



TIP TEKNO'17

TIP TEKNOLOJİLERİ KONGRESİ

12-14 Ekim 2017 / TRABZON

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Prof.Dr. Osman Turan Kongre Merkezi



Biyomedikal ve Klinik
Mühendisliği Derneği



Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü
Bilgisayar Mühendisliği Bölümü

Biyomalzeme 2

14 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon B

RGD Peptidin Doku İskelesiz Mikrodokunun Öncül Damarlanmasına Etkisi

The Effect of RGD Peptide on Pre- Vascularization of Scaffold-free Microtissue

Ziyan Buse YARALI¹, Ozan KARAMAN¹

¹Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Ziyanbuse.yarali@ikc.edu.tr

ozan.karaman@ikc.edu.tr

Özetçe— Damarlanma organ ve dokuların canlılığının devam etmesi ve implante edilecek dokunun red edilmemesi için önemli bir süreçtir. HUVEC (İnsan Kordonu Damar Endotel Hücreleri), endotel kaynaklı hücrelerdir. Damarlanma sürecinde etkili rol oynayan model hücre tiplerinden bir tanesi olmakla birlikte 3B (boyutlu) doku oluşturması açısından da oldukça yaygın kullanılmaktadır. 3B dokular damarlanma sürecinin etkili şekilde görülmesine ve hücrelerin kendi hücre dışı matrikslerini sentezlemesine izin vermektedir. 2B hücre kültürüne göre hücrelerin fizyolojik durumunun korunması ve gen ifadelerinin düzenlenmesi açısından yaygın kullanılması ile birlikte sonuçların doğal ortamları yansıtmaması açısından da avantajı sahiptir. RGD peptidleri ise hücrelerin birbiriyle iletişimini artırarak hücre proliferasyonunu artırıcı rol oynayan GRGDS diziliminden oluşan kısa ve etkili peptid dizileridir. Tüm bunlar değerlendirildiğinde RGD peptidin HUVEC hücrelerinin şartlandırılmış ortam ile 3B'lu hücre kültüründe öncül damar oluşumu sağlanarak hücrelerin iletişimini ve dolayısıyla öncül damarlanma hızının arttırılacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler — Öncül Damarlanma, HUVEC, RGD, 3 Boyutlu Hücre Kültürü.

Abstract— Continuation of vitalization of organs and tissues is an important step for rejection of implanted tissue. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) are endothelial derived cells. One of the model cell types that plays an effective role in the vascularization process and it is also widely used in terms of 3D (dimensional) tissue formation. The 3D tissue vascularization process appears to be effective and allows cells to synthesize their own extracellular matrix. The preservation of the physiological conditions of cells according to 2D cell cultures has the advantage of being widely used for the regulation of gene expressions and also the consequences of reflecting the natural environments. The RGD peptides are short and effective peptide sequences consisting of the GRGDS sequence which

promotes cell proliferation by enhancing communication of cells with each other. When all these are evaluated, it is considered that RGD peptide HUVEC cells will increase the cross-talk and thus enhance pre-vascularization in the conditioned medium in the 3D cell culture.

Keywords — Pre-Vascularization, HUVEC, RGD, 3D Cell Culture

GİRİŞ

Damarlanma, implante edilen dokuya besin ve oksijen sağlanması adına oldukça önemli bir oluşumdur. Dokunun canlı kalmasını ve besin ve oksijen transferini sağlamaktadır. Damar yapısının en iç kısmında endotel hücreler yer almaktadır. Öncül damarlanma formunda endotel hücrelerin bulunması 3B'lu yapılarda önemlilik arz etmektedir. HUVEC'ler endotel kaynaklı olup damarlanma çalışmalarında oldukça yaygın kullanılan hücre tipidir [1]. HUVEC 3B'lu hücre kültürü içinde kullanıma uygundur. *In vivo* çalışmalarda gerek etik gerekse ekonomik sorunları barındırması sebebiyle 3B'lu hücre kültürü son yıllarda araştırmacılar arasında popülerite kazanmıştır. 3B'lu kültür ile mikrodokular oluşturularak endotel hücrelerin damarlanma potansiyeli tetiklenebilmektedir ve bu sayede fizyolojik, morfolojik, damarlanma gen ifadelerinin *in vivo* ortama benzer şekilde olması sağlanabilmektedir [1, 2]. RGD dizilimi GRGDS sıralamasından oluşan hücre-hücre tutunumu ve hücre-matriks ilişkisinde görev alan integrin moleküllerinin bağlanma afinitesi yüksek olduğu kısa, hücrelerin birbirine ve hücre dışı matrikse bağlanması konusunda da etkili peptid dizileridir. İntegrin moleküllerine sağlamış olduğu bu özelliklerinden dolayı hücre-hücre ve hücre-matriks iletişimini etkileyip HUVEC'lerin damarlanma oluşumuna katkı sağlayabilmektedir [3-6]. Bu çalışmada integrin moleküllerine bağlanan RGD peptidinin HUVEC 3B'lu mikrodokusunun damarlanma sürecindeki etkisi değerlendirilmiştir.

Biyomalzeme 2

14 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon B

MATERYAL VE METOD

3B'lu Hücre Kültürü

HUVEC pasaj 18-22 arasında kullanılmıştır. 2B'lu hücre kültürü yapıldıktan sonra 3B'lu hücre kültürüne başlanmıştır. 3B'lu kültür ticari olarak satın alınan 3D Petri Dish ile yapılmıştır. 330 µl agaroz kullanılıp ortama alıştırıldıktan sonra 100,000/75 µl ile mikrodokular oluşturulmuştur.

RGD Peptid Sentezi

RGD peptidleri, GRGDS aminoasitleri sırasıyla rezin reçinesi üzerine tutturularak ve sonuçları Kaiser Testi ile bakılarak manuel olarak sentezlenmiştir. Rezin reçinesi üzerinden ayırma protokolü ile ayrılarak saf şekilde elde edilmiştir.

RGD'nin Hücre Kültürüne Uygulanması

RGD miktarları 0 mM, 1 mM ve 2 mM olacak şekilde tartılmıştır. Gruplar 0 mM (negatif kontrol), 1 mM ve 2 mM ve %10 FBS (pozitif kontrol) olarak ayarlanmıştır. EGM-2 (Lonza, SingleQuots™ Kit) farklılaştırma ortamı ile karıştırılıp filtreden geçirilmiştir ve 500 µl ile kültüre uygulanmıştır. Her grup 3 kez tekrar edilmiştir (n=3).

Mikrodoku Boyut Analizi

1. 4. ve 7. günlerde 3 farklı mikrodokudan en az 3 kez boyut görüntüleri alınmıştır. Her ölçüm Image-J (NIH) ile hesaplanmıştır. Ortalama değerleri alınmıştır.

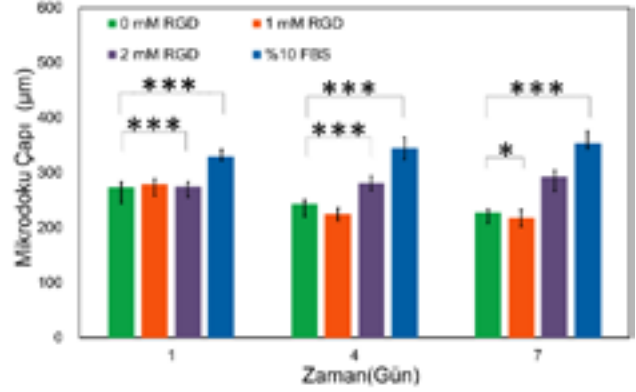
Canlılık Analizi

Mikrodoku Canlılık Analizi Double Staining Kit (Dojindo) ile yapılmıştır. Kit içeriğinde ki 1 mmol/L solution A-yeşil (Kalsein-AM/DMSO) and 1,5 mmol/L solution B-kırmızı (PI/saf su) boya ile canlı-ölü hücre ayırt edilmiştir. Kalitatif olarak canlılık analizini belirleyebilmektedir.

SONUÇLAR

Mikrodoku Boyut Analizi

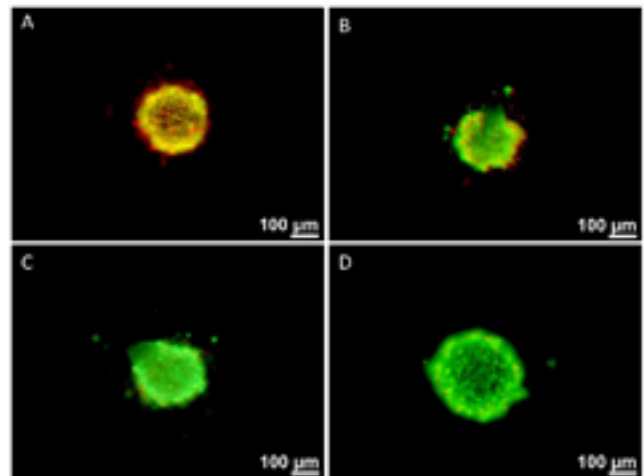
2 mM RGD, 1 mM RGD, 0 mM RGD (negatif kontrol) ve pozitif kontrol olarak kullanılmış olduğumuz %10 FBS mikrodokularda çap değişimleri grafik olarak Şekil 1'de ifade edilmiştir. 1. 4. ve 7. günlerde 0 mM RGD ve %10 FBS arasında çok yüksek düzeyde anlamlı fark görülürken (**p<0,001), yine 1. ve 4. günde 0 mM ve 2 mM arasında (p<0,001) da çok yüksek anlamlı fark olduğu görülmektedir. 7. Gün sonuna gelindiğinde pozitif kontrolün yanında 1 mM RGD içeren mikrodoku boyutunda da anlamlı farkla karşılaşılmaktadır (*p<0,05).



Şekil 1. Mikrodoku Çaplarının Zamana Bağlı Değişim Grafiği

Canlılık Analizi

7.günde yapılmış olan Canlı&Ölü hücre boyama sonucunda Şekil 2'de belirtildiği üzere hücrelerin 0 mM RGD içeren ortamda oluşturulan mikrodokuların canlılığı oldukça düşük olarak saptanmıştır. 1mM RGD içeren ortamda oluşan mikrodokuların canlılık oranı 0 mM RGD 'e göre oldukça yüksektir. 2 mM RGD içeren ortamla karşılaştırıldığında ise 0 mM RGD ortamının ölü hücre yoğunluğu oldukça fazladır. %10 FBS içeren mikrodoku canlılığı oldukça yüksek iken, 0 mM RGD içeren mikrodokuların canlılık oranı düşük olarak saptanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan %10 FBS grubunun canlılık oranı 2mM RGD içeren ortam ile karşılaştırıldığında yeşil boya miktarlarında neredeyse eşitlik görülmektedir. Bu da canlılık oranının birbirine yakın olduğunu ifade etmektedir.



Şekil 2. Mikrodoku Canlılık Analiz Sonucu A) 0 mM RGD B) 1 mM RGD C) 2 mM RGD D) %10 FBS



Biyomalzeme 2

14 Ekim 2017 - 09.00-10.30 - Salon B

TARTIŞMA

2 mM RGD içeren mikrodokuların çapları, pozitif kontrol olarak kullanılan %10 FBS içeren mikrodoku çaplarıyla kıyaslandığında 1. ve 4. günler boyunca artış göstermiş ve 0 mM RGD ortamına göre (***) $p < 0,001$ ise çok yüksek düzeyde anlamlı fark tespit edilmiştir. Diğer grupların mikrodoku çaplarında azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca 2 mM RGD içeren mikrodokuların canlılık oranları pozitif kontrol olarak kullanılan %10 FBS içeren ortamlarla kıyaslandığında bile canlılık oranının neredeyse aynı olduğu gözlemlenmiş, canlı hücrelerin ölü hücre oranından daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu durum, RGD peptidinin canlılık oranını katkı sağladığını göstermektedir. Ancak 1 mM RGD peptid içeren mikrodokularda çaplar 1. 4. ve 7. günlerde 0 mM RGD'ye benzer şekilde azalmış ve 7. gün sonunda da anlamlı düşüş gözlemlenmiştir. Canlılık oranına bakıldığında da 0 mM RGD ye benzer şekilde ölü hücre yoğunluğunun yüksek olduğu saptanmıştır. Bu da 1 mM RGD içeren mikrodokuların RGD miktarının vasküler formu oluşturmada yetersiz olduğunu göstermektedir. %10 FBS içeren ortamdaki mikrodokuların canlılık oranı oldukça yüksektir, vaskülerize mikrodoku oluşumunda 7.günde hücre canlılığı devam etmektedir. 0 mM RGD içeren mikrodokularda ise vaskülerize mikrodoku oluşumu gözlemlenmesine rağmen ortamda protein ve peptid bulunmadığı için canlılık oranında ve mikrodoku çapında düşüş saptanmıştır [7, 8].

Bu araştırma RGD miktarının 2 mM olduğunda optimum düzeyde HUVEC mikrodokularının öncül damarlanmasına pozitif yönde etki edeceğini göstermektedir. Bu çalışma sonraki çalışmalar için RGD ve mikrodoku ilişkisi arasında bağlantı kurması adına ön araştırma niteliği taşımaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından finanse edilen 2016-ÖDL-MÜMF-0008 nolu BAP projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKÇA

- [1]. Zuppinger, C., *3D culture for cardiac cells*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(7 Pt B): p. 1873-81.
- [2]. Wenger, A., et al., *Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering*. Tissue Eng, 2004. **10**(9-10): p. 1536-47.
- [3]. Bellis, S.L., *Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials*. Biomaterials, 2011. **32**(18): p. 4205-10.
- [4]. Hersel, U., C. Dahmen, and H. Kessler, *RGD modified polymers: biomaterials for stimulated*

cell adhesion and beyond. Biomaterials, 2003. **24**(24): p. 4385-4415.

- [5]. Lin, R.Y., et al., *Targeted RGD nanoparticles for highly sensitive in vivo integrin receptor imaging*. Contrast Media Mol Imaging, 2012. **7**(1): p. 7-18.
- [6]. Sanchis, E.G., et al., *Apoptosis and cell proliferation in porcine placental vascularization*. Animal Reproduction Science, 2017.
- [7]. Jiang, L.Y., B. Lv, and Y. Luo, *The effects of an RGD-PAMAM dendrimer conjugate in 3D spheroid culture on cell proliferation, expression and aggregation*. Biomaterials, 2013. **34**(11): p. 2665-73.
- [8]. Itakura, S., et al., *Effective capture of proteins inside living cells by antibodies indirectly linked to a novel cell-penetrating polymer-modified protein A derivative*. Febs j, 2015. **282**(1): p. 142-52.