

Perikardial Sıvıdan İzole Edilen Hücrelere Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF-2) Etkisinin Analizi

Dilek SÖNMEZER¹, Güler TOPRAK², Ayhan DÜZLER², Fatma LATİFOĞLU^{2*}

¹ Çukurova Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Adana

² Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri

² Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Kayseri

² Erciyes Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Anatomi Bölümü, Kayseri

Sorumlu yazar e-posta: flatifoglu@erciyes.edu.tr ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2018-9616>

dsonmezer@cu.edu.tr ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-9017-2943>

glrtoprak@gmail.com ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-7679-4853>

duzler@erciyes.edu.tr ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-9515574X>

Geliş Tarihi: 14.12.2019

Kabul Tarihi: 20.11.2020

Öz

Perikardiyal sıvı (PF) heterojen bir hücre topluluğuna sahiptir. Bu hücrelerden biri de mezenkimal kök hücre özelliği taşıyarak başka hücrelere farklılaşma potansiyeline sahip olan mezotelyal hücrelerdir. Bu hücrelerin sayısı doku hasarıyla birlikte artarak büyüme faktörleri (VEGF, FGF-2, PDGF, TGF- β) ve ekstrasellüler matriks (ECM) moleküllerini sentezleyerek doku/organda meydana gelen hasarın onarımında önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmada mezotelyal hücrelerin hücre kültür ortamına FGF-2 (basic fibroblast growth factor)' nin eklenmesiyle mezotelyal hücrelerin vasküler doku oluşumuna etkisi incelenmiştir. Bu amaçla büyüme faktörü eklenmiş ve büyüme faktörü eklenmemiş olan kontrol grubu hücrelerinin birinci ve beşinci günlerdeki ışık mikroskobu görüntüleri kullanılarak analiz edilmiştir. Bu görüntüler ve görüntü histogramları kullanılarak Hjorth parametreleri olan mobilite, aktivite ve komplekslik özellikleri, çarpıklık, basıklık ve entropi değerleri kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Birinci ve beşinci günlerde FGF-2 eklenen ve eklenmeyen kültürdeki hücrelerin görüntülerinden hesaplanan özneliklerin gruplar arasındaki farklılığı değerlendirmek için istatistiksel analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre birinci günde iki grup arasında ve beşinci günde iki grup arasında bağımsız örneklem t testi ve Mann-Whitney U testi neticesinde anlamlı farklılıklar olduğu ($p < 0.05$) görülmüştür. Doku hasarının giderilmesi için gerekli olan ECM bileşenleri ve büyüme faktörlerini sentezleyebilen mezotelyal hücrelerin literatürde yaygın olarak kullanılan mezenkimal kök hücreye alternatif olarak kullanılabileceği bu ön çalışma ile ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler

Perikardiyal Sıvı;
Mezotelyal Hücre;
bGFG (FGF2); Hjorth
Parametreleri; Doku
Mühendisliği

Analysis of Fibroblast Growth Factor (FGF-2) Effect on Cells Isolated from Pericardial Fluid

Abstract

Pericardial fluid (PF) has a heterogeneous cell population. One of these cells is mesothelial cells that have the potential to differentiate into other cells, such as mesenchymal stem cells. The number of these cells increases with tissue damage and plays an important role in the repair of tissue/organ damage by synthesizing growth factors (VEGF, FGF-2, PDGF, TGF- β) and extracellular matrix (ECM) molecules. In this study, the effect of mesothelial cells on vascular tissue formation was investigated by adding FGF-2 (basic fibroblast growth factor) to cell culture medium. For this purpose, control group cells and groups of added growth factor were analyzed using light microscopy images at the first and fifth days. Using these images and image histograms, Hjorth parameters which are mobility, activity, complexity and, kurtosis, skewness and entropy values were analyzed statistically. On the first and fifth days, statistical analysis was performed to evaluate the differences between the groups calculated from the images of cells in culture with FGF-2 and without FGF-2 addition. According to the results of independent samples t test and Mann-Whitney U test showed significant differences between the two

Keywords

Pericardial Fluid;
Mesothelial Cell; Basic
Fibroblast Growth
Factor (bGFG /FGF2);
Hjorth Parameter;
Tissue Engineering

groups on the first day and between the two groups on the fifth day ($p < 0.05$).

It was demonstrated with this preliminary study that mesothelial cells, which can synthesize ECM components and growth factors required for tissue damage, can be used as an alternative to mesenchymal stem cells the commonly used in tissue engineering applications.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1. Giriş

Doku mühendisliği fonksiyonunu kaybetmiş doku/organın tedavisinde birçok bilim dalının birlikte çalıştığı disiplinler arası bir çalışmanın ürünüdür. Vücudumuzun her bölgesinde hasarın kısa sürede onarımını sağlayıcı ve dokunun eski halini almasını sağlayan kök hücreler bulunmaktadır. Mesotelial hücreler perikard, periton ve pleural bölgelerin iç kısmını kaplayan tek tabakalı mezoteliumu oluşturan kök hücreler gibi farklılaşma potansiyeline sahip, yassımsı/poligonal bir şekle sahiptir.

Kalp rahatsızlığı geçiren hastalarda PF içindeki FGF-2 miktarının artması bilgisinden yola çıkılarak angiogenik özellik taşıyan FGF-2, yeni damar oluşumunu uyarması ve hasarın onarımı için perikardiyal boşluğa enjeksiyonu ile olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Uchida et al. 1995, Fujita et al. 1996, Ornitz et al. 2015, Fujita et al. 1998). FGF-2 nin tavşan ve köpek intraperikardiyaline enjeksiyonu sonucu yeni epikardiyal damarların oluştuğu ve kollateral gelişimin olduğu gözlenmiştir (Landau et al. 1995, Laham et al. 1998, Esch et al. 1985, Dauleh et al. 2016, Schelch et al. 2018).

FGF-2 fibroblast büyüme faktörü ailesinden olup, izoelektrik noktası (pI) 9.6-9.8 olan bir polipeptittir. Özellikle fibroblastik hücreler için mitojenik bir uyarıcı ve heparine yüksek bağlanma afinitesine sahiptir. Ayrıca, kültür ortamında hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşmasında etkili bir sinyal molekülüdür (Laham et al. 1998, Esch et al. 1985, Dauleh et al. 2016, Schelch et al. 2018, Yu et al. 2007).

Mevcut literatür bulguları incelendiğinde dental pulp kök hücresi ile yapılan bir çalışmada FGF-2 konsantrasyonu 2,5 ng/mL'nin hücreyi etkileyen konsantrasyon olduğu ifade edilmiştir (Gorin et al. 2016). Mesotelial hücrelerin vücut içinde kendileri FGF-2 sentezleyebildiğinden ve düşük konsantrasyon FGF-2 miktarının mezotelial

hücrelere etkisinin tespiti için bu çalışmada 1ng/mL FGF-2 besiyeri içeriğine eklenerek 1. ve 5. günlerde hücrelere olan etkisi ışık mikroskobu görüntüleri ile incelenmiştir. Bu görüntülerden sayısal olarak bilgi elde edebilmek ortaya konulan özneliklere göre analiz edilmiştir. Bu öznelikler görüntülerin histogramı ve görüntüsünün kendisinden hesaplanan Hjorth parametreleri, çarpıklık, basıklık ve entropi değerleri kullanılarak elde edilmiştir. Gruplar arası farklılığın ortaya konması için istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Bu çalışma, perikardiyal sıvıdan izole edilen mezotelial hücrelere FGF-2 nin etkisinin incelendiği bir ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Bu açıdan literatüre önemli katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

2. Materyal ve Metot

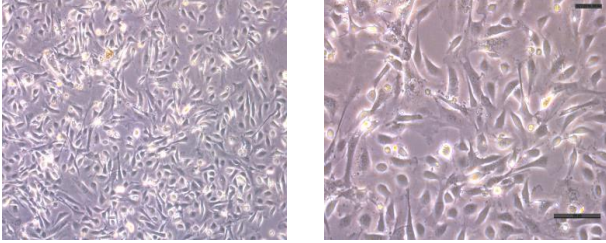
2.1 Sığır kalbinden perikardiyal sıvının alımı

Perikardiyal sıvı kesimhaneye getirilen sağlıklı, 2-3 yaşlarında ve 350-450 kg ağırlığındaki sığırlardan kesiminden hemen sonra alınmıştır. Sığır göğüs kafesi açılarak ve perikardiyumda hasar oluşturmadan perikardiyal boşluğa steril enjektör (50mL) ile girilerek perikardiyal sıvı aspire edilmiştir.

2.2 Perikardiyal sıvıdan hücrelerin izolasyonu

Perikardiyal sıvı örnekleri yaklaşık 30 dk. içinde oda sıcaklığı koşullarında laboratuvara getirilerek iki kez santrifüj edilmiştir. İlk santrifüj 400xg de 5 dk. yapılarak süpernatant kısmı steril yeni bir falkona aktarılarak daha sonra 3500xg de 5dk ikinci santrifüj yapılmıştır. İkinci santrifüj sonunda hücrelerden ayrılmış olan süpernatant (hücresiz perikardiyal sıvı) 0.22 µm lik filtrelerden geçirilerek daha sonra kullanılmak üzere -20°C ye muhafaza edilmek üzere kaldırılmıştır. Pelletdeki perikardiyal sıvı hücreleri (PRSc) 200 µL steril hücresiz

perikardiyal sıvı içinde süspansiyon edilmiştir. Çalışma grubumuzun ortaya koyduğu yöntemle PRSc hücreleri için en iyi besiyeri ortamı olarak belirlenmiş olan Alpha-Mem besiyeri, 10% sıgır serumu (FBS), 250 U/mL penisilin, 250 µg/mL streptomisin, 25 mM glutamin, 20 µg/mL sıgır insülinü olacak şekilde hazırlanmış olan besiyeri içinde, her bir oyukta yaklaşık 1×10^4 hücre olacak şekilde 6 oyuklu kültür kabına ekimi yapılarak 5% CO₂ 37°C olan inkübatöre büyütülmek üzere kaldırılmıştır (Sönmezer vd. 2016, Latifogly vd. 2018). Hücre tutunumu için beklenen 24 saat sonrasında kültür ortamına 1ng/mL FGF-2 eklenerek 1. ve 5.günlerde hücreler ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. Büyüme faktörünün hücelere olan etkisinin analizi, büyüme faktörü eklenmeyen kültürdeki hücrelerin görüntüleri ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Büyüme faktörü eklenmiş ve eklenmemiş olan kültürlerin besiyeri değiştirilmeden sadece besiyeri ilavesi yapılarak kültürlerdeki hücrelerin görüntüleri Şekil 1’ de görüldüğü gibi elde edilmiştir.



Şekil 1. FGF-2 büyüme faktörü eklenmeden önceki tutunmuş olan hücrelerin 10x ve 20x büyütmedeki ışık mikroskobu görüntüleri

Bu görüntülerin sayısal analizi için Hjorth parametreleri olan mobilite (hareketlilik), aktivite (etkinlik), komplekslik (karmaşıklık) ve buna ek olarak entropi, çarpıklık (skewness), basıklık (kurtosis) değerleri hesaplanarak 6 adet öznelik ortaya konmuştur.

2.3 Hjort parametreleri

Görüntülerden öz nitelik elde etmek için Hjorth parametrelerinden yararlanılmıştır. Hjorth parametreleri; mobilite, aktivite ve komplekslik olmak üzere üç tanedir. Mobilite (Eş. 1) bir dizinin birinci türevinin standart sapmasının dizinin

standart sapmasına oranıdır. Mobilite dizinin varyansdır ve enerjisi ile ilişkilidir (Eş. 2). Komplekslik ise dizinin band genişliği ile ilgili bir özellik olarak tanımlanmaktadır (Eş. 3) (Cano et al. 2009, Rozenkrants et al. 2008, Cecchin et al. 2010).

$$\text{Aktivite} = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} [x(n) - \bar{x}]^2 \quad (1)$$

$$\text{Mobilite} = \sqrt{\frac{\text{Aktivite} \left(\frac{dx}{dt} \right)}{\text{Aktivite}}} \quad (2)$$

$$\text{Komplekslik} = \sqrt{\frac{\text{Mobilite} \left(\frac{dx}{dt} \right)}{\text{Mobilite}}} \quad (3)$$

Entropi; düzensizliğin bir ölçüsü olup dizi analizinde farklı entropi hesaplama teknikleri kullanılmakla birlikte bir dizinin entropisi Eş. 4’deki gibi hesaplanmaktadır (Sanei et al. 2011, Alim et al. 2012, Mahaphonchaikul et al. 2010).

$$H(X) = - \sum_{i=1}^M P(X = x_i) \cdot \log_2 P(X = x_i) \quad (4)$$

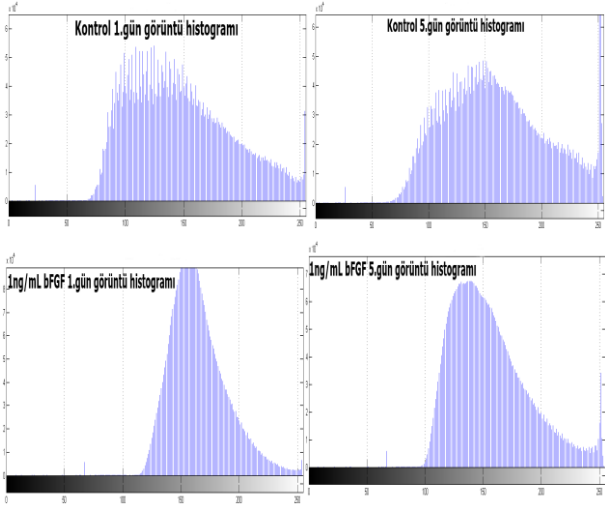
Çarpıklık; Rasgele bir sürecin olasılık dağılımının asimetrisinin bir ölçüsü olarak ifade edilir ve denklemde \bar{Y} ; ortalama, s ; standart sapma ve N dizi sayısını verir ve Eş. 5’deki gibi hesaplanır

$$\text{Çarpıklık} = \frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^3}{(N - 1)s^3} \quad (5)$$

Basıklık rasgele bir sürecin olasılık dağılımı basıklığının bir ölçüsü olarak ifade edilir. Rasgele sürecin, 4. momenti ile Eş. 6’ daki gibi hesaplanır.

$$\text{Basıklık} = \frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^4}{(N - 1)s^4} \quad (6)$$

Şekil 1’de verilen görüntüler 1944x2592 piksel boyutunda olup bu görüntüler 256x256’lık piksel boyutlarındaki görüntülere parçalanmıştır. Yukarıda bahsedilen özellikler her bir görüntü çerçevesi için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bir görüntü için her bir parametreden 70 adet veri elde edilmiştir. Ayrıca, her bir 256x256’lık görüntünün histogramı elde edilerek, belirlenen öznitelikler bu histogramlar için de hesaplanmıştır. Aşağıdaki şekilde kontrol ve büyüme faktörü uygulanmış olan birinci güne ait görüntülerin histogramı görülmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Kontrol ve 1ng/mL FGF-2 eklenmiş olan hücrelerin 1. ve 5.gün görüntülerinin histogramları

Elde edilen parametrelerin gruplar arasındaki farklılığının değerlendirilmesi için istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Öncelikle her bir parametrenin dağılımı incelenerek, normal dağılım gösterenler bağımsız örneklem t testi ile normal dağılım göstermeyenler ise Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir.

2.4 Bağımsız örneklem t testi

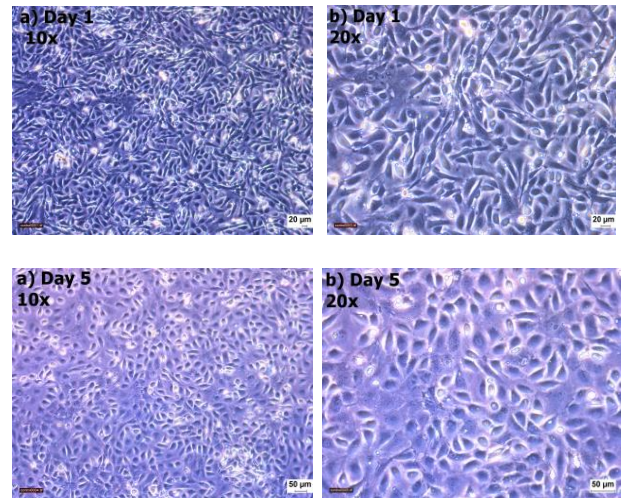
Perikardiyal sıvıdan izole edilen mezotelyal hücrelere 1ng/mL FGF-2 büyüme faktörü eklendiğinde hücre kültüründe meydana gelen değişimin ve FGF-2 eklenmeyen kültürdeki hücrelerdeki farklılığın analizi bağımsız örneklem t testi ile yapılmıştır. Bu test birbirinden bağımsız olan hücre kültür ortamına büyüme faktörü eklenen ve büyüme faktörü eklenmeyen iki grubun ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için yapılmıştır.

parametrik bir testtir. Tam olarak grup ortalamaları arasında gözlenen farkın tesadüfi mi yoksa bağımsız değişkenden mi kaynaklandığını anlamak için bu test yapılmıştır (Vasfi 2014).

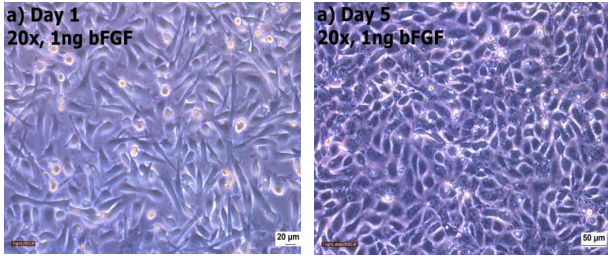
Hücre kültür ortamına büyüme faktörü uygulanan ve uygulanmayan ortamdaki hücrelerdeki farklılık için anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kullanılmıştır.

3. Bulgular

Bu çalışmada perikardiyal sıvıdan izole edilmiş olan mezotelyal hücrelere 1ng/ml FGF-2 büyüme faktörünün eklenmesiyle hücrelerde meydana gelen farklılaşmanın ve doku benzeri yapının oluşumuna etkisi incelenmiştir. Bu amaçla Şekil 3. ve 4’ te görüldüğü gibi 1ng/ml FGF-2 eklenen ve kontrol grubuna ait 1. ve 5. gün mikroskop görüntüleri elde edilmiştir. Bu görüntülerin 256x256 piksellik çerçevelerden ve histogramlarından hesaplanan özniteliklerin maksimum değerleri Çizelge 1’ de görülmektedir. Görüntü ve histogramlarından yukarıda verilen altı parametreye göre hesaplanan öznitelik değerleri SPSS programıyla istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Normal dağılım gösteren verilere bağımsız örneklem t testi uygulanırken normal dağılım göstermeyen parametrelerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizi neticesinde elde edilen anlamlılık ve F değerleri Çizelge 2-4’te görülmektedir.



Şekil 3. Kontrol olarak büyüme faktörü içermeyen 10x ve 20x büyütmedeki 1. ve 5. günlerdeki hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri



Şekil 4. 1ng/mL FGF-2 büyüme faktörünün 1. ve 5. günlerdeki hücrelerinin 20x büyütmedeki ışık mikroskobu görüntüleri

Çizelge 1. Her bir uygulama için mikroskop **görüntüsü verilerinin** maksimum değerleri

Uygulamalar	Aktivite	Entropi	Mobilite	Komplekslik	Kurtosis	Skewness
1. gün Kontrol	2529.46	7.43	0.19	10.09	5.52	1.27
5. gün Kontrol	3184.54	7.41	0.22	10.43	3.41	0.72
1. gün FGF-2	1072.40	6.90	0.18	10.06	5.95	1.28
5. gün FGF-2	1558.90	7.07	0.23	7.95	5.39	1.32

Çizelge 1. 2. a. Kontrol 1. ve 5. gün ile **görüntü verilerinin** bağımsız örneklem t testi ve Mann-Whitney U testi analizi sonuçları

Uygulamalar	*Entropi Sig.(2 tailed)	*Aktivite Sig.(2 tailed)	Mobilite Sig.(2 tailed)	Komplekslik Sig.(2 tailed)	Kurtosis Sig.(2 tailed)	Skewness Sig.(2 tailed)
Kontrol 1. ve 5.gün	0.521	0.851	0.00 (F:6.513)	0.412 (F: 3.582)	0.037 (F:0.488)	0.028 5.367

*Mann-Whitney U testi sonuçları

Çizelge 1.2.b Kontrol 1. ve 5. gün **görüntü histogramı verilerinin** bağımsız örneklem t testi ve Mann-Whitney U testi analizi sonuçları

Uygulamalar	Entropi Sig.(2 tailed)	*Mobilite Sig.(2 tailed)	*Aktivite Sig.(2 tailed)	*Komplekslik Sig.(2 tailed)	*Kurtosis Sig.(2 tailed)
Kontrol 1. ve 5.gün	0.00 (F: 1.960)	0.828	0.994	0.531	0.00

*Mann-Whitney U testi sonuçları

Çizelge 2.a Kontrol 1. ve 5. gün ile **görüntü verilerinin** bağımsız örneklem t testi ve Mann-Whitney U testi analizi sonuçları

Uygulamalar	*Entropi Sig.(2 tailed)	*Aktivite Sig.(2 tailed)	Mobilite Sig.(2 tailed)	Komplekslik Sig.(2 tailed)	Kurtosis Sig.(2 tailed)	Skewness Sig.(2 tailed)
Kontrol 1. ve 5.gün	0.521	0.851	0.00 (F:6.513)	0.412 (F: 3.582)	0.037 (F:0.488)	0.028 5.367

*Mann-Whitney U testi sonuçları

Çizelge 2.b Kontrol 1. ve 5. gün **görüntü histogramı verilerinin** bağımsız örneklem t testi ve Mann-Whitney U testi analizi sonuçları

Uygulamalar	Entropi Sig.(2 tailed)	*Mobilite Sig.(2 tailed)	*Aktivite Sig.(2 tailed)	*Komplekslik Sig.(2 tailed)	*Kurtosis Sig.(2 tailed)
Kontrol 1. ve 5.gün	0.00 (F: 1.960)	0.828	0.994	0.531	0.00

*Mann-Whitney U testi sonuçları

Çizelge 3.a FGF-2 1. ve 5. gün görüntü verilerinin bağımsız örneklem t testi ve Mann-Whitney U testi analizi sonuçları

Uygulamalar	Entropi Sig.(2 tailed)	*Aktivite Sig.(2 tailed)	Mobilite Sig.(2 tailed)	Komplekslik Sig.(2 tailed)	Kurtosis Sig.(2 tailed)	*Skewness Sig.(2 tailed)
FGF-2 1.- 5.gün	0.00 (F:12.841)	0.00	0.00 (F:0.234)	0.00 (F: 11.767)	0.01 (F: 1.071)	0.225-

*Mann-Whitney U testi sonuçları

Çizelge 3.b FGF-2 1. ve 5. gün görüntü histogramı verilerinin bağımsız örneklem t testi ve Mann-Whitney U testi analizi sonuçları

Uygulamalar	*Entropi Sig.(2 tailed)	*Mobilite Sig.(2 tailed)	*Aktivite Sig.(2 tailed)	*Komplekslik Sig.(2 tailed)
FGF-2 1.- 5.gün	0.00	0.00	0.00	0.603

*Mann-Whitney U testi sonuçları

Çizelge 4.a 1.gün Kontrol ve FGF-2 görüntü verilerinin bağımsız örneklem t testi Mann-Whitney U testi analizi sonuçları

Uygulamalar	Entropi Sig.(2 tailed)	*Aktivite Sig.(2 tailed)	Mobilite Sig.(2 tailed)	Komplekslik Sig.(2 tailed)	*Kurtosis Sig.(2 tailed)	*Skewness Sig.(2 tailed)
1.gün Kontrol ve FGF-2	0.00 (F:16.180)	0.00	0.686 (F:0.099)	0.939 (F: 1.459)	0.00	0.00-

*Mann-Whitney U testi sonuçları

Çizelge 4.b 1.gün Kontrol ve FGF-2 görüntü histogramı verilerinin bağımsız örneklem t testi ve Mann-Whitney U testi analizi sonuçları

Uygulamalar	Entropi Sig.(2tailed)	*Aktivite Sig.(2 tailed)	*Mobilite Sig.(2 tailed)	*Komplekslik Sig.(2 tailed)
1.gün Kontrol ve FGF-2	0.00 (F:61.356)	0.00	0.00	0.00

*Mann-Whitney U testi sonuçları

Çizelge 5.a 5.gün Kontrol ve FGF-2 görüntü verilerinin bağımsız örneklem t testi ve Mann-Whitney U testi analizi sonuçları

Uygulamalar	*Entropi Sig.(2 tailed)	*Aktivite Sig.(2 tailed)	Mobilite Sig.(2 tailed)	Komplekslik Sig.(2 tailed)	Kurtosis Sig.(2 tailed)	Skewness Sig.(2 tailed)
5.gün Kontrol ve FGF-2	0.00	0.00	0.00 (F:3.012)	0.00 (F: 16.730)	0.00 (F:16.730)	0.00 (F: 50.965)

*Mann-Whitney U testi sonuçları

Çizelge 5.b 5.gün Kontrol ve FGF-2 görüntü histogramı verilerinin bağımsız örneklem t testi ve Mann-Whitney U testi analizi sonuçları

Uygulamalar	Entropi Sig.(2 tailed)	*Aktivite Sig.(2 tailed)	*Mobilite Sig.(2 tailed)	*Komplekslik Sig.(2 tailed)
5.gün Kontrol ve FGF-2	0.00 (F:46.089)	0.00	0.00	0.00

*Mann-Whitney U testi sonuçları

Çizelge 2a ve 2b' den de görüldüğü gibi kontrol görüntülerinden elde edilen özneliklerin 1. ve 5. güne ait değerleri analiz edildiğinde görüntü histogramının entropi değeri, görüntünün mobilite değeri, çarpıklık ve basıklık değerleri normal dağılım göstermiş olup bağımsız örneklem t testi sonucuna göre anlamlılık değeri $p < 0.05$ olduğu görülmektedir. Anlamlılık değerinin $p < 0.05$ olduğu bu özellikler için F değerleri sırasıyla 1.96, 6.513, 5.367 ve 0.488 olarak elde edilmiştir. Ancak, normal dağılım gösteren komplekslik değeri bağımsız örneklem t testi sonucuna göre, normal dağılım göstermeyen görüntü histogramının mobilite, aktivite ve komplekslik değerleri ile görüntünün aktivite ve entropi değerleri arasında

Mann Withney U testine göre anlamlılık değeri $p > 0.05$ olup bu özelliklerde anlamlı farklılık görülmemiştir.

Ayrıca, Çizelge 3a ve 3b den görüleceği üzere FGF-2 eklenen görüntülerden elde edilen özneliklerin 1. ve 5. güne ait değerleri analiz edildiğinde, görüntünün mobilite, entropi, komplekslik ve basıklık değerleri normal dağılım göstermiş olup bağımsız örneklem t testi sonucuna göre anlamlılık değeri $p < 0.05$ olduğu görülmektedir. Anlamlılık değerinin $p < 0.05$ olduğu bu özellikler için F değerleri sırasıyla 0.234, 12.841, 11.767 ve 1.071 olarak elde edilmiştir. FGF-2 eklenen görüntülerin histogramından hesaplanan mobilite, aktivite, entropi ve görüntüden hesaplanan aktivite

değerleri normal dağılım göstermediği için Mann Withney U testi ile analiz edilmiş olup bu teste göre anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak elde edilmiştir. Ancak görüntü histogramından hesaplanan komplekslik ve görüntüden hesaplanan çarpıklık değerlerinin Mann Withney U testine göre anlamlılık değerinin $p > 0.05$ olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre büyüme faktörü eklenen 1. ve 5. gün görüntülerinden elde edilen özneliklerden histograma ait kompleksite ve görüntüye ait çarpıklık özellikleri dışında diğer tüm özelliklerde anlamlı farklılık olduğu görülmüştür. Ancak kontrol grubundan elde edilen özelliklerden sadece histograma ait entropi, görüntüye ait mobilite, çarpıklık ve basıklık değerleri dışında diğer özelliklerde farklılık olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4a ve 4b analiz edildiğinde kontrol ve FGF-2 eklenen hücrelerin 1. günlerine ait mikroskop görüntülerinde histogramdan hesaplanan entropi, görüntüden hesaplanan entropi değerleri bağımsız örneklem t testi sonuçlarına göre aralarında anlamlı farklılık olduğu ($p < 0.05$) görülmüştür. Anlamlı farklılık ortaya çıkan bu özelliklere ait F değerleri sırasıyla 61,356 ve 16,180 olarak elde edilmiştir. Görüntü histogramı mobilite, aktivite ve kompleksliği ve görüntüden hesaplanan aktivite, basıklık ve çarpıklık değerlerinin Mann Withney U testine göre anlamlı farklılık gösterdiği ($p < 0.05$) görülmüştür. Bu sonuçlara göre iki grup arasındaki görüntüden hesaplanan mobilite ve kompleksite dışındaki tüm özellikler arasında anlamlı farklılık ortaya çıkmıştır. Ayrıca büyüme faktörünün etkisi ile 1. günde kontrol grubuna göre hücrelerde ortaya çıkan farklılaşma, mikroskop görüntülerinden elde edilen özneliklerin istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermesi ile ortaya konmuştur.

Kontrol ve FGF-2 eklenen hücrelerin 5. günlerine ait mikroskop görüntülerinde Çizelge 5a ve 5b den de görüldüğü gibi tüm özellikler için gruplar arasında önemli derecede anlamlı farklılık olduğu görülmektedir ($p < 0.000$). Bu sonuca göre, büyüme faktörü etkisi tüm özneliklerde önemli derecede anlamlı farklılık oluşturmuştur.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada perikardiyal sıvıdan izole edilmiş olan mezotelyal hücelere 1ng/ml FGF-2 büyüme faktörünün eklenmesiyle hücrelerde meydana gelen farklılaşmayla doku benzeri yapıların oluşumuna olan etkisi incelenmiştir. Doku/organ hasarının onarımında mezotelyal hücreler FGF-2 ve diğer büyüme faktörlerini sentezleyerek dokunun eski halini almasını sağlar. Hasarın olmadığı durumlarda mezotelyal hücrelerin FGF-2 sentezlemediği düşüncesinden yola çıkılarak in vitro hücre kültürü ortamına büyüme faktörü eklenmesiyle mezotelyal hücreler doku oluşumuna yönlendirilerek doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılan mezenkimal kök hücelere alternatif olarak kullanılabilceği düşünülmektedir. Bu çalışmada FGF-2 büyüme faktörünün 1ng/mL miktarında kültür ortamına eklenerek hücelere olan etkisi mikroskop görüntüleri ile incelenmiştir. Hücrelerin mikroskopik incelemesinde belirgin bir farklılık görülmemesine rağmen, görüntülerden elde edilen özneliklerin analizinde önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır.

Kalp ile ilgili rahatsızlıklarda büyüme faktörlerinin etkisinin araştırıldığı çalışmalarda kalp rahatsızlığı ile birlikte FGF-2 konsantrasyonunun 1.224-1.461 ng/ml iken kalp rahatsızlığı olmayan kişilerin perikardiyal sıvısında FGF-2 konsantrasyonunun 0.292-0.389 ng/ml olduğu belirlenmiştir (Fujita et al. 1998). Dental pulp kök hücresi ile yapılan bir diğer çalışmada FGF-2'nin hücre için etkili konsantrasyonu 2,5 ng/mL olduğu belirtilmiştir (Gorin et al. 2016).. Düşük konsantrasyon FGF-2 miktarının mezotelyal hücelere etkisinin araştırıldığı bu çalışmada 1ng/mL FGF-2 kültür ortamına eklenerek analiz edilmiştir. Yapılan çalışmalardan farklı olarak FGF-2'nin hücelere olan etkisi hjorth parametrelerine göre analiz edilmiştir. Hücre kültürüne FGF-2 eklendikten sonraki 1. ve 5.gün mikroskop görüntülerinde komplekslik ve çarpıklık özellikleri dışında diğer tüm özelliklerde anlamlı farklılık olduğunun görülmesi hücre farklılaşmasının olduğunu göstermektedir. Kontrol grubu ile FGF-2 eklenen hücrelerin 1. gün mikroskop görüntülerinde histogramdan hesaplanan entropi ve görüntüden hesaplanan

entropi değerleri bağımsız örneklem t testi sonuçlarına göre aralarında anlamlı farklılık ($p<0.05$) olması hücrelerde büyüme ve çoğalmanın etkisiyle entropide değişiklik olduğunu göstermektedir (Çizelge 4). Ayrıca, görüntü histogramından hesaplanan mobilite, aktivite ve kompleksliği ve görüntüden hesaplanan aktivite, basıklık ve çarpıklık değerlerinin Mann Withney U testine göre anlamlı farklılığın ($p<0.05$) ortaya çıkması hücrelerin farklılaşmaya başladığını göstermektedir.

Elde edilen sonuçlara göre vaskülarizasyonda da etkili olan FGF-2 büyüme faktörünün kalp rahatsızlığı geçiren hastaların tedavisinde kullanılabileceğine yönelik yapılan çalışmalara bu çalışmamızın katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Laham et al. 1998, Landau et al.1995, Uchida et al. 1995).

Çalışmanın ileriki aşamalarında hücre farklılaşmasının RT-PCR analizleri ve flow sitometrisi yöntemleri de kullanılarak analiz edilmesi planlanmaktadır.

Gelecekteki çalışmalarımızda büyüme faktörü miktarı artırılarak mezotelyal hücrelerin in vitro kültüründe kullanılacak en iyi FGF-2 miktarı belirlenmesi çalışmalarına yer verilecektir. Ayrıca, diğer büyüme faktörleri olan VEGF, PDGF ve TGF- β 'nin in vitro kültür ortamında mezotelyal hücrelere olan etkisi incelenerek doku mühendisliği çalışmalarına katkı sağlaması hedeflenmektedir.

5. Kaynaklar

Alim, OA, Moselhy, M, Mroueh, F, 2012. EMG Signal Processing and Diagnostic of Muscle Diseases, *2nd International Conference on Advances in Computational Tools for Engineering Applications (ACTEA)*, 1-6, Beirut, Lebanon, 12-15 Dec.

Cano, ME, Class, QA Polich, J, 2009. Affective valance, stimulus attributes, and P300: Color vs. black/White and normal vs. scrambled images, *International Journal of Psychophysiology*, **71**, 17-24.

Cecchin, T, Ranta, R, Koessler, L, Caspary, O, Vespignani, H, Maillard, L, 2010. Seizure lateralization in scalp EEG using hjorth parameters, *Clinical neurophysiology*, **121(3)**,290-300. doi: 10.1016/j.clinph.2009.10.033.

Dauleh, S, Santeramo, I, Fielding, C, Ward, K, Herrmann, A, Murray, P, Wilm, B. 2016. Characterisation of cultured mesothelial cells derived from the murine adult omentum. *PLoS one*, **11(7)**, e0158997.

Esch, F, Baird, A, Ling, N, et al, 1985. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **82**, 6507-6511

Fujita, M, Ikemoto, M, Kishishita, M, et al. 1996. Elevated basic fibroblast growth factor in pericardial fluid of patients with unstable angina. *Circulation* **94**, 610-3.

Fujita, M, Ikemoto, M, Tanaka, T, et al. 1998. Marked elevation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in pericardial fluid of patients with angina pectoris. *Angiogenesis*, **2**, 105-108. doi: 10.1023/A:1009062712441

Gorin, C, Rochefort, GY, Bascetin, R, Ying, H, Lesieur, J, Sadoine, J, Beckouche, N, Berndt, S, Novais, A, Lesage, M, Hosten, B, Vercellino, L, Merlet, P, Le-Denmat, D, Marchiol, C, Letourneur, D, Nicoletti, A, Vital, SO, Poliard, A, Salmon, B, Muller, L, Chaussain, C, Germain, S, 2016. Priming Dental Pulp Stem Cells With Fibroblast Growth Factor-2 Increases Angiogenesis of Implanted Tissue-Engineered Constructs Through Hepatocyte Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Secretion. *Stem Cells Translational Medicine*, **5(3)**, 392-404. doi: 10.5966/sctm.2015-0166.

Laham, RJ, Simons, M, Tofukuji M, Hung, D, Sellke, FW, 1998. Modulation of myocardial perfusion and vascular reactivity by pericardial basic fibroblast growth factor: Insight into ischemia-induced reduction in endothelium-dependent vasodilation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **116(6)**, 1022-8. doi: 10.1016/S0022-5223(98)70055-8.

Landau, C, Jacobs, AK, Haudenschild, CC. 1995. Intrapericardial basic fibroblast growth factor induces myocardial angiogenesis in a rabbit model of chronic ischemia. *American Heart Journal*, **129(5)**, 924-31. doi: 10.1016/0002-8703(95)90113-2.

Latifoğlu, F, Sönmezer, D, Toprak, G, Düzler A, İşoğlu, İA, Kaan, D, 2018. Cell isolating from bovine pericardial fluid and culturing for next tissue engineering applications. *International Conference on Technology, Engineering and Science (Icontes 2018)*, Antalya, Türkiye, 26-29 October, **4**, 224-229.

Mahaphonchaikul, K, Sueaseenak, D, Pintavirooj, C, Sangworasil, M, 2010. EMG signal feature extraction

based on wavelet transform, *International Conference on Electrical Engineering/Electronics Computer Telecommunications and Information Technology (ECTI-CON)*, **1**, 356–360, Chiang Mai, Thailand, 19-21 May.

Ornitz, DM, Itoh, N, 2015. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Developmental Biology*, **4**, 215–266.

Rozenkrants, B, Polich, J, 2008. Affective ERP processing in a visual oddball task: Arousal, valance, and, *Clinical Neurophysiology*, **119**, 2260-2265.

Rozenkrants, B, Olofsson, JK, Polich, J, 2008. Affective visual event-related potentials: Arousal, valance, and repetition effects for normal and distorted pictures, *International Journal of Psychophysiology*, **67**, 2008, 114-123.

Sanei, S, Hosseini-Yazdi, A, 2011. Extraction of ECG from single channel EMG signal using constrained singular spectrum analysis, *17th International Conference on Digital Signal Processing (DSP)*, 1-4, Corfu, Greece, 6-8 July.

Schelch, K, Wagner, C, Hager, S, Pirker, C, Siess, K, Lang, E, Marian, B, 2018. FGF2 and EGF induce epithelial–mesenchymal transition in malignant pleural mesothelioma cells via a MAPKinase/MMP1 signal. *Carcinogenesis*, **39(4)**, 534-545.

Sönmezer, D, Latifoğlu, F, İsoğlu, İA, Düzler, A, Toprak, G, Kaan, D, 2016. Hücre Bileşeni ve Biyomalzeme ile Vasküler Doku Üretimi. *Tıp Teknolojileri Ulusal Kongresi (TIPTEKNO'16)*, Antalya, Türkiye, ss.205-208, 27-29 Ekim

Uchida, Y, Yanagisawa-Miwa, A, Nakamura, F, Yamada, K, Tomaru, T, Kimura, K, Morita, T, 1995. Angiogenic therapy of acute myocardial infarction by intrapericardial injection of basic fibroblast growth factor and heparin sulfate: an experimental study. *American Heart Journal*, **130**, 1182-1188.

Vasfi, TN, 2014. SPSS Uygulamalı İstatistik Teknikleri, **3. Baskı**, Seçkin Yayıncılık Ankara, 296.

Yu, PJ, Ferrari, G, Galloway, AC, Mignatti, P, Pintucci, G, 2007. Basic fibroblast growth factor (FGF-2): the high molecular weight forms come of age. *Journal of Cellular Biochemistry*, **100**, 1100–1108.