632
- Goldman R: Growth factors and chronic wound healing: past, present and future. *Adv Skin Wound Care* 2004; 17: 24 – 35.
- Greenhalgh DG: The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 1019-30.
- Gumusderelioglu M. Fototerapinin Yeri. *Bilim ve Teknik, TÜBİTAK Yayınları*. Şubat 2015.
- Guo S and DiPietro LA: Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010; 89: 219.
- Hosseinpour S, Fekrazad R, Arany PR, Ye Q. Molecular impacts of photobiomodulation on bone regeneration: A systematic review. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2019. Epub 2019/04/20.
- Karoussis IK, Kyriakidou K, Psarros C, Afouxenides P, Vrotsos IA. Dosage Effects of an 810 nm Diode Laser on the Proliferation and Growth Factor Expression of Human Gingival Fibroblasts. *J Lasers Med Sci*. 2021 Jun 20;12:e25. doi: 10.34172/jlms.2021.25. PMID: 34733748; PMCID: PMC8558727.
- Komarcevic A: The modern approach to wound treatment. *Med Pregl* 2000; 53: 363 – 8 [in Croatian].
- Lagan KM, Clements BA, McDonough S, Baxter GD. Low intensity laser therapy (830nm) in the management of minor postsurgical wounds: a controlled clinical study. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 2001;28(1):27-32
- Langer, E. S., 2012. Biomanufacturing outsourcing outlook. *BioPharm International*, 25 (2), 15-16.
- Laverty, H.G.; Wakefield, L.M.; Occleston, N.L.; O’Kane, S.; Ferguson, M.W. Tgf-beta3 and cancer: A review. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009, 20, 305–317.
- Li S, Huang NF, Hsu S: Mechanotransduction in endothelial cell migration. *J Cell Biochem* 2005; 96: 1110 – 26.

- Lister T., Wright P.A., Chappell P.H. Optical Properties of Human Skin. *JBO*. 2012;17:090901. doi: 10.1117/1.JBO.17.9.090901.
- Lubart R, Lavi R, Friedmann H, Rochkind S. Photochemistry and photobiology of light absorption by living cells. *Photomedicine and laser surgery*. 2006;24(2):179-85. Epub 2006/05/19.
- Macdonald J, Asiedu K. WAWLC: World Alliance for Wound and Lymphedema Care. *Wounds* 2010; 22: 55-9.
- Massague, J. TGF β signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012, 13, 616–630.
- Mercandetti M, Cohen AJ. Wound healing and repair. Available 2013 from: <https://emedicine.medscape.com/article/1298129-overview>
- Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *American journal of surgery*. 1971;122(4):532-5. Epub 1971/10/01.
- Mori HM, Kawanami H, Kawahata H, Aoki M. Wound healing potential of lavender oil by acceleration of granulation and wound contraction through induction of TGF- β in a rat model. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:144. doi: 10.1186/s12906-016-1128-7.
- Nandi S, Brown AC. Characterizing cell migration within three-dimensional in vitro wound environments. *J Vis Exp* 2017; 126: doi: 10.3791/56099.
- Nawshad A, Lagamba D, Hay ED. Transforming growth factor beta (TGF β) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT) *Arch Oral Biol*. 2004;49:675–689.
- Jalali A, Zhu X, Liu C, Nawshad A. Induction of palate epithelial mesenchymal transition by transforming growth factor β 3 signaling. *Dev Growth Differ*. 2012 Aug;54(6):633-48. doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01364.x. Epub 2012 Jul 8. PMID: 22775504; PMCID: PMC3419321.
- Öztopalan DF, Işık R, Durmuş AS. Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin rolü. *Dicle Üniv Vet Fak derg* 2017;10:83-8.
- Pédélecq J-D, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC, Waldo GS. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. 2006;24(1):79–88.
- Passanezi E, Damante CA, de Rezende MLR, Greggi SLA. Lasers in periodontal therapy. *Periodontology* 2000, 2015;67(1):268-91.
- Pham, P. V. (2018). Medical biotechnology: techniques and applications. In *Omics Technologies and BioEngineering* (pp. 449-469). Academic Press.
- Porro, D., Sauer M., 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Mol. Biotechnol.*, 31 (3), 245-259.
- Richard W.D. Gilbert, Matthew K. Vickaryous and Alicia M. Vitoria-petit, Signalling by Transforming Growth factor Beta Isoforms in Wound Healing and Tissue Regeneration *Journal of Developmental Biology* 2016
- Richardson M: Acute wounds: an overview of the physiological healing process. *Nurs Times* 2004; 100: 50 – 3.
- Robson MC, Steed DL, Franz MG: Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* 2001; 38: 72 – 140.
- Safavi SM, Kazemi B, Esmaeili M, Fallah A, Modarresi A, Mir M, 2008. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β , bFGF, and PDGF in rat's gingiva. *Lasers in medical science*, 23, 3, 331-5

- Smith RJ, Birndorf M, Gluck G, Hammond D, Moore WD. The effect of low energy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models. *Plastic and reconstructive surgery*. 1992;89(2):306-10. Epub 1992/02/01.
- Sprugel KH, McPherson JM, Clowes AW. Effects of growth factors in vivo: 1. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers. *Am J Pathol* 1987;129:601-13.
- Szymanska J, Goralczyk K, Klawe JJ, Lukowicz M, Michalska M, Goralczyk B, et al. Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β secretion. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2013;64(3):387-91. Epub 2013/08/21
- Tayhan E. S., S. Bilgin, M. Elmastaş, 'Teucroside'nin Yara İyileştirme Potansiyelinin Değerlendirilmesi', *Int. J. Biochem Biyoteknoloji* 2018, 2, 16–19.
- T.C. Ticaret Bakanlığı, “İlaç ve Eczacılık Ürünleri Sektörü”, Ankara, (2021) p:1.
- Tsien R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, 67, 509-44 doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509
- Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers in surgery and medicine*. 2007;39(4):373-8. Epub 2007/04/26.
- Valluru, M.; Staton, C.A.; Reed, M.W.; Brown, N.J. Transforming growth factor- β and endothelial signaling orchestrate wound healing. *Front. Physiol.* 2011, 2, 89.
- Vidinsky B, Gal P, Toporcer T, Balogacova M, Hutnanova Z, Kilik R, Bober J, Sabo J, Longauer F, 2005. [Effect of laser irradiation of diode laser on healing of surgical wounds in rats]. *Rozhledy v chirurgii mesicnik Ceskoslovenske chirurgicke společnosti*, 84, 8, 417-21
- Viloria-Petit, A.; Richard, A.; Zours, S.; Jarad, M.; Coomber, B.L. Role of transforming growth factor β in angiogenesis. In *Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis*, *Advances in Biochemistry in Health and Disease*; Mehta, J., Dhalla, N.S., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2013; Volume 6, pp. 23–45.
- Wang L, Qin W, Zhou Y, Chen B, Zhao X, Zhao H, Mi E, Mi E, Wang Q, Ning J. Transforming growth factor β plays an important role in enhancing wound healing by topical application of Povidone-iodine. *Sci Rep*. 2017 Apr 20;7(1):991. doi: 10.1038/s41598-017-01116-5. PMID: 28428640; PMCID: PMC5430510.
- Yang F, Moss L.G ve Phillips G.N (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 14(10), 1246-1252. Doi: 10.1038/nbt1096-1246
- Young VL, Bush J, O'Kane S. A new approach for the prophylactic improvement of surgical scarring: avotermin (TGF β 3). *Clin Plast Surg*. 2009 Apr;36(2):307-13, viii. doi: 10.1016/j.cps.2008.11.008. PMID: 19309655.
- Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA. TGF- β isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int*. 2003 Sep;64(3):844-56. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00162.x. PMID: 12911534.
- Zhu Y, Zhou Q, Wang Y. [Role of transforming growth factor β 3 on amylase secretion of submandibular gland cells in rat]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2004 Nov;18(6):490-3. Chinese. PMID: 15586711.