T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN RETİNAL PİGMENT EPİTEL (ARPE-19) HÜCRELERİNDE PAEONOL'ÜN miR-155 VE miR-210 ARACILI HİPOKSİ SİNYALİNDEKİ ROLÜ

NAZLI ŞENAY BEŞİRİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. ZEYNEP BANU DOĞANLAR

EDİRNE- 2021

Nazlı Şenay BEŞİRİK'in hazırladığı "**İnsan Retinal Pigment Epitel (ARPE-19) Hücrelerinde Paeonol'ün miR-155 ve miR-210 Aracılı Hipoksi Sinyalindeki Rolü**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından **Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri: İmza

…….. ……..

…….. ……..

…….. ……..

Tez Savunma Tarihi: 24/12/2021

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR

Tez Danışmanı ……..

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

……..

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

24/12/2021

Nazlı Şenay BEŞİRİK

Yüksek Lisans Tezi

İnsan Retinal Pigment Epitel (ARPE-19) Hücrelerinde Paeonol'ün miR-155 ve miR-210 Aracılı Hipoksi Sinyalindeki Rolü

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Hipoksi, oksijen homeostazının azalması durumu olarak tanımlanmaktadır. Hipoksi fizyolojik olarak özellikle embriyonik gelişim evresinde gerekli iken patolojik olarak meydana geldiğinde hücresel ölüme sebep olmaktadır. Retinal hipoksi; diyabetik retinopati, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, prematüre retinopatisi, glokom, retinal vasküler hastalıklar gibi körlüğe neden olabilecek patolojilerin temel sebeplerindendir. Geleneksel Çin tıbbında kullanılmakta olan paeonol, *Paeonia suffruticosa*'nın kök kabuğundan izole edilen ana bileşen olup anti-enflamatuar, nöroprotektif, anti-tümör, antioksidan ve anti-anjiyogenik etkilere sahiptir.

Bu çalışmada, DFX (Deferoxamine Mesylate Salt) ile hipoksi uygulaması yapılan insan retinal pigment epitel hücrelerinde (ARPE-19) paeonolün hipoksi ve anjiyogenez sinyali üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Paeonolün hipoksi ile indüklenen ARPE-19 hücrelerinde hücre canlılığına olan etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Hipoksi ve anjiyogenez yolaklarının gen ve miRNA ifadeleri kantitatif gerçek zamanlı PCR, protein ifadeleri ise western blot analizi ile belirlenmiştir.

Çalışma sonuçlarına göre paeonolün hipoksiye maruz kalan ARPE-19 hücrelerinde canlılığın artmasına neden olduğu belirlenmiştir. Buna ilaveten paeonol, hipoksi ile artan HIF-1α, HIF-1β, VEGF, VEGFR, MMP-3 ve MMP-9 geninde ve miR-155 ve miR-210 ekspresyonlarında azalmalara neden olmuştur. Ayrıca HIF-1α, MMP-3 ve MMP-9 gen ekspresyonlarının kontrol seviyesine dönmesine de neden olmuştur.

Çalışma sonuçlarımıza göre görmeden sorumlu fotoreseptörleri besleyen, koruyucu bariyer işlevi gören ve oksijen değişimlerine yüksek hassasiyeti olan retinal pigment epitel hücrelerinde meydana gelen hipoksinin paeonol aracılığıyla azaltılabileceği ve paeonolün terapötik bir rolünün olabileceği düşünülmektedir.

Yıl : 2021

Sayfa Sayısı : 125

Anahtar Kelimeler : ARPE-19, DFX, miR-155, miR-210, miR-221, hipoksi, anjiyogenez, paeonol

Master Thesis

The Role of Paeonol in miR-155 and miR-210 mediated Hypoxia Signaling in Human Retinal Pigment Epithelial (ARPE-19) Cells

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

Hypoxia is defined as a state of reduced oxygen homeostasis. While hypoxia is physiologically essential especially in the embryonic developmental stage, when it occurs pathologically, it causes cellular death. Retinal hypoxia; it is one of the main causes of pathologies that may cause blindness such as diabetic retinopathy, age-related macular degeneration, retinopathy of prematurity, glaucoma, retinal vascular diseases. Paeonol which is used in traditional Chinese medicine, is the main component isolated from the root bark of *Paeonia suffruticosa* and has anti-inflammatory, neuroprotective, anti-tumor, antioxidant and anti-angiogenic effects.

In this study, it was aimed to determine the effects of paeonol on hypoxia and angiogenesis signal in human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) treated with DFX (Deferoxamine Mesylate Salt).

The effects of paeonol on cell viability in hypoxia-induced ARPE-19 cells were determined by MTT test. The gene and miRNA expressions of hypoxia and angiogenesis pathways were determined by quantitative real-time PCR, and protein expressions were determined by western blot analysis.

According to the results of the study, it was determined that paeonol caused an increase in viability in ARPE-19 cells exposed to hypoxia. In addition, paeonol caused decreases in the HIF-1α, HIF-1β, VEGF, VEGFR, MMP-3 and MMP-9 gene and miR-155 and miR-210 expressions, which is increased with hypoxia. Furthermore it was also caused the HIF-1α, MMP-3 and MMP-9 gene expressions return to the control level.

According to results of the our study, it is thought that hypoxia that occurs in retinal pigment epithelial cells, which nourish the photoreceptors responsible for vision, function as a protective barrier and are highly sensitive to oxygen changes, can be reduced by paeonol. In addition, paeonol may have a therapeutic role.

Year : 2021

Number of Pages : 125

Keywords : ARPE-19, DFX, miR-155, miR-210, miR-221, hypoxia, angiogenesis, paeonol

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca varlığıyla güç veren, sevgi ve şefkatini eksik etmeyen, her zaman her koşulda ilgiyle destek olan, kendimi geliştirmemde çok büyük katkıları ve emekleri olan, rehberim, sayın danışman hocam Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR'a (Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Zorluklarla başa çıkmayı öğreten, her sorunumda destek olan, ilgisini alakasını eksik etmeyen, bilgisiyle ufkumu genişleten, saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a (Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunduğum süre boyunca ailem gibi hissettiren tüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

TÜBİTAK projesinde bursiyer olarak çalışma fırsatı bulduğum, sevgi ve şefkatini her daim hissettiğim, farkındalığımı arttıran, sayın Dr. Öğr. Üyesi Gamze GÖGER'e (Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı)

Tez sürecim boyunca manevi olarak her zaman desteğini hissettiğim, motivasyonumu arttıran, abla-kardeş duygusunu en içten şekilde yaşatan Dr. Ayten DOĞAN'a

Tezimin son dönemlerinde her türlü desteği, ilgiyi gösteren, anlayışlarıyla beni motive eden sevgili iş arkadaşlarım Fatmanur İÇCAN, Elif KASTAR ve Arın KERPİÇÇİ'ye

Daima yanımda olan, her düştüğümde tekrar denemem için kaldıran, hayattaki en büyük şansım, en değerli en kıymetlilerim canım annem Tacider BEŞİRİK'e ve canım babam Savaş BEŞİRİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....iv
ABSTRACT.....vi
TEŞEKKÜR.....viii
İÇİNDEKİLER.....ix
SİMGELER DİZİNİ.....xii
KISALTMALAR DİZİNİ.....xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....xviii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....xx
BÖLÜM 1.....1
GİRİŞ.....1
BÖLÜM 2.....3
GENEL BİLGİLER.....3
2.1. Retinal Dolaşım.....3
2.1.1. Retinal Pigment Epitel Hücreleri.....4
2.1.2. Perfüzyon Basıncı.....7
2.2. Hipoksi.....8
2.2.1. Hipoksi Yolağı ve Mekanizması.....9
2.2.1.1. HIF-1α Aracılı Sinyalizasyon.....11
2.2.1.2. HIF-1β Aracılı Sinyalizasyon.....13
2.2.2. Hipoksi ve Genel Etkileri.....14
2.2.3. Oküler Hastalıklarda Oksijen.....15
2.2.3.1. Diyabetik Retinopati.....16
2.2.3.2. Prematüre Retinopatisi.....17
2.2.3.3. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu.....17

2.2.3.4. Von Hippel-Lindau Hastalığı 18
2.2.3.5. Glokom 18
2.2.3.6. Yüksek İrtifa Retinopatisi 18
2.3. Anjiyogenez 19
2.3.1. Anjiyogenez Yolağı ve Mekanizması 22
2.3.1.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü 22
2.3.1.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörleri 25
2.3.1.3. Matriks Metalloproteinaz 27
2.3.2. Anjiyogeneze Bağlı Hastalıklar 32
2.4. MikroRNA 33
2.4.1. miRNA Biyogenezi 33
2.4.2. miRNA Aracılı Hipoksi 34
2.4.2.1. miRNA-155 36
2.4.2.2. miRNA-210 37
2.4.5.3. miRNA-221 39
2.5. Paeonol 40
BÖLÜM 3 43
MATERYAL VE YÖNTEM 43
3.1. Hücre Hattı 43
3.2. Hücre Besiyeri Hazırlanması 44
3.3. Hücrelerin Kültüre Alınması, Pasajlanması ve Dondurulması 44
3.3.1. Dondurulan Hücrelerin Kültüre Alınması 44
3.3.2. Hücrelerin Pasajlanması 44
3.3.3. Hücrelerin Dondurulması 45
3.4. Çalışma Grupları 45
3.5. MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) Analizi 45
3.5.1. Deferoxamine Mesylate Salt Stok ve Uygulama Dozunun Hazırlanması 46
3.5.2. Paeonol Stok ve Uygulama Dozlarının Belirlenmesi 46
3.5.3. MTT Solüsyonu Hazırlanması 47
3.6. Genetik Analizler 49
3.6.1. Ribonükleik Asit (RNA) İzolasyonu 49
3.6.2. Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit (cDNA) Sentezi 50

3.6.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) 51
3.6.4. miRNA cDNA Sentezi ve Ekspresyonu 52
3.6.4.1. miRNA cDNA Sentezi 52
3.6.4.2. miRNA Ekspresyonu 55
3.7. Western Blot Protein Analizi 56
3.7.1. İzole Edilen Proteinlerin Denatürasyonu 56
3.7.2. Jel Elektroforezi 57
3.7.3. Yürütülen Proteinlerin Jelden Membrana Aktarılması 57
3.7.4. Bloklama Aşaması ve Birincil Antikor Bağlanması 58
3.7.5. İkincil Antikor Bağlanması ve Görüntüleme 59
3.8. İstatistiksel Değerlendirme 60
BÖLÜM 4 61
SONUÇLAR 61
4.1. MTT Hücre Canlılık Analizi 61
4.1.1. Hipoksik ARPE-19 Hücre Hattına 24 ve 48 Saatlik PAE (991-15,5 µM) Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi 63
4.2. Gen Ekspresyon Analizleri 64
4.3. miRNA Ekspresyon Analizleri 67
4.4. Western Blot Protein Analizi 68
BÖLÜM 5 71
TARTIŞMA 71
KAYNAKLAR 85
ÖZGEÇMİŞ 104

SİMGELER DİZİNİ

%	**:** Yüzde
±	**:** Artı eksi
°C	**:** Santigrat derece
µl	**:** Mikrolitre
µM	**:** Mikromolar
$C_9H_{10}O_3$	**:** 1-(2-hidroksi-4-metoksifenil) etanon, Paeonol
Ca^{2+}	**:** Kalsiyum
Cl^-	**:** Klor
cm^2	**:** Santimetre kare
CO_2	**:** Karbondioksit
dH_2O	**:** Saf su (distile su)
dk	**:** Dakika
g	**:** Gram
H_2O	**:** Su
H_2O_2	**:** Hidrojen peroksit
kDa	**:** Kilodalton
mg	**:** Miligram
ml	**:** Mililitre
mM	**:** Milimolar
mmHg	**:** Milimetre cıva
ng	**:** Nanogram
nm	**:** Nanometre
O_2	**:** Oksijen

pH	**:** Asitlik-Bazlık derecesi (power of Hydrogen)
pO_2	**:** Oksijen basıncı
rpm	**:** Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
sn	**:** Saniye
V	**:** Volt
α	**:** Alfa
β	**:** Beta

KISALTMALAR DİZİNİ

661W : Retinal fotoreseptör hücre hattı

AGO2 : Argonat 2 (Argonaute 2)

AhR : Aril hidrokarbon reseptörü

AIDS : Kazanılmış bağışıklık yetersizliği sendromu (Acquired Immune Deficiency Syndrome)

Ang-1 : Anjiyopoietin-1

Ang-2 : Anjiyopoietin-2

ANOVA : Varyans analizi (Analysis Of Variance)

ARNT : Aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokatör

ARPE-19 : İnsan retinal pigment epitel hücre hattı

ATCC : Amerikan tipi kültür koleksiyonu

ATP : Adenozin tri fosfat

BEAS-2B : İnsan normal bronşiyal epitel hücre hattı

bHLH-PAS : Temel-heliks-ilmik-heliks-PAS (basic helix–loop–helix-PAS)

BIC : B-hücresi entegrasyon kümesi (B-cell Integration Cluster)

Caco-2 : İnsan kolon epidermal adenokarsinom hücre hattı

cDNA : Tamamlayıcı (komplementer) DNA

DFX : Deferoxamine mesylate salt

DGCR8 **:** DiGeorge sendromu kritik bölge 8

DMEM **:** Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium

DMSO **:** Dimetil sülfoksit

DNA **:** Deoksiribonükleik asit

EC **:** Endotel hücre

EFNA3 **:** Reseptör tirozin kinaz ligand efrin-A3

EGF **:** Epidermal büyüme faktörü

eNOS **:** Endotelyal nitrik oksit sentaz

EPO **:** Eritropoietin

FBS **:** Fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum)

FGF **:** Fibroblast büyüme faktörü

FIH **:** HIF’i inhibe eden faktör

G-CSF **:** Granülosit koloni uyarıcı faktör

GM-CSF **:** Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör

HaCaT **:** İnsan epidermal keratinosit hücre hattı

HBEC **:** İnsan akciğer epitel hücre hattı

HeLa **:** İnsan serviks kanseri hücre hattı

HepG2 **:** İnsan karaciğer kanseri hücre hattı

HFL-1 **:** İnsan fetal akciğer fibroblast hücre hattı

HGF **:** Hepatosit büyüme faktörü

HIF **:** Hipoksi ile indüklenen faktör

HIF-1 **:** Hipoksi ile indüklenen faktör-1

HIF-1α **:** Hipoksi ile indüklenen faktör-1α

HIF-1β **:** Hipoksi ile indüklenen faktör-1β

HIF-2 **:** Hipoksi ile indüklenen faktör-2

HIF-3 **:** Hipoksi ile indüklenen faktör-3

HRMEC **:** İnsan retinal mikrovasküler endotelyal hücre hattı

HSV-1 **:** Herpes Simplex Virüs 1

IL-8 **:** İnterlökin 8

IUPAC **:** Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği

miRNA **:** MikroRNA

MMP **:** Matriks metalloproteinaz

MMP-3 **:** Matriks metalloproteinaz 3

MMP-9 **:** Matriks metalloproteinaz 9

mRNA **:** Mesajcı RNA (messenger RNA)

MTT **:** 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür

PAE **:** Paeonol

PAS **:** Period circadian protein (Per), aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt), Single-minded protein (Sim)

PBS **:** Fosfat tamponlu salin (Phosphate-Buffered Saline)

PCR **:** Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

PDGF **:** Trombosit türevli büyüme faktörü

PGF **:** Plasental büyüme faktörü

PHD **:** Prolil-4-Hidroksilaz

PHD1 **:** Prolil-4-Hidroksilaz 1

PHD2 **:** Prolil-4-Hidroksilaz 2

PHD3 **:** Prolil-4-Hidroksilaz 3

PlGF **:** Plasental büyüme faktörü

pre-miRNA **:** Öncü miRNA

pri-miRNA **:** Primer miRNA

pVHL **:** Von Hippel-Lindau proteini

qRT-PCR **:** Kantitatif gerçek zamanlı PCR (Quantitative Real Time PCR)

RIPA **:** Radio Immunoprecipitation Assay Buffer

RISC **:** miRNA ile indüklenen susturucu kompleks

RNA **:** Ribonükleik asit

ROS **:** Reaktif oksijen türü

RPE **:** Retinal pigment epitel

TCA **:** Trikarboksilik asit

TGF-β **:** Dönüştürücü büyüme faktörü-beta

THP-1 **:** İnsan monositik lösemi hücre hattı

TNF-α **:** Tümör nekroz faktörü-alfa

TRBP **:** Transaktive edici yanıt oluşturan RNA bağlanma proteini

UPW **:** Ultra saf su (Ultra Pure Water)

UTR **:** Translasyona uğramayan bölge (Untranslated Region)

UVB **:** Ultraviyole B

VEGF **:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VEGFR **:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü

VHL **:** Von Hippel-Lindau

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Matriks metalloproteinazlar ve biyolojik etkileri (Vincenti, 2001). 28

Çizelge 2.2. Anjiyogeneze bağlı hastalıklar (Fallah vd., 2019). 32

Çizelge 3.1. cDNA kit bileşenleri ve kullanım miktarları. 50

Çizelge 3.2. PCR işleminin döngüleri için ayarlanan sıcaklık ve süre değerleri. 50

Çizelge 3.3. Primer baz dizileri ve uzunlukları. 51

Çizelge 3.4. qRT-PCR işlemi için ayarlanan sıcaklık ve süre değerleri. 51

Çizelge 3.5. Poli (A) reaksiyon karışımı bileşenleri. 52

Çizelge 3.6. Poli (A) reaksiyon karışımı PCR protokolü. 53

Çizelge 3.7. Ligasyon reaksiyon karışımı bileşenleri. 53

Çizelge 3.8. Ligasyon reaksiyon karışımı PCR protokolü. 53

Çizelge 3.9. Ters transkripsiyon reaksiyon karışımı bileşenleri. 54

Çizelge 3.10. Ters transkripsiyon reaksiyon karışımı PCR protokolü. 54

Çizelge 3.11. miR-Amp reaksiyon karışımı bileşenleri. 54

Çizelge 3.12. miR-Amp reaksiyon karışımı PCR protokolü. 55

Çizelge 3.13. miRNA primerleri ve primer dizileri. 55

Çizelge 3.14. miRNA PCR reaksiyon karışımı bileşenleri. 55

Çizelge 3.15. miRNA qRT-PCR işlemi için ayarlanan sıcaklık ve süre değerleri. 56

Çizelge 4.1. ARPE-19 hücre hattında PAE uygulamasının farklı dozlara ve zamana bağlı olarak hücre canlılığına etkisi. Farklı harfler ile gösterilen gruplardaki ortalamalar, kontrole kıyasla istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA Tukey test, $p \leq 0,05$). 64

Çizelge 4.2. İnsan retinal pigment epitel ARPE-19 hücre hattına DFX, PAE ve DFX+PAE uygulamaları sonucu, kontrole kıyasla belirlenen relatif gen ekspresyon değerleri. Tüm veriler β-aktin ve 18S ifadelerinin ortalaması ile normalleştirilmiştir. n=4, ortalama±standart hata (Tek yönlü ANOVA, Tukey Test, $p \leq 0,05$). 65

Çizelge 4.3. miRNA-155-3p, miRNA-210-3p ve miRNA-221-3p qRT-PCR cihazında belirlenen relatif ekspresyon değerleri. Tüm veriler U6 miRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Farklı harfler, gruplar arasında anlamlı bir fark olduğunu gösterir. n=4, ortalama±standart hata (Tek yönlü ANOVA, Tukey Test, $p \leq 0,05$). 67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Retina tabakaları ve hücreleri (Clinic, 2015). 4
Şekil 2.2. RPE hücreleri ve retinayı oluşturan katmanlar (Patel, 2015). 5
Şekil 2.3. RPE hücrelerinin fonksiyonları (Strauss, 2005). 6
Şekil 2.4. HIF polipeptitlerinin alan yapısı (Fabian, 2018) 10
Şekil 2.5. Normoksik ve hipoksik şartlar altında HIF degredasyonu ve stabilitesi (Hegasy, 2019). 11
Şekil 2.6. VHL proteininin E3 ligaz kompleksi ve HIF-1α ile etkileşiminin şematik yapısı (Aki, Li, Li, Liu & Lee, 2019). 12
Şekil 2.7. Oksijene bağımlı HIF-1α yanıtları (Fabian, 2018). 13
Şekil 2.8. Anjiyogenez gen sinyal yolaklarının şematik özeti (Mthembu vd., 2017). 20
Şekil 2.9. Anjiyogenez aşamaları (Bryan & d'Amore, 2007). 21
Şekil 2.10. Embriyogenezde kan damarı oluşumu için çoklu aşamalar (Shibuya, 2001). 23
Şekil 2.11. VEGF süper ailesi ligandları ve reseptörleri (Rahimi, 2012). 24
Şekil 2.12. VEGF'ler, VEGF reseptörleri 1, -2 ve -3'e olan afinitelerine bağlı olarak kan damarları ve/veya lenf damarları ile etkileşimi (Künnapuu, Bokharaie & Jeltsch, 2021). 26
Şekil 2.13. miRNA biyogenezi ve miRNA kontrollü posttranskripsiyonel gen regülasyonunun mekanizmaları (Yu vd., 2016). 34
Şekil 2.14. HipoksimiR'lerin hipoksiyle indüklenen anjiyogenez üzerindeki etkisi (Madanecki vd., 2013). 35
Şekil 2.15. miR-155 ile ilişkili hastalıklar (Gulei vd., 2019). 37
Şekil 2.16. miR-210'un etkilediği genlerin temel fonksiyonları (Ivan & Huang, 2014). 38

Şekil 2.17. Paeonolün kimyasal yapısı (1-(2-hidroksi-4-metoksifenil) etanon) (Adki & Kulkarni, 2020). 40
Şekil 2.18. Paeonolün farmakolojik etkileri (Zhang vd., 2019). 41
Şekil 2.19. Paeonolün diğer farmakolojik mekanizmalara etkileri (Zhang vd., 2019). . 42
Şekil 3.1. ARPE-19 insan retinal pigment epitel hücrelerinin invert ışık mikroskobu altındaki görüntüsü. 43
Şekil 3.2. PAE uygulama dozları ve seri sulandırım yöntemi. 47
Şekil 3.3. Uygulamalar sonucu hücre kültürü plakasındaki gruplar. 48
Şekil 3.4. ΔΔCt yöntemi hesaplama aşamaları. 52
Şekil 4.1. A. ARPE-19 hücre hattına sırasıyla 24 saat 100 µM DFX, 24 saat 991-15,5 µM doz aralıklarında PAE uygulanarak MTT analizi ile elde edilen canlı hücrelerin yüzdesi. n=6, ortalama±standart hata. **B.** ARPE-19 hücre hattına sırasıyla 24 saat 100 µM DFX, 24 saat 991-15,5 µM doz aralıklarında PAE uygulamasının hücre canlılığına etkisini gösteren MTT plakası. 62
Şekil 4.2. A. ARPE-19 hücre hattına sırasıyla 24 saat 100 µM DFX, 48 saat 991-15,5 µM doz aralıklarında PAE uygulanarak MTT analizi ile elde edilen canlı hücrelerin yüzdesi. n=6, ortalama±standart hata. **B.** ARPE-19 hücre hattına sırasıyla 24 saat 100 µM DFX, 48 saat 991-15,5 µM doz aralıklarında PAE uygulamasının hücre canlılığına etkisini gösteren MTT plakası. 63
Şekil 4.3. HIF-1α, HIF-1β, VEGF, VEGFR, MMP-3 ve MMP-9 gen ifadelerine ait relatif kat değişim grafikleri. Tüm veriler, β-aktin ve 18S mRNA ifadelerinin ortalaması ile normalize edilmiştir. *Kontrol vs. deney grupları tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; deney grupları istatistiksel olarak farklıdır ($^{\#}p \leq 0,05$; $^{\#\#}p \leq 0,01$). ... 66
Şekil 4.4. miRNA ekspresyonlarının relatif kat değişimi. Tüm değerler U6 miRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. *Kontrol vs. deney grupları tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi $p \leq 0,05$; $^{**}p \leq 0,01$; deney grupları istatistiksel olarak farklıdır ($^{\#}p \leq 0,05$; $^{\#\#}p \leq 0,01$). ns; istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur. 68
Şekil 4.5. ARPE-19 hücre hattında kontrol ve deney gruplarının HIF-1α, MMP-3, MMP-9, VEGF ve β-aktin protein bantlarının görüntüsü. 69
Şekil 4.6. ARPE-19 hücre hattında kontrol ve deney gruplarının HIF-1α, MMP-3, MMP-9 ve VEGF protein ekspresyon seviyelerinin relatif kat değişim grafikleri. 70

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Tüm hayvan hücrelerinde, metabolik reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan adenozin trifosfatın (ATP) üretiminde oksijene ihtiyaç duyulmaktadır. Oksijen seviyesindeki en küçük değişikliklerde bile, oksijen homeostazını sağlamak hayati derecede önemlidir. Bununla birlikte, insan da dahil olmak üzere çoğu memeli, kısa süreli dahi olsa düşük oksijen seviyesinde ciddi sorunlarla karşı karşıya kalır. Oksijen, membran aktivitelerinin düzenlenmesine, hücre içi sinyalleşmeye, birçok genin ekspresyonuna ve apoptozun başlatılmasına katkıda bulunur (Arjamaa & Nikinmaa, 2006; Gibson, Cossins & Ellory, 2000; López-Barneo, Pardal & Ortega-Sáenz, 2001; Semenza, 2000).

Hipoksi, belirli bir organ, doku veya hücre tipindeki normal duruma kıyasla nispeten düşük (genellikle <%2) oksijen olması durumudur. Hipoksi, kısa (akut hipoksi; örneğin iskemi) veya uzun (kronik hipoksi; örneğin kronik böbrek hastalığı ve kanser) bir süre boyunca sürekli oksijen eksikliği durumudur (Chen vd., 2020).

Hipoksi, gelişimde hücre fizyolojisinin temel bir bileşeni olmasına rağmen kardiyovasküler bozukluklar, enflamasyon, solid (katı) tümörler ve iskemik hastalıklar gibi patolojik olaylarla da ilişkilidir (Guillemin & Krasnow, 1997; Madanecki vd., 2013; Yoshida vd., 2010). Bu patolojik olaylar daha sonra, var olan damarlardan yeni mikro damarlar geliştirme süreci olan anjiyogenez gibi onarım mekanizmalarının aktivasyonu yoluyla oksijen homeostazisinin düzenlenmesini sağlar (Tonini, Rossi & Claudio, 2003). Anjiyogenez, iskemik doku revaskülarizasyonu ve inme sonrası nöronal dokularda veya miyokard enfarktüsü sonrası kalpte gerekli olmakla birlikte, makula dejenerasyonu ve glokom gibi diğer hastalıklarda ve birçok kanser türünde istenmeyen bir durumdur (Beck

& Plate, 2009; Haider, Akbar & Ashraf, 2009; Madanecki vd., 2013; Shazly & Latina, 2009; Tonini vd., 2003). Bu nedenle, anjiyogenez regülasyonunun olası bir terapötik yöntem olarak kullanılması önemlidir. Yapılan birçok çalışmaya göre mikroRNA'ların, hipoksi ve anjiyogenezin düzenlenmesinde büyük etkileri olduğu belirlenmiştir (Crosby, Glazer & Ivan, 2009; Gee vd., 2010; Pocock, 2011).

Doğal ürünlerin bilinen faydalı etkileri sayesinde bu ürünler ile yeni ilaçların geliştirilmesi sağlık sektörü açısından oldukça önem taşımaktadır. Gelişen farmakolojik faaliyetler, bilim insanlarını bu alanda çalışmaya teşvik etmiş ve doğal ürünlerin izolasyonunda, saflaştırılmasında ve karakterizasyonunda büyük ilerlemeler katedilmiştir. Bu ilerlemelere bağlı olarak doğal ürünlerin farmakolojik aktivitesi, güvenliliği ve toksisitesi açısından incelenmesi, sağlık bilimlerinde bu ürünlerin araştırılmasında yeni bir ilgi alanı oluşturmuştur (Adki & Kulkarni, 2020; Clardy & Walsh, 2004). İlaç firmaları da, sentetik ilaçlar yerine doğal kaynaklı ilaç keşiflerine odaklanmışlardır. 1981'den 2014'e kadar onaylanan ilaçların yaklaşık %75'inin, kanser dahil çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan doğal kaynaklı veya yarı sentetik türevli ilaçların oluşturması bu durumun önemini göstermektedir (Newman & Cragg, 2016).

Çalışmamızda kullandığımız paeonol, *Paeonia moutan*'ın kök kabuğu *Moutan Cortex*'in önemli bir fenolik bileşenidir ve Çin tıbbında yaygın olarak kullanılmaktadır (Lin vd., 2015). Paeonolün, çok yönlü farmakolojik özellikleri açısından tekno-ticari bir ürün olarak geliştirilme potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Chu vd., 2013; Li vd., 2015; Xie vd., 2019; Zhang vd., 2017). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarla paeonolün önemli aktiviteleri bildirilmiş olsa da, ticari kullanımı için daha kapsamlı güvenlilik ve etkinlik verileri gerekmektedir (Adki & Kulkarni, 2020).

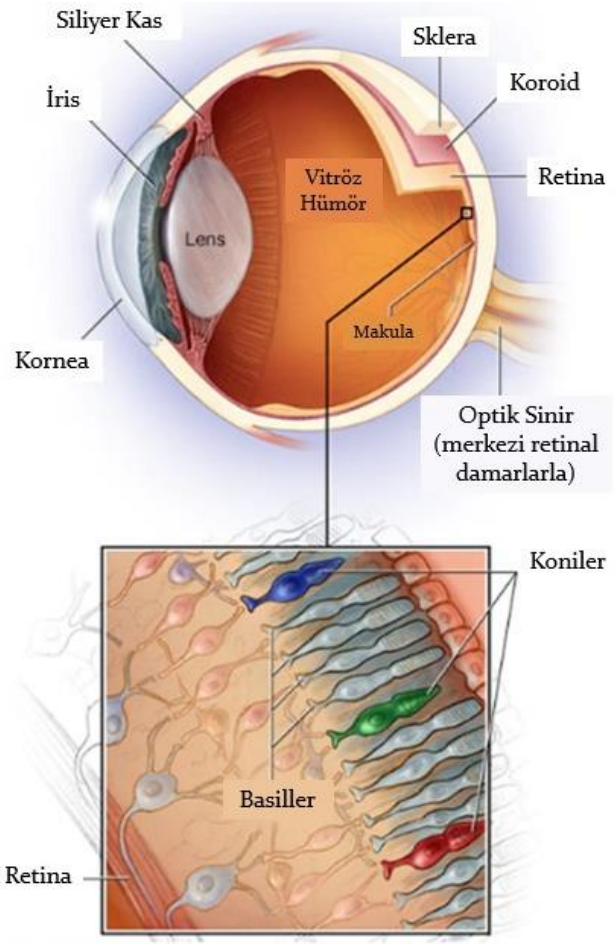
Bu bilgiler ışığında çalışmamızda göz dokusunda önemli bir hücre grubu olan retinal pigment epitel hücrelerinde paeonolün hipoksi sinyalindeki rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Retinal Dolaşım

Gözün arka kısmında, retina için sürekli oksijen ve besin tedarikinden sorumlu, hayati önem taşıyan koroidal ve retinal dolaşım olmak üzere iki damar sistemi vardır (Arjamaa & Nikinmaa, 2006). Koroidal arterler, koroidin üç vasküler katmanını oluşturmak için optik sinir çevresindeki skleranın içinden geçen uzun ve kısa posterior siliyer arterlerden oluşur (Şekil 2.1) (Zhang, 1994). Merkezi retina arteri, retinanın daha derin katmanlarında yoğun bir kılcal ağ örgüsü oluşturmak için retinayı çevreleyen yüzeysel arterlere dallanır. Sempatik sinirler tarafından kontrol edilen koroidal dolaşım, retina pigment epitelinin ve retinanın dış katmanlarının (özellikle fotoreseptörlerin) beslenmesinden sorumludur. Retinal dolaşım, retinal faktörlerle düzenlenir (Delaey & Van de Voorde, 2000). Koroid, % 65-85 oranında kan akışını oluşturup, retinanın dış kısmını (fotoreseptörler) beslerken, akışın % 20-30'si retinanın iç katmanlarını beslemektedir (Henkind, Hansen & Szalay, 1979). Retina dolaşımındaki kan akışı düşük iken koroiddeki akış yüksektir (Delaey & Van de Voorde, 2000). Retinanın iç ve dış yarıları oksijen (O_2) açısından farklı seviyelere sahip alanlardır. İç retinal oksijen basınç (pO_2) ortalamaları yaklaşık 20 mmHg'dir. Retinal dolaşımda etkili olan O_2 otoregülasyonu sayesinde, iç retinal pO_2'nin sistemik hipoksi, hiperoksi ve sağlıklı hayvanlarda göz içi basıncının artmasından nispeten etkilenmemesini sağlar (Wangsa-Wirawan & Linsenmeier, 2003).



Şekil 2.1. Retina tabakaları ve hücreleri (Clinic, 2015).

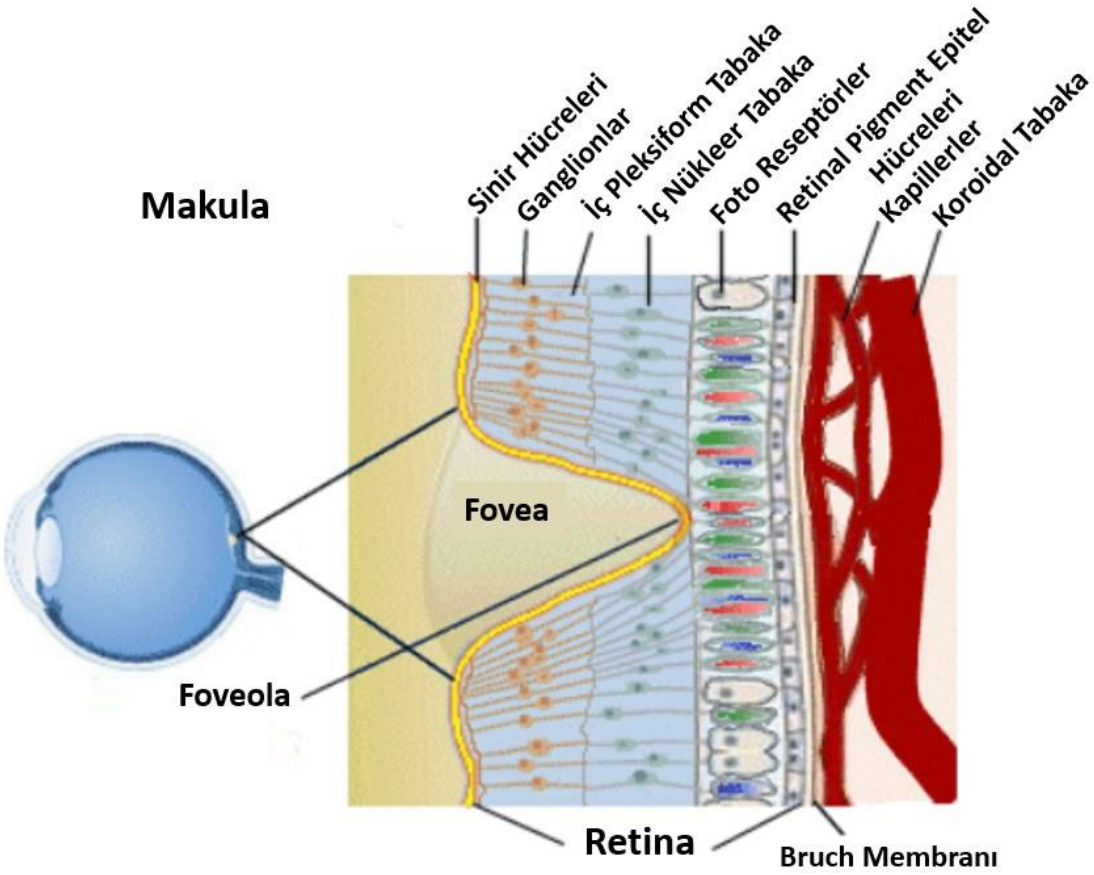
Retinal oksijenasyonu etkileyen önemli özellikler arasında çift dolaşımın varlığı, koroidin metabolik regülasyonunun olmaması, retinal dolaşımın oksijen regülasyonunun varlığı ve mitokondrilerin fotoreseptörlerin iç segmentlerinde yer alması bulunur (Wangsa-Wirawan & Linsenmeier, 2003). Oksijen, retinada beyin dahil olmak üzere diğer birçok dokuya göre daha hızlı tüketilir (Ames III, 1992; Anderson & Saltzman, 1964; Cohen, 1965). Oksijenin retina veya diğer dokularda depolanamaması ve bunların yüksek oksijen ihtiyacı, sürekli bir oksijen kaynağının varlığını gerektirir. (Vanderkooi, Erecinska & Silver, 1991).

2.1.1. Retinal Pigment Epitel Hücreleri

Retinal pigment epitel (RPE) hücreleri, omurgalı retinasının en dış katmanını oluşturur. RPE'nin zonula okludens ve zonula adherens bağlantıları, dış kan-retina bariyerini oluşturur. Bazolateral olarak, RPE hücreleri, oldukça vaskülarize olan koroidal

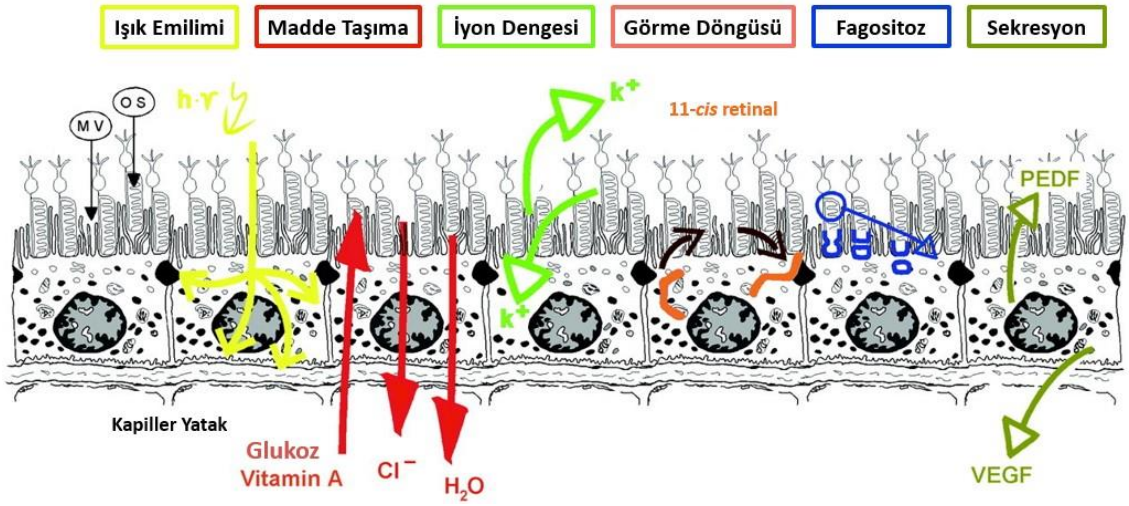
bağ dokusuna bakan, Bruch membranı adı verilen karmaşık, pentalaminer bir bazal membrana yapışır (Sethna & Finnemann, 2014).

Apikal olarak RPE hücreleri, fotoreseptör matriksinden salgılanan proteinlerle etkileşime girdiği nöral retinanın, avasküler subretinal boşluğuna bakar (Şekil 2.2). RPE hücrelerinden, dış segmentleri kaplayan apikal plazma membranlarından ince ve oldukça uzun mikrovilluslar uzanır. RPE'nin mikrovilluslarında yer alan yüzey reseptör proteinleri, mekanik olarak güçlü bir retinal adezyona aracılık eder. Yetişkin memeli gözünde, hem fotoreseptörler hem de RPE hücreleri, retinada ömür boyu tek bir fonksiyonel birim olarak hareket edecekleri şekilde postmitotiktir (Sethna & Finnemann, 2014).



Şekil 2.2. RPE hücreleri ve retinayı oluşturan katmanlar (Patel, 2015).

RPE hücrelerinin bariyer işlevi genel olarak nöral retinanın bütünlüğünü korurken, RPE hücreleri özellikle fotoreseptör basillerinin ve konilerinin, işlevini ve bütünlüğünü destekleyen çok sayıda başka görevi yerine getirir (Şekil 2.3) (Wimmers, Karl & Strauss, 2007).



Şekil 2.3. RPE hücrelerinin fonksiyonları (Strauss, 2005). **OS:** Fotoreseptörlerin ışığa karşı hassas dış segmenti, **MV:** Mikrovilluslar

RPE hücrelerinin görevleri;

1. Saçılan ışığı emen ve oksidatif stresle savaşan melanin pigmenti ile dolu çok sayıda melanozom organeline sahiptir (Burke vd., 2011). RPE hücreleri, β-karoten, α-tokoferol, lutein, zeaksantin ve askorbat gibi enzimatik olmayan antioksidanlara ek olarak süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimatik antioksidanlar kullanarak foto-oksidatif hasarı önler (Boulton & Dayhaw-Barker, 2001).
2. Besinleri nöral retinaya, metabolik atıkları koroide doğru taşır (Sethna & Finnemann, 2014).
3. Subretinal boşluğun hacmini korumak ve iyonik bileşimini kontrol etmek için çok sayıda hücre yüzeyi taşıyıcısı ve kanal proteini kullanır (Gundersen, Orlowski & Rodriguez-Boulan, 1991; Wimmers vd., 2007).
4. Görsel döngüye katılır. RPE'ye özgü izomeraz enzimi olan RPE65, all-*trans* retinalin 11-*cis* retinale (bir çeşit A vitamini) dönüşümünü katalize eder ve daha sonra yeniden kullanım için fotoreseptörlere geri gönderir (Redmond vd., 1998; Sethna & Finnemann, 2014).
5. Fotoreseptörlerin dış segment bölümlerinin sürekli yenilenmesine katılır. Karmaşık, multiprotein fagositik bir mekanizma, fagolizozomal sindirimi teşvik ederek dış segment kalıntılarını retinadan temizlemeye yarar (Sethna & Finnemann, 2014).

6. Hücreler canlılıklarını sürdürmek için koroidal damarların büyümesini ve geçirgenliğini kontrol eden endotelyal hücreler üzerinde ve fotoreseptörler üzerinde etkili olan bir dizi büyüme ve hayatta kalma faktörü salgılar (Philp, Wang, Yoon & Hjelmeland, 2003; Strauss, 2005).

Retinal pigment epitel hücreleri, görme bozukluğuna ve hatta körlüğe yol açan birçok göz hastalığının gelişiminde anahtar rol oynar. Hücrelerde oluşan patolojik değişikliklerin, bu değişikliklere bağlı olarak oluşan hücresel yanıtların ve bunların mekanizmalarının incelenmesi hücre kültürü modelleri ile sağlanmaktadır. RPE hücre kültürü modelleri ile yapılan çalışmalar, retinanın dejeneratif ve distrofik hastalıkları için etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine temel oluştururlar (Kuznetsova, Kurinov & Aleksandrova, 2014).

Bugüne kadar, çeşitli RPE hücre hatları üretilmiştir. Bunlardan bazıları Amerikan tipi kültür koleksiyonundan (ATCC) temin edilebilen, H80HrPE-6, ARPE-19, D407, RPE-340 gibi insandan elde edilen RPE hücre hatlarıdır. Bu tür hatların en büyük avantajı, yüzden fazla pasajda kültür edilebilmeleridir (Kuznetsova vd., 2014).

ARPE-19 hücreleri, oksidatif stres, retina patogenezi ve sinyal yolakları ile ilgili çalışmalarda, bunun yanı sıra ilaç ve toksisite testi araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Güçlü vd., 2018; Yuan, Du, He, Zhang & He, 2020; Zhu vd., 2013).

2.1.2. Perfüzyon Basıncı

Göz dahil tüm periferik organlar, normal işlevlerini sürdürebilmek için belirli miktarda oksijene ve besine ihtiyaç duyarlar. Bu ihtiyaç, kan dolaşımının perfüzyon basıncı ile karşılanır (Arjamaa & Nikinmaa, 2006). Oküler kan akışı, oksijenli kanın gözdeki damar sistemi boyunca dağılımını ifade eder. Oküler perfüzyon basıncı, kanın intraoküler damar sisteminden geçmesi için mevcut olan basıncı ifade eder ve perfüzyon seviyesi, damar çapının veya damar tonusunun bir fonksiyonu olan akışa karşı dirençten etkilenir (Caprioli & Coleman, 2010). Oküler kan akışı, vasküler dirençte bir artmaya veya azalmaya neden olan bölgesel vasküler daralma veya genişleme ile karakterize edilen otoregülasyon sergiler, böylece perfüzyon basıncı değişikliklerine yanıt olarak sabit bir besin kaynağı sağlanır (Costa vd., 2014; Harris, Ciulla, Chung & Martin, 1998).

Oksijen basıncı ve pH gibi vazodilatör koşullar da otoregülasyona katkıda bulunur. Genelde hipoksi sırasında damarların çapı artmakta (vazodilatasyon), akciğerler hariç yüksek oksijen basıncı sırasında ise azalmaktadır (vazokonstrüksiyon). Bölgesel veya merkezi düzenleyici mekanizmalara ek olarak, damarların tonusunun düzenlenmesi, vazopressin, norepinefrin, epinefrin, anjiyotensin II, kininler, endotelinler, nitrik oksit ve natriüretik peptitler gibi dolaşımda bulunan hormonlar ve maddeler aracılığıyla, vazokonstrüksiyon veya vazodilatasyon sayesinde sağlanır. Dolayısıyla, hipoksik transkripsiyon faktörleri ve gen ekspresyonu, düzenleyici seviyede başka birçok faktör tarafından modüle edilebilmektedir (Arjamaa & Nikinmaa, 2006).

2.2. Hipoksi

Tüm ökaryotik organizmalar, enerji üretimi için belirli seviyede oksijene ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle, memelilerde vasküler sistem tarafından korunan sabit bir O_2 kaynağı; doku ve organ gelişimi, fonksiyonu ve homeostazı için vazgeçilmezdir. Doku oksijenasyonu, dokularda üretilen metabolik ürünlerin üretilmesinde ihtiyaç duyulan ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla oluşan O_2'nin vasküler sistemde eritrositler aracılığıyla iletilmesidir (Carmeliet, 2005; Krock, Skuli & Simon, 2011; Semenza, 2001).

Hipoksi, dokulardaki O_2 dengesinin bozulmasıyla meydana gelen, ortam O_2 konsantrasyonunda bir azalma olarak tanımlanmaktadır (Krock vd., 2011; Rey & Semenza, 2010). Hipoksi, iskemik kalp hastalığı, inme, kanser, kronik akciğer hastalığı ve konjestif kalp yetmezliği gibi yaygın mortalite nedenlerinin patofizyolojisinde temel bir rol oynar. Bu hastalık durumlarında hipoksi, hedef organlardaki gen ekspresyonunda yeterli adaptasyonu sağlayamayan veya doğrudan hastalık patogenezine katkıda bulunan değişiklikleri uyarır (Semenza vd., 2002).

Damar tıkanıklığı veya yırtılmasına bağlı vasküler disfonksiyon, O_2 iletiminin azalmasına neden olarak, diyabetik retinopati, periferik arter hastalığı (atardamar tıkanıklığı) ve iskemik kalp hastalığında patojenik bir faktördür (Carmeliet, 2005). Embriyonik gelişimdeki veya tümör büyüme sürecindeki hızlı hücresel bölünme, metabolik aktivitelerin artmasına bağlı olarak O_2 kullanımının da artması ile bölgesel hipoksiye neden olabilmektedir (Bertout, Patel & Simon, 2008).

Biyolojik sistemlerde, normal fizyolojik oksijen konsantrasyonu dokudan dokuya göre değişir. Örneğin, arteriyel kanın %14'lük bir normal pO_2 değeri varken miyokardın %10'luk ve diğer dokuların çoğunda yaklaşık %5'lik bir pO_2 değeri vardır (Carreau, Hafny-Rahbi, Matejuk, Grillon & Kieda, 2011). Bununla birlikte oksijen, kıkırdak, kemik iliği ve timüs gibi yapılarda %1 ya da çok daha az seviyelerde bulunmaktadır (Krock vd., 2011).

2.2.1. Hipoksi Yolağı ve Mekanizması

Metabolik homeostaz ve sağkalım için oksijene hayati bağımlılık, hücrelerin, dokuların ve organizmaların hipoksiye adapte olmasını sağlayan moleküler bir mekanizmanın evrilmesine yol açmıştır. Bu adaptif cevap, hipoksi ile indüklenen faktörler (HIF'ler) tarafından yönetilmektedir (Semenza, Nejfelt, Chi & Antonarakis, 1991).

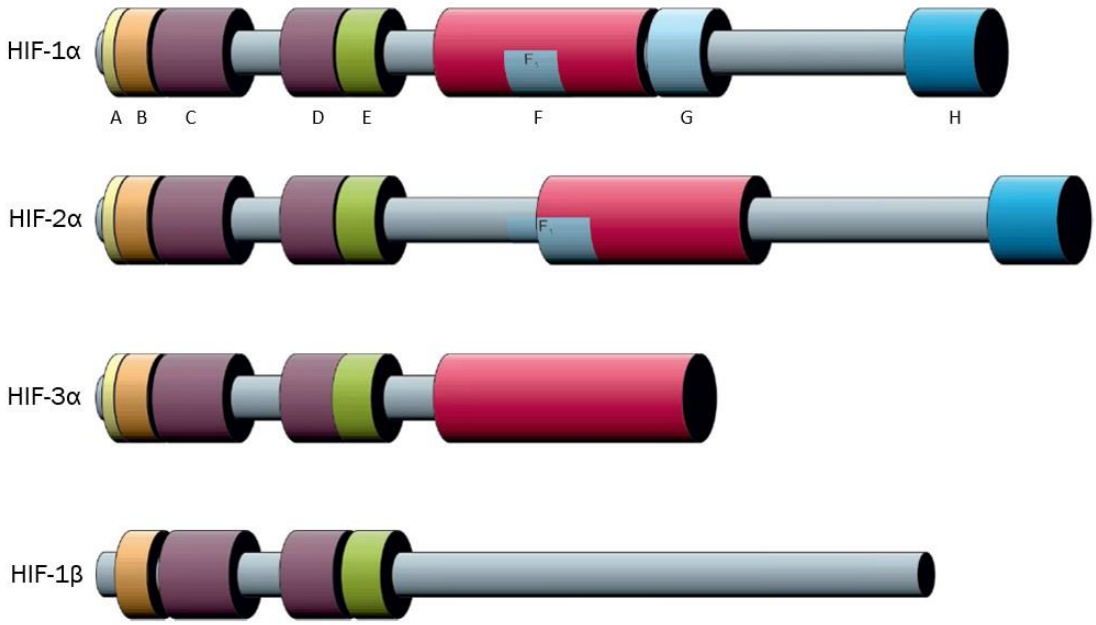
HIF'ler, tüm metazoan türlerinde oksijen homeostazının ana düzenleyicileri olarak başlıca anjiyogenez, eritropoez, enerji metabolizması ve glikoliz gibi hipoksi altında hücre yaşamı için gerekli genleri indükleyen transkripsiyonel faktörlerdir (Semenza, 2011; Semenza & Wang, 1992; Wang, Jiang, Rue & Semenza, 1995). Birçok fizyolojik sistemde HIF'lerin homeostatik rollerinin aydınlatılması ve terapötik amaçlar için hedeflenmesi, kronik hastalıklarda HIF düzensizliğinin patolojik sonuçlarının belirlenmesi konusunda hızlı ilerlemeler kaydedilmektedir (Semenza, 2012).

Vasküler sistem, vücuttaki tüm hücrelere O_2 ve metabolitleri ilettiğinden O_2 dengesinin birincil düzenleyicisi olarak işlev görmektedir. Düşük O_2 seviyesine yönelik transkripsiyonel yanıtların çoğuna, çok sayıda anjiyogenik, metabolik ve hücre döngüsü genlerinin ekspresyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri ve HIF'ler aracılık eder. Buna göre, HIF yolağı anjiyogenezin ana düzenleyicisi olarak görülmektedir. HIF modülasyonu, kanser, iskemik kalp hastalığı, periferik arter hastalığı, yara iyileşmesi ve neovasküler göz hastalıkları dahil olmak üzere çok çeşitli patolojiler için terapötik fayda sağlayabilmektedir (Krock vd., 2011).

Memelilerde, bugüne kadar HIF ailesine ait heliks-ilmik-heliks tipi, hipoksi ile indüklenen faktör-1 (HIF-1), hipoksi ile indüklenen faktör-2 (HIF-2) ve hipoksi ile indüklenen faktör-3 (HIF-3) olmak üzere üç adet transkripsiyon faktörü belirlenmiştir.

HIF-1 ailesi, insan dokularının tamamında eksprese edilirken, HIF-2α ve HIF-3α belirli hücre tiplerinde eksprese edilmektedir (Fabian, 2018; Jain, Maltepe, Lu, Simon & Bradfield, 1998; Talks vd., 2000).

Her alt birim, heterodimerizasyon ve DNA bağlanmasına aracılık eden temel-heliks-ilmik-heliks-PAS (bHLH-PAS) alanları içerir (Şekil 2.4) (Jiang, Rue, Wang, Roe & Semenza, 1996; Wang vd., 1995).



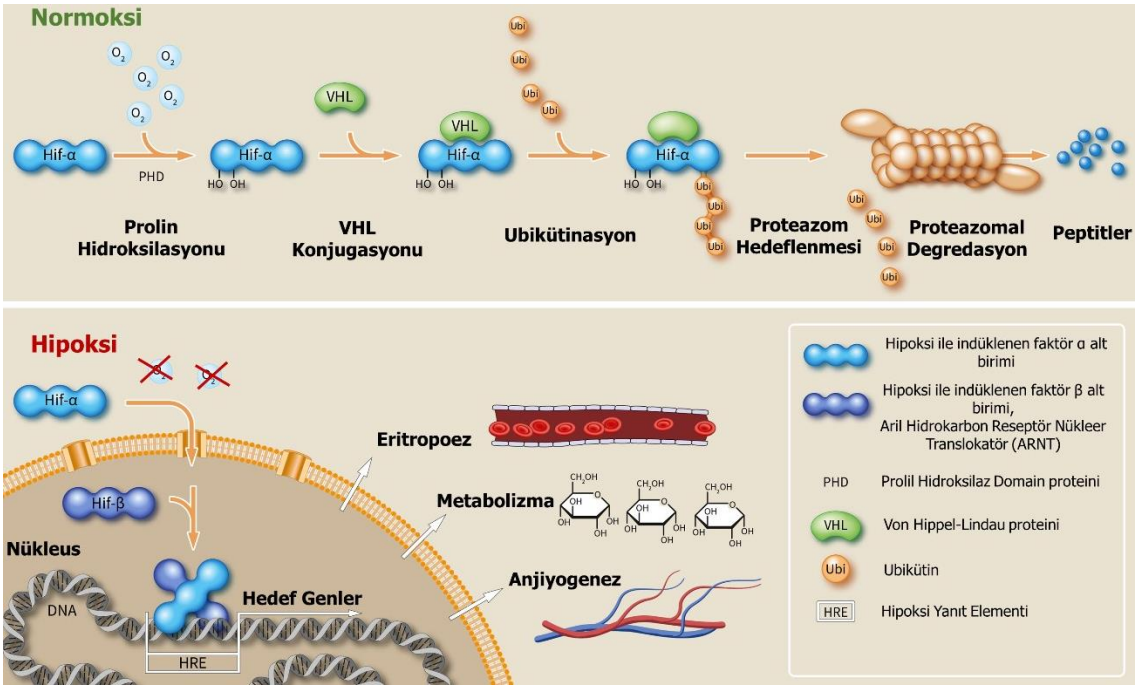
Şekil 2.4. HIF polipeptitlerinin alan yapısı (Fabian, 2018). **A:** DNA-bağlanma alanı; **B:** Heliks-ilmik-heliks alanı; **C:** Per/Arnt/Sim (PAS) A alanı; **D:** PAS B alanı; **E:** PAC motifi; **F:** Oksijene bağlı degredasyon alanı; **F1:** N-terminali transaktivasyon alanı; **G:** ERK hedef alanı; **H:** C-terminali transaktivasyon alanı.

HIF-1, hücresel hipoksiye yanıt olarak eksprese edilen, çoklu hücresel ve sistemik homeostatik yanıtlara aracılık eden transkripsiyonel bir aktivatördür. Pulmoner hipertansiyon, miyokard iskemisi, kanser ve daha birçok önemli patofizyolojik yanıtlara HIF-1 aracılık etmektedir (Semenza vd., 2002).

HIF-1, kararsız bir α alt biriminden (120 kDa) ve kararlı bir β alt biriminden (92 kDa) oluşan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür. Her iki HIF-1 alt birimi de bHLH-PAS ailesinin üyeleridir (Wang vd., 1995). β- alt birimi yapısal bir nükleer protein olmasına rağmen, α alt birimi oksijen seviyeleri ile düzenlenir. Hipoksik koşullar altında HIF α- ve β- alt birimlerinin dimerizasyonu, koaktivatör p300'ü içeren bir transkripsiyonel yanıt oluşturur (Hewitson & Schofield, 2004).

2.2.1.1. HIF-1α Aracılı Sinyalizasyon

Hücrelerde stabil olarak ifade edilen HIF-β'dan farklı olarak, HIF-α alt birimleri normoksik koşullar altında 26S proteazomu tarafından sürekli olarak degrede olmaktadır. Bu mekanizma, yeterince oksijenlenmiş hücrelerde HIF heterodimerlerinin oluşumunu ve aktivitesini önlemektedir. Genel görüş, insanlarda HIF-1α mRNA ekspresyonunun oksijenden etkilenmediği yönündedir (Arjamaa, Nikinmaa, Salminen & Kaarniranta, 2009). Hipoksik koşullar altında ise HIF-α alt birimleri, yapısal olarak bozulmadan, sitoplazmada stabilize olup HIF-1β ile nükleer heterodimer oluşturarak, hücrenin gen ekspresyonunu yeniden düzenlemektedir. Böylece degredasyonun inhibisyonuyla HIF birikmeye başlar ve oksijene bağımlı anaerobik metabolizmaya aracılık eden genlerin indüksiyonu gerçekleşir (Şekil 2.5) (Arjamaa vd., 2009; Fabian, 2018).

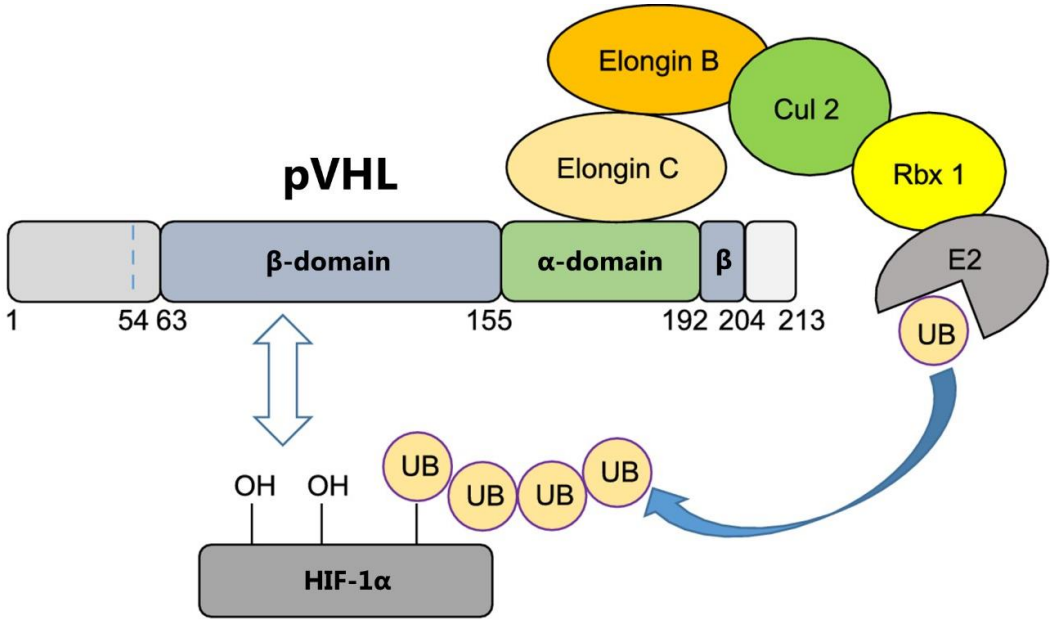


Şekil 2.5. Normoksik ve hipoksik şartlar altında HIF degredasyonu ve stabilitesi (Hegasy, 2019).

HIF-α'nın normoksik degredasyonunun moleküler sistemi ilk olarak 2001 yılında açıklanmıştır (Şekil 2.5) (Bruick & McKnight, 2001; Jaakkola vd., 2001). Sürekli proteazomal eliminasyonun, prolil-4-hidroksilaz (PHD) ailesinin aracılık ettiği oksijene bağlı hidroksilasyon ile oluştuğu ortaya çıkmıştır. Bugüne kadar, memeli hücrelerinde prolil-4-hidroksilaz 1 (PHD1), prolil-4-hidroksilaz 2 (PHD2) ve prolil-4-hidroksilaz 3

(PHD3) olarak da bilinen üç HIF düzenleyici tanımlanmıştır (Willam, Nicholls, Ratcliffe, Pugh & Maxwell, 2004).

HIF-1α'da bulunan prolin 402 ve 564 alanlarının hidroksilasyonları, polipeptidin elongin-B, elongin-C, cullin-2 ve ring-box protein-1'den oluşan E3 ubikütin ligaz kompleksinin, substrat tanıma bileşeni olan von Hippel-Lindau proteinine (pVHL) olan afinitesini arttırmaktadır (Fabian, 2018; Maxwell vd., 1999). Bu kompleks, polipeptid ana proteazomal degredasyonu için oksijene bağlı degredasyon alanı içinde lizin rezidülerinin pVHL aracılı ubikütinasyonuna yol açmaktadır (Fabian, 2018) (Şekil 2.6).

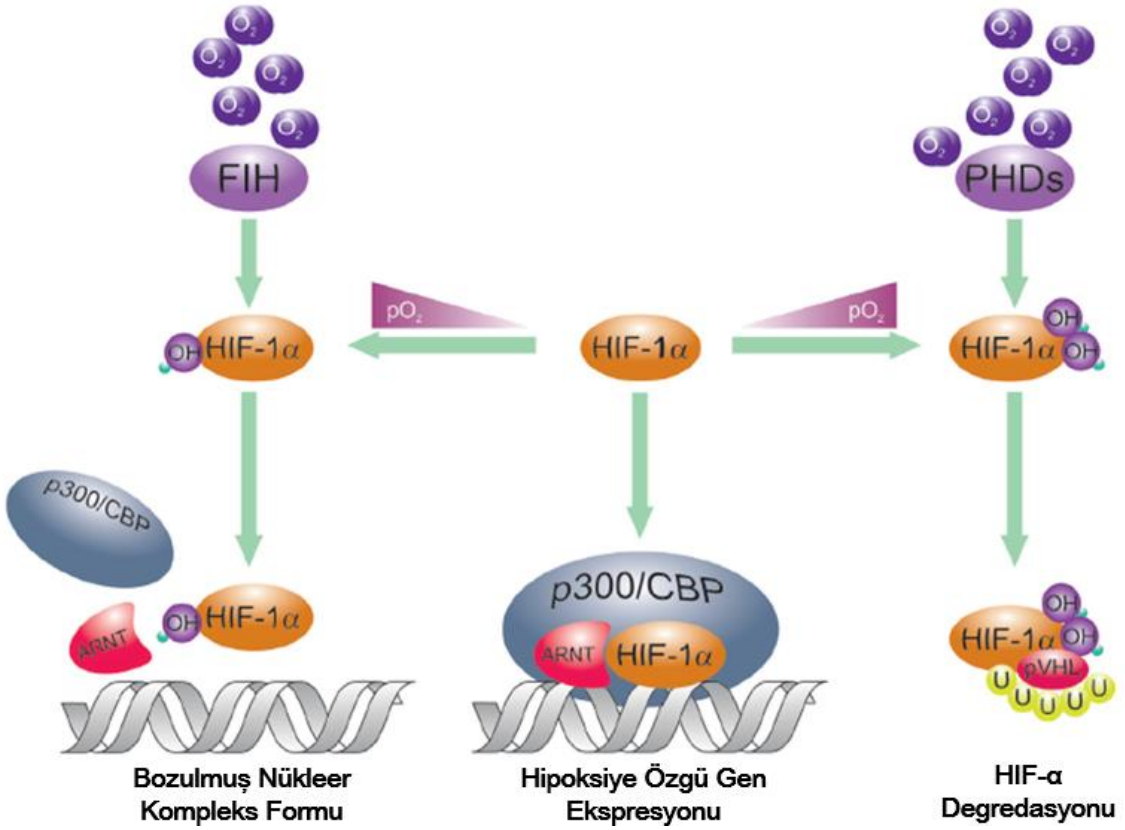


Şekil 2.6. VHL proteininin E3 ligaz kompleksi ve HIF-1α ile etkileşiminin şematik yapısı (Aki, Li, Li, Liu & Lee, 2019). **pVHL:** von Hippel-Lindau proteini, **Rbx 1:** Ring-box protein-1, **Cul 2:** cullin-2, **UB:** ubikütin

Hipokside, bu hidroksilasyon aktivitesi, oksijen eksikliğinden dolayı azalır ve HIF-α alt birimlerinin stabilizasyonu ile sonuçlanır. Korunmuş prolil rezidülerinde HIF-α alt birimlerini hidroksilatlamak için α-ketoglutata aracılık eden moleküler oksijen, kofaktörler ve kosubstratlar olarak; askorbik asit, demir ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsünü kullanmaktadır (Hirsilä, Koivunen, Günzler, Kivirikko & Myllyharju, 2003; Jaakkola vd., 2001).

PHD'nin aracılık ettiği translasyonel modifikasyonların sonrasında ek olarak, HIF-α'nın hidroksilasyona bağımlı ikinci seviye düzenlenmesi vardır. HIF'i inhibe eden faktörün (FIH) aracılık ettiği bu translasyon sonrası modifikasyon asparajin hidroksilaz

olarak adlandırılır. Bununla birlikte, PHD'lerin aksine, FIH aracılı hidroksilasyon, HIF'in p300/CBP gibi transkripsiyonel koaktivatörlerle etkileşimini önlemektedir (Şekil 2.7) (Lando, Peet, Whelan, Gorman & Whitelaw, 2002; Li vd., 2008; McNEILL vd., 2002).



Şekil 2.7. Oksijene bağımlı HIF-1α yanıtları (Fabian, 2018). **FIH:** HIF inhibe edici faktör; **PHD'ler:** prolil-4-hidroksilaz; **HIF:** hipoksi ile indüklenebilen faktör; **ARNT:** aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokatör, HIF-1β; **pVHL:** von Hippel-Lindau proteini; **OH:** hidroksilasyon; **U:** ubikütin; **p300/CBP:** HIF heterodimerlerinin transkripsiyonel koaktivatörleri.

2.2.1.2. HIF-1β Aracılı Sinyalizasyon

Oksijenin hücresel homeostazdaki temel rolünden dolayı, hipoksik uyarı, tüm hücresel fonksiyonların sıkı koordinasyonuna dayanan karşı önlemler gerektirir. Bunun bir parçası olarak, PHD-HIF eksenini algılayan primer hipoksi ile katabolizma, hücre döngüsü veya hücresel savunma mekanizmaları gibi hücresel fonksiyonlarda yer alan farklı moleküler mekanizmalar arasında çeşitli etkileşimler mevcuttur. Bu etkileşimlerin aracılarından biri, aril hidrokarbon nükleer translokatör (ARNT) olarak da bilinen HIF heterodimerlerinin β alt birimidir (Fabian, 2018).

Aktif HIF'lerin oluşumundaki kritik rolünün yanı sıra, yapısal olarak ifade edilen HIF-1β, ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda yer alan genleri hedefleyen bir transkripsiyon faktörü olan aril hidrokarbon reseptörünün (AhR) bir bileşenidir (Poland, Glover & Kende, 1976; Reyes, Reisz-Porszasz & Hankinson, 1992). Sınıf I bHLH-PAS protein ailesi üyesi AhR, çeşitli endojen ve ekzojen ligandlar tarafından her yerde eksprese edilerek aktive edilir. Aktif olmayan durumunda, sitoplazmada ısı şok proteini 90 gibi baskılayıcı proteinlere sahip heterodimerler oluşturur (Perdew, 1988). Ligand bağlanması üzerine nükleer lokalizasyon sinyali açığa çıkar ve nükleer translokasyonu takiben AhR, HIF-1β ile dimerleşir (Hoffman vd., 1991). Hipoksi sinyal yolağının aktivasyonu AhR aracılı cevapları etkiler ve tersine, HIF-1β'nın AhR aracılı bağlantısı hipoksi cevabını zayıflatır. Sırasıyla hipokside veya AhR ligandları varlığında, AhR/HIF-1β veya HIF-1α/HIF-1β heterodimerlerinin oluşumu, insan hücrelerinde HIF-1β'nın dimer formasyonunun sınırlayıcı faktörü olarak davrandığını gösterir (Schults vd., 2010). HIF-1α'nın AhR'ye afinitesi HIF-1β'ya göre daha yüksektir (Gradin vd., 1996).

2.2.2. Hipoksi ve Genel Etkileri

Hipoksiye adaptasyon, oksijen tüketiminin azaltılması ve oksijen kaynağının artması şeklinde iki yolla gerçekleşmektedir. Çok hücreli organizmalarda, oksijen kaynağının artması, artan eritropoez ve anjiyogenez dahil olmak üzere HIF ile indüklenen genler tarafından yönetilen bu hücre dışı koordinasyon birçok organda değişikliklere sebep olmaktadır (Fabian, 2018).

Sistemik düzeyde, hipoksiyle aktive edilen HIF'ler, karaciğer ve interstisyel böbrek hücrelerinde eritropoietin (EPO) ekspresyonunu indükleyerek, kemik iliğinde eritropoezi tetikler (Semenza & Wang, 1992; Wang & Semenza, 1993). Bununla birlikte, hepatosite özgü demir homeostazı düzenleyici hepsidin tarafından düzenlenen, kırmızı kan hücresi üretiminin artması, kemik iliği eritroblastlarının demire olan ihtiyacını arttırır. Hepsidin peptidi, bilinen tek hücresel demir taşıyıcı olan ferroportini bağlayarak, sırasıyla makrofajlardan ve bağırsak epitel hücrelerinden demir salınımını ve emilimini önlemekten sorumludur (Nemeth vd., 2004). Yukarı düzenlenmiş HIF aracılı eritropoez, hepatik hepsidin kodlayan genin baskılanmasına neden olur. Serum hepsidinin hipoksi üzerindeki etkisinin azalması sonunda, artmış eritropoezin artan demir ihtiyacını

karşılayan bağırsak epitelinden yüksek demir salınımı ile sonuçlanır (Fabian, 2018; Leung, Srai, Mascarenhas, Churchill & Debnam, 2005).

Hipoksi bölgesel olarak geliştiği zaman, oksijen taşıma kapasitesinin tamamen artması, hipoksik dokuların oksijen kaynağını arttırmak için yeterli olmayabilir. Bu koşullarda hipoksi, hipoksi sinyallemesinin başka bir doku düzeyinde negatif geri besleme döngüsünü temsil eden anjiyogenez ile birlikte bulunur. Düzenlemenin bu koluna vasküler endotelyal büyüme faktörü olarak adlandırılan temel anjiyogenez düzenleyici büyüme faktörü aracılık eder. EPO'ya benzer şekilde, embriyonik vaskülogenezle endotel hücrelerin hayatta kalmasının ve proliferasyonunun temel belirleyicisi olan VEGF, HIF-1 ve HIF-2'nin ortak bir hedefidir (Shweiki, Itin, Soffer & Keshet, 1992; Takeda vd., 2004). Ek olarak, hipoksik stromal veya tümör hücreleri tarafından eksprese edilen yüksek düzeylerde VEGF, endotelyal hücre metabolizmasını glikolize doğru yönlendirerek düzenler (De Bock vd., 2013). Artan glikoliz sadece hipoksik koşullar altında endotelyal hücre sağkalımını desteklemekle kalmaz, aynı zamanda VEGF aracılı anjiyogenezin tamamlayıcı bir mekanizmasını temsil eden damar filizlenmesini de tetikler (Xu vd., 2014). Sonuç olarak, artan oksijen ve demir seviyeleri, PHD'lerin, hipoksi sinyali ile kosubstratlara olan ihtiyacının artmasını sağlar (McNeill vd., 2005).

2.2.3. Oküler Hastalıklarda Oksijen

İnsan vücudunun metabolik olarak en aktif dokusu olan retina, oksijen seviyesindeki azalmaya oldukça duyarlıdır. Akciğer veya kalp hastalığının neden olduğu sistemik hipoksemi ve gözde lokal tıkayıcı vasküler hastalıklar retinal hipoksiye neden olabilir (Arjamaa & Nikinmaa, 2006).

Retinal dolaşımdaki bozukluklar, diyabetik retinopatide ve prematüre retinopatisinde vazoproliferasyona sebep olan doku hipoksisine yol açar. Sistemik hipoksi ve yüksek göz içi basıncı, koroidal kan akışının metabolik olarak düzenlenememesinden dolayı, fotoreseptörlerin oksijen tüketiminde ve koroidal dolaşımdaki pO_2 seviyesinde azalmaya neden olur. (Wangsa-Wirawan & Linsenmeier, 2003).

Retinanın dejeneratif hastalıkları arasında yer alan iskemik retinopatiler, rubeosis iridis, diyabetik retinopati, prematüre retinopatisi ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi hastalıklar, metabolik değişikliklerden kaynaklanırken (Rivera vd., 2017; Rodrigues vd., 2016), retinitis pigmentosa, Leber konjenital amorozisi gibi bazı retinal distrofiler ise genetik kusurlar sonucu oluşmaktadır (Cammalleri vd., 2019; Quinn vd., 2019; Wang, Knight, Thanh-thao & Mehta, 2019).

Retinal dejeneratif hastalıklarda, neovaskülarizasyona yol açarak retinal hücre ölümüne sebep olan yüksek seviyede vasküler geçirgenlik (vazopermeabilite), patolojik neovaskülarizasyon, diyabetik retinopati, prematüre retinopatisi, retina ven tıkanması ve yaş tip yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi çeşitli retina hastalıklarında en sık rastlanan patofizyolojidir (Cammalleri vd., 2019; Kurihara, 2018). Retinal distrofi hastalığı olan fotoreseptör dejenerasyonu ile karakterize retinitis pigmentosa, iskemiye bağlı dejeneratif patolojiler için tipik olan neovaskülarizasyona zıt bir progresif atrofi sürecine uğrasa da, hem dejeneratif hem de distrofik retinal hastalıkların, retinal hasara yanıt olarak aktifleşen, enflamatuar sitokinlerin üretimini ve salınımını artıran kronik enflamatuar süreçleri ortaktır (Cammalleri vd., 2019; Lang vd., 2019).

2.2.3.1. Diyabetik Retinopati

Diyabetik retinopati, yetişkinlerde görme bozukluğunun önde gelen nedenlerinden olup ağırlıklı olarak retinal vaskülatür bir hastalıktır. İlk olarak kılcal oklüzyona ve ardından vasküler proliferasyona yol açar. Hastalığın erken evresinde retinal vasküler geçirgenlik, klinik retinopatinin ortaya çıkmasından önce bile artabilmektedir (Russ, Gaylord & Haselton, 2001; Sheth, 1999). Kan akışının azalması, diyabetin başlamasından sonra görülen ilk fizyolojik belirtilerden biridir (Arjamaa & Nikinmaa, 2006). Retinal vasküler sızıntı ve retinanın kalınlaşması diyabetik makula ödemine neden olur. Diyabetik retinopatinin ileri safhasında, vasküler geçirgenlikteki anormal artışlar retinanın perfüze olmamasına veya oksijen basıncının azalmasına sebep olan retinal iskemiden kaynaklanır (DeNiro, Alsmadi & Al-Mohanna, 2009). Bu aşama sırasında, kılcal endotel hücrelerinin aşırı çoğalması sonucu oluşan retina neovaskülarizasyonu, retinada ve vitrözde yeni damarların anormal oluşumuna neden olarak proliferatif diyabetik retinopatiye yol açar (Shiels, Zhang, Ambler & Taylor, 1998; Stitt, Bhaduri, McMullen, Gardiner & Archer, 2000). Ek olarak, diyabetik retinopatinin

ileri aşamalarında, iskeminin neden olduğu patolojik anjiyogenez, şiddetli vitröz boşluk kanamasına ve/veya retina dekolmanına neden olarak ciddi görme kaybına neden olur (DeNiro vd., 2009).

2.2.3.2. Prematüre Retinopatisi

Prematüre retinopatisi, erken doğan bebeklerde oluşan suni ventilasyon sırasında oksijen konsantrasyonundaki dalgalanmaların sebep olduğu bir komplikasyondur ve ilerleyen dönemlerde belirlenen görme bozukluğu ve körlüğün önde gelen nedenlerinden biridir (Arjamaa & Nikinmaa, 2006). Prematüre retinopatisi, erken doğumdan sonra gecikmiş retinal vasküler büyüme ve yetersiz vaskülarizasyon ile başlar, bu da hipoksiye neden olur ve anormal damar büyümesine yol açan büyüme faktörlerinin salınmasını tetikler (Smith, 2003). Bununla birlikte, normal retinal vasküler büyümeye ve neovaskülarizasyona katkıda bulunan hem oksijenle düzenlenen hem de oksijenle ilişkili olmayan faktörler vardır. Hipoksik gelişen retinada VEGF salınır ve neovaskülarizasyonda düzenleme rolü oynar (Smith, 2003).

2.2.3.3. Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu

Yaşa bağlı makula dejenerasyonu, retinanın makula bölgesini etkileyen ve merkezi görme kaybına neden olan progresif bir hastalıktır (Lim, Mitchell, Seddon, Holz & Wong, 2012). Erken evre yaşa bağlı makula dejenerasyonu, drusen gibi klinik belirtileri ve retina pigment epitelindeki anormallikleri içerir. Geç evre yaşa bağlı makula dejenerasyonu, neovasküler (ıslak veya eksüdatif olarak da bilinir) veya neovasküler olmayan (atrofik veya kuru olarak da bilinir) tiptedir (Mitchell, Liew, Gopinath & Wong, 2018). Görme kaybının çoğu, neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonu ve coğrafi atrofi süreçlerinden birine bağlı olarak hastalığın geç aşamalarında meydana gelir. Neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonunda, koroidal neovaskülarizasyon sebebiyle nöral retinada, lipidlerin ve kanın birikmesi fibröz skar oluşumuna yol açar. Coğrafi atrofide, retina pigment epiteli, koriokapillaris ve fotoreseptörlerde progresif atrofi meydana gelir (Lim vd., 2012). Yaşa bağlı makula dejenerasyonu, dünya çapında ciddi geri döndürülemez görme kaybının üçüncü önde gelen nedeni olmasına rağmen, VEGF'yi hedefleyen tedavilerin başlamasından bu yana körlük ve görme bozukluğu insidansında azalma olduğu bildirilmiştir (Mitchell vd., 2018).

2.2.3.4. Von Hippel-Lindau Hastalığı

Von Hippel-Lindau (VHL) hastalığı, HIF-1α tarafından düzenlenen otozomal dominant bir hastalıktır. VHL, VHL tümör baskılayıcı genin inaktivasyonunun sonucu olan merkezi sinir sistemi ve retinadaki hemanjiyoblastomlar, renal hücre karsinomları, feokromositoma ve adacık hücresi tümörleri ile karakterizedir (Iida vd., 2004; Kim & Kaelin, 2004). Bu gen normalde anjiyogenezi inhibe eden VHL tümör supresyon proteinini üretir. Oksijene bağımlı hastalıklar arasında von Hippel-Lindau bir model sendrom olarak kabul edilebilir. Hem pVHL hem de HIF-1α, anjiyogenez ve hücre proliferasyonundan sorumlu olan diğer genleri hedefleyebilir (Arjamaa & Nikinmaa, 2006).

2.2.3.5. Glokom

Glokom, optik sinirde hasara ve geri dönüşü olmayan görme kaybına yol açan kronik ve ilerleyici bir göz hastalığıdır (Casson, Chidlow, Wood, Crowston & Goldberg, 2012; Zhou, Chen, Yan & Xia, 2019). Retinanın en içteki sinir hücreleri olan retina gangliyon hücrelerinin kaybı ile sonuçlanır ve tedavisi olmayan, görmeyi tehdit eden en yaygın durumlardan biridir (Vohra vd., 2019). Yüksek göz içi basıncı; retinal iskemi, optik sinir hasarı ve retinal gangliyon hücre ölümü ile sonuçlanan, glokomun en kritik risk faktörlerinden biridir (Lafuente vd., 2002; Selles-Navarro, Villegas-Perez, Salvador-Silva, Ruiz-Gomez & Vidal-Sanz, 1996). HIF-1α aracılığıyla VEGF yolağının bloke edilmesinin veya susturulmasının retinal iskemiye fayda sağladığı bildirilmiştir (Ling vd., 2013). Ayrıca, retinadaki VEGF inhibisyonunun, glokom patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Bracha, Moore, Ciulla, WuDunn & Cantor, 2018; Lee vd., 2017).

2.2.3.6. Yüksek İrtifa Retinopatisi

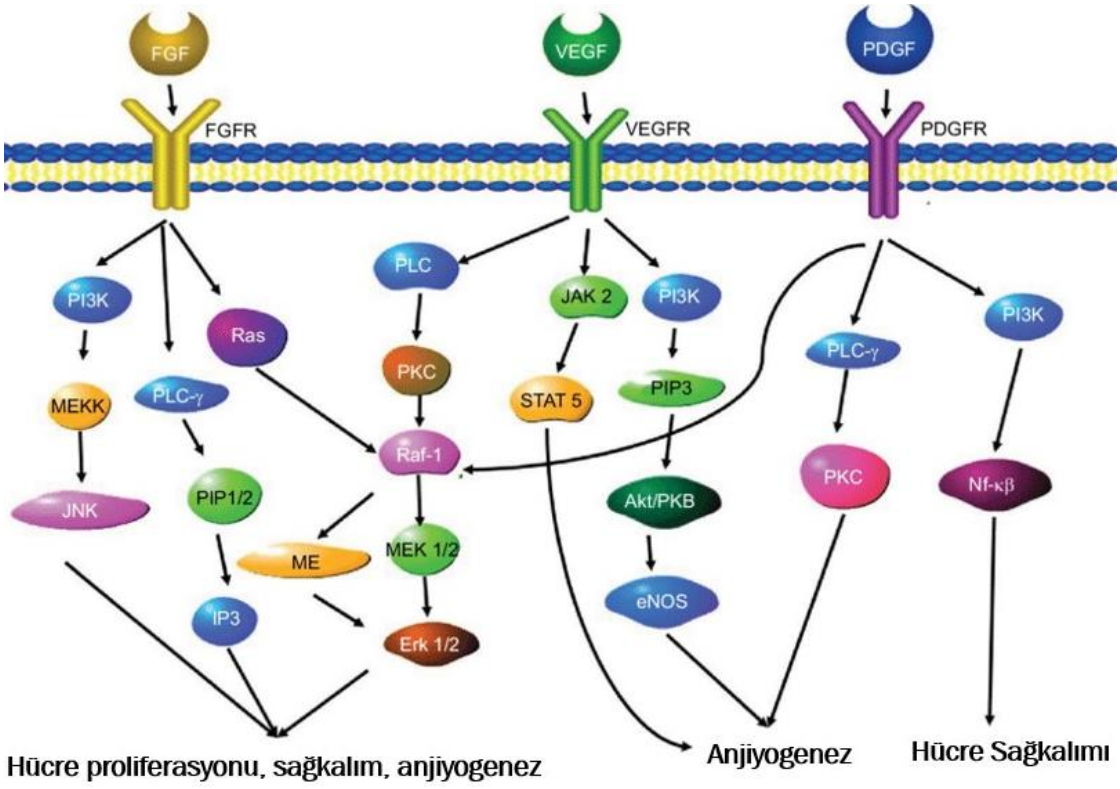
Günümüzde yüksek irtifada yapılan dağ yürüyüşleri ya da uzun süreli yüksek bölgelerde yaşam, yüksek irtifa retinopatisinin özellikleri olan hipoksinin neden olduğu intraretinal kanamalar, vasküler kıvrımlar (tortuosity), artmış hematokrit ve skotoma sebep olabilmektedir (Lang & Kuba, 1997; Wiedman & Tabin, 1999). Yüksek irtifa retinopatisi insanda tetiklendiğinde, diğer retinal hipoksik durumlarında oluşan moleküler

sistemlerin bu hastalıkta da aynı şekilde işlediği düşünülmektedir (Arjamaa & Nikinmaa, 2006).

2.3. Anjiyogenez

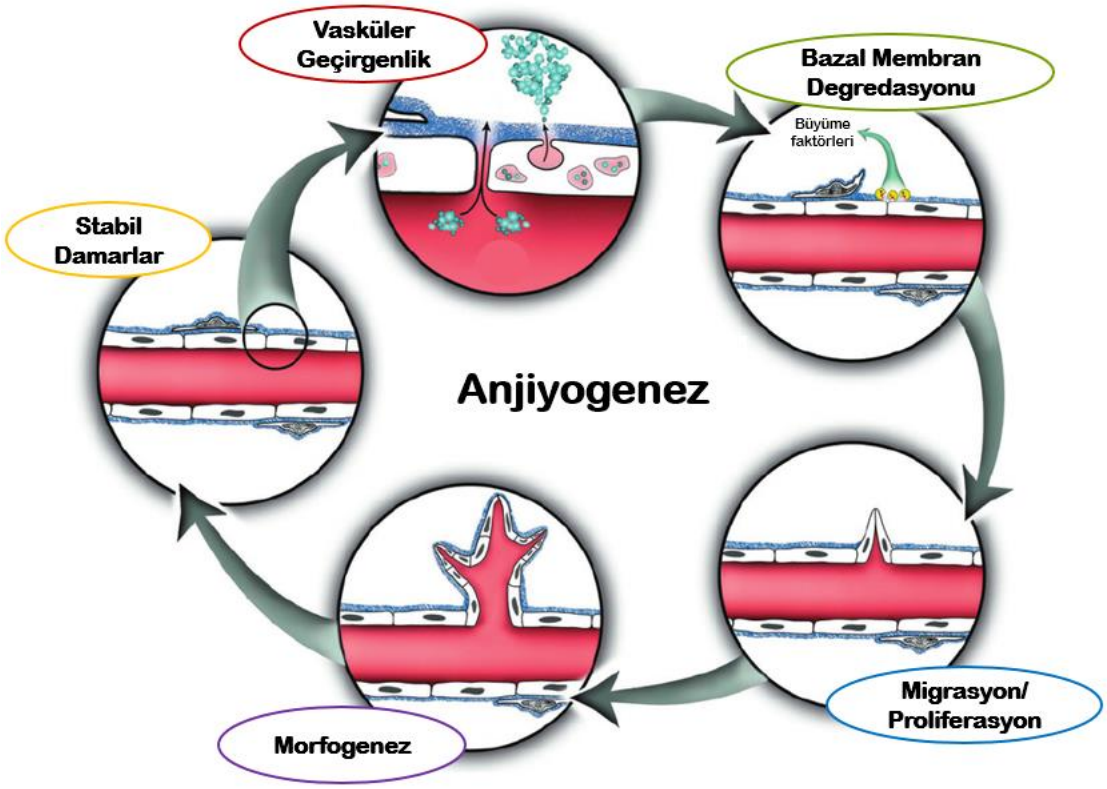
Anjiyogenez, insan üremesi, organ gelişimi, yara iyileşmesi ve doku onarımında merkezi bir rol oynayan, yeni kan damarı oluşumunu sağlayan süreçtir (Fallah vd., 2019). Anjiyogenez aynı zamanda çeşitli insan hastalıklarının ilerlemesinde önemli bir olgudur (Folkman, 2007; Potente & Mäkinen, 2017; Ribatti, 2007). Normal fizyolojik durumda anjiyogenez, anjiyogenezin ana bölgesi olan damarların iç yüzeyinde bulunan yerleşik endotel hücrelerini (EC) tetikleyen, çeşitli anjiyogenez büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin oluşturduğu ağ tarafından düzenlenmektedir (Ferrara & Kerbel, 2005; Luttun, Tjwa & Carmeliet, 2002; Rouwkema & Khademhosseini, 2016).

Anjiyogenik büyüme faktörleri ve sitokinler, endotel hücreleri, fibroblastlar, düz kas hücreleri, trombositler, enflamatuar hücreleri ve kanser hücreleri dahil olmak üzere farklı hücre tipleri tarafından üretilir (Fallah vd., 2019; Ucuzian, Gassman, East & Greisler, 2010). Anjiyogenik büyüme faktörleri ve sitokinler; VEGF, fibroblast büyüme faktörü (FGF), plasental büyüme faktörü (PGF), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF-β), anjiyopoietinler (Ang'ler), epidermal büyüme faktörü (EGF), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF)/granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), hepatosit büyüme faktörü (HGF) / saçılma faktörü (SF), interlökin 8 (IL-8) ve EPO'lardan oluşmaktadır (De Vries vd., 1992; Luttun vd., 2002; Ribatti, 2014; Shahneh, Baradaran, Zamani & Aghebati-Maleki, 2013). Anjiyogenezde yer alan üç sinyal yolağı, FGF sinyal yolağı, VEGF sinyal yolağı ve Anjiyopoietin-1 (Ang-1)/Anjiyopoietin-2 (Ang-2) sinyal yolağıdır (Şekil 2.8) (Mthembu, Mbita, Hull & Dlamini, 2017).



Şekil 2.8. Anjiyogenez gen sinyal yolaklarının şematik özeti (Mthembu vd., 2017).

Anjiyogenez, çeşitli mekanizmalar yoluyla uyarıcı anjiyogenik faktörler tarafından tetiklenir (Ucuzian vd., 2010). Anjiyogenezde, endotelyal hücreler için geçici bir iskele oluşturan plazma proteinlerinin ekstravazasyonuyla ve vasküler geçirgenliğin artmasıyla migrasyon başlar. EC geçirgenliğindeki artışların ardından, ekstraselüler matriksin matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) tarafından bozulması, perisit-EC bağlantısını azaltarak, ekstraselüler matrikste sekestre edilmiş büyüme faktörlerini serbest bırakır. EC'ler daha sonra çoğalır ve perivasküler hedeflerine göç ederler, burada dallanarak lümen oluşturmak üzere bir araya gelerek karmaşık bir morfogenez geçirirler (Şekil 2.9) (Bryan & d'Amore, 2007).



Şekil 2.9. Anjiyogenez aşamaları (Bryan & d'Amore, 2007).

Perisitler, EC'ler etrafında uzamış dallı hücreler olup, bazal membrana EC'ler üzerinden temas ederler ve anjiyogenik büyüme faktörlerinin salınmasını sağlayarak damar olgunlaşmasına katkıda bulunurlar (Rouwkema & Khademhosseini, 2016). En küçük kılcal damarlar dışında anjiyogeneze, düz kas hücrelerinin veya perisitlerin damarlara alınması ve daha sonra hücre dışı bir matriks üretilmesi eşlik eder (De Palma, Biziato & Petrova, 2017).

Vaskülogenez ve anjiyogenez, kan damarı oluşumu için iki ana prosedürdür. Gelişimsel bir süreç olan vaskülogenezde, multipotent mezodermal hücreler anjiyoblastlara ayrılarak EC'leri oluşturur (Rouwkema & Khademhosseini, 2016). Diğer yandan, yeni damarlar için anjiyogenez, önceden var olan kan damarlarına dayanır. Anjiyogenez, endotel filizlenmesinin ve filizlenmeyen mikrovasküler gelişimin moleküler yolakları ile sıkı bir şekilde düzenlenir (Hillen & Griffioen, 2007).

Endotel filizlenmesi, anjiyogenezin temel ardışık çok aşamalı bir mekanizmasıdır. Endotel filizlenmesinde damar büyümesi, çeşitli anjiyogenik sinyal yolaklarının aktivasyonu ile başlatılır ve kan damarlarında mevcut olan stalk (sap) hücreleri, EC'lerin

morfolojik olarak yeniden düzenlenmesini sağlar (Hillen & Griffioen, 2007; Ribatti & Crivellato, 2012). Aktive edilen EC'ler, hücreleri anjiyogenez projenitörüne yönlendirmek için plazminojen aktivatörü ve MMP gibi gizli proteazları salgılamaya başlar (Domenico Ribatti & Crivellato, 2012). Filizlerin uzatılması, integrin adı verilen adezyon moleküllerinin kontrolü altındadır. EC'ler çevredeki matrikse doğru çoğalıp, mikrovasküler ortam oluşturdukça, yeni filizler komşu damarlara bağlantı sağlar (Norton & Popel, 2016). Büyüme faktörlerinin salgılanması filizlerin anjiyogenezini hızlandırır. Filiz anjiyogenezinde rol oynayan PDGF, TGF-β ve Ang-1 gibi başka önemli faktörler de vardır (Norton & Popel, 2016).

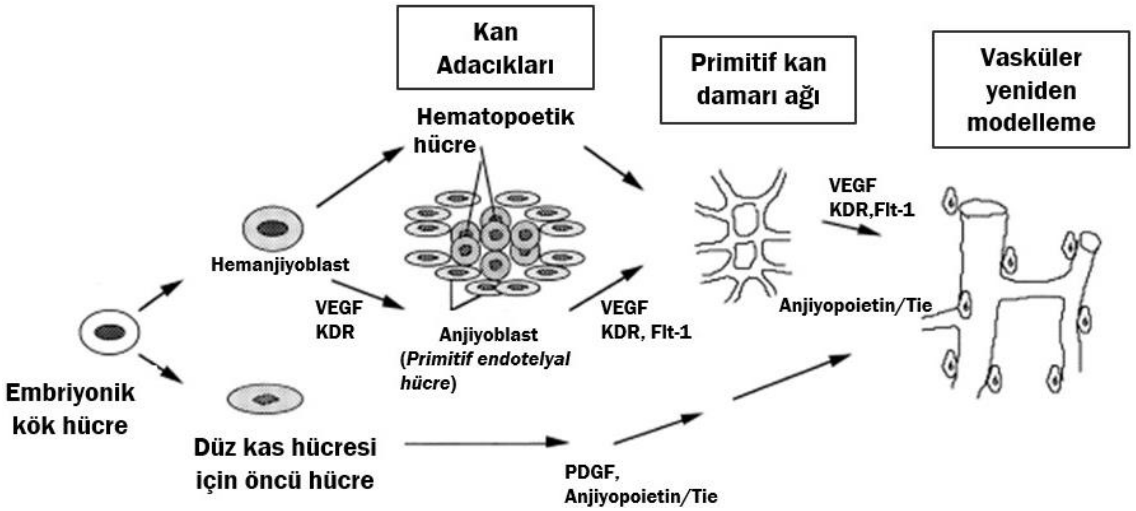
İntussusseptif anjiyogenez, ayrılma ile oluşan (splitting) anjiyogenez olarak da bilinen mevcut bir kan damarının ikiye bölünmesiyle yeni bir kan damarının oluşturulduğu bir tür anjiyogenezdir (De Spiegelaere vd., 2012). İntussusseptif anjiyogenez ile endotelyal hücre birleşimi, büyüme faktörlerinin ve hücrelerin lümene etki ederek, çift (bilayer) tabakalı olarak yeniden düzenlendiği iki karşıt kılcal duvar arasındaki temas bölgesinde meydana gelir (Mentzer & Konerding, 2014). Buradaki sızıntılı temas bölgesi daha sonra damar lümeninin geliştirilmesi için kolajen lifleri oluşturmak üzere perisitler ve miyofibroblastlarla doldurulur. Mevcut hücreler yeniden düzenlenir ve EC sayısından bağımsız olarak kılcal damar sayısı artar. Anjiyogenezin üreme, gelişme ve doku onarımındaki kritik rolüne ek olarak, birçok insan hastalığının gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir süreç olarak kabul edilmektedir (Fallah vd., 2019).

2.3.1. Anjiyogenez Yolağı ve Mekanizması

2.3.1.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

Omurgalılar, vücuttaki dokulara besin ve oksijen sağlamak için kapalı bir sirkülasyon sistemine sahiptir. Bu dolaşım sistemindeki büyük ve küçük kan damarları iki ana hücre tipinden oluşur, biri damarların iç kısmını tek tabakalı olarak kaplayan vasküler endotelyal hücreler, diğeri kan damarlarının kasılmasını ve dilatasyonunu düzenleyen düz kas hücreleridir. Bu kan damarları embriyogenez aşamasında, vaskülogenez (öncü hücrelerden vasküler endotelyal hücre ve kan damarı oluşumu), anjiyogenez (oluşan vasküler endotelyal hücrelerden kan damarı oluşumu) ve vasküler

yeniden şekillenme olmak üzere birkaç adımda oluşur (Şekil 2.10) (Risau, 1997; Shibuya, 2001).



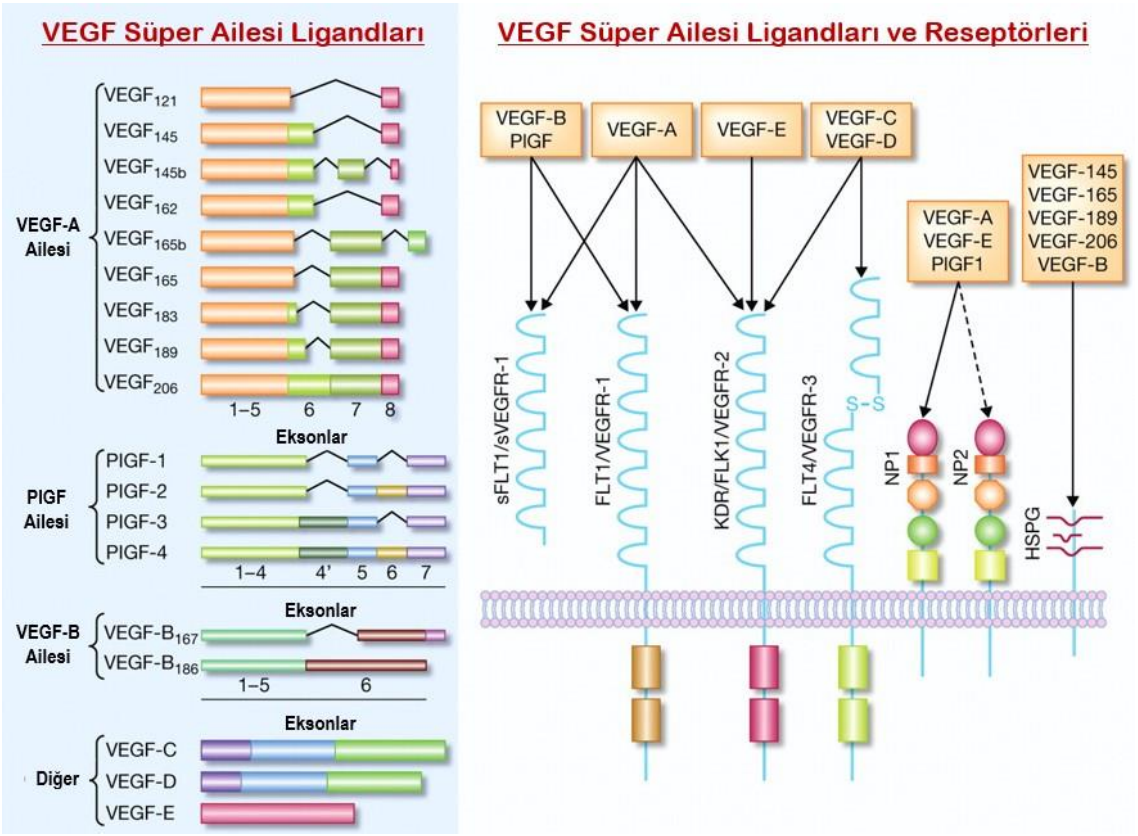
Şekil 2.10. Embriyogenezde kan damarı oluşumu için çoklu aşamalar (Shibuya, 2001).

Vasküler endotelyal hücreler anjiyogenezin temel bileşeni olarak kabul edilmektedir. VEGF, ilk olarak vasküler geçirgenlik faktörü ve 1980'lerde vasküler endotelyal hücreye özgü büyüme faktörü olarak tanımlanmıştır (Leung, Cachianes, Kuang, Goeddel & Ferrara, 1989; Senger vd., 1983).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü, vasküler endotelyal hücreler için oldukça spesifik bir mitojendir. Memelilerde, tek bir VEGF geninden VEGF-A, -B, -C, -D ve plasental büyüme faktörü (PlGF) olmak üzere beş VEGF izoformu üretilir (Smani vd., 2018). Bu izoformlar, moleküler kütleleri ve hücre yüzeyindeki heparan-sülfat proteoglikanlara bağlanma yetenekleri gibi biyolojik özelliklerinde farklılık gösterir. Aynı kökenli reseptörleri VEGFR-1, -2, -3 ve nöropilin ko-reseptörleri aracılığıyla vasküler ve lenfatik EC'ler üzerindeki işlevlerine aracılık eder (Neufeld, Cohen, Gengrinovitch & Poltorak, 1999; Smani vd., 2018). VEGF'nin ekspresyonu, hipoksiye yanıt olarak, aktif onkogenler ve çeşitli sitokinler tarafından arttırılır. VEGF, endotelyal hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu indükleyerek apoptozu inhibe eder. *In vivo* VEGF, anjiyogenezin yanı sıra kan damarlarının geçirgenliğinin artmasını sağlar ve vaskülogenezin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar (Neufeld vd., 1999).

İnsanlarda VEGF, alternatif splicing işlemine dayanan 121, 165 ve 189 amino asit proteinleri olan en az 3 ana alt tipe sahiptir (Shibuya, 2001). Bunlar arasında VEGF121 ve VEGF165, iki temsili formdur ve VEGF165, VEGF121 ile karşılaştırıldığında ilave

44-amino asitlik esnekliğe sahiptir (Ferrara & Davis-Smyth, 1997). Bu özellik sayesinde VEGF165, matriks ve hücre yüzeyinde heparin veya heparin benzeri moleküller ve hücre yüzeyi molekülü nöropilin-1 ile birleşebilir. VEGF165'in nöropilin-1 ile olan ilişkisinin VEGF165'in VEGF reseptörlerinden biri olan KDR (VEGFR-2) ile olan afinitesini yaklaşık 10 kat arttırdığı bildirilmiştir. Bu durum VEGF165'in VEGF alt tipleri arasında en güçlü sinyal ileticisi olmasını sağlamaktadır (Ferrara & Davis-Smyth, 1997; Shibuya, 2001). VEGF ligandları ve reseptörleri Şekil 2.11'de gösterilmektedir.



Şekil 2.11. VEGF süper ailesi ligandları ve reseptörleri (Rahimi, 2012).

VEGF-A'nın koroidal neovaskülarizasyonun gelişmesinde çok büyük etkisi vardır. Islak yaşa bağlı makula dejenerasyonunda hem neovaskülarizasyondan hem de vasküler sızıntıdan sorumludur. Islak yaşa bağlı makula dejenerasyonunun ayırt edici özellikleri arasında RPE ile Bruch membranı arasında kalıntıların bölgesel birikimiyle drusen oluşumu, koroidal neovaskülarizasyon, RPE hücre dekolmanı, fibrovasküler skar ve vitröz kanamasıdır. Kan damarlarının aşırı büyümesi ve bu damarların sızıntısı daha sonra merkezi görme kaybına neden olur. RPE hücreleri, perisitler, endotel hücreleri, glial hücreler, Müller hücreleri ve ganglion hücreleri dahil olmak üzere gözdeki birçok hücre

tipi VEGF'yi sentezler ve salgılar. VEGF'nin yaşa bağlı makula dejenerasyonu patolojisindeki hayati önemine ek olarak, yüksek VEGF seviyeleri, diyabetik retinopati ve prematüre retinopatisinde retinal iskemi ile ilişkili neovaskülarizasyon ile de güçlü bir şekilde ilişkilidir (Rahimi, 2012).

2.3.1.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörleri

Vaskülogenez veya anjiyogenez yoluyla damar oluşumu süreci, ağırlıklı olarak endotelyal hücrelerde eksprese edilen VEGF ve reseptörlerinin yanı sıra Anjiyopoietin-Tie reseptörleri, Efrin reseptörleri ve PDGF reseptörleri gibi çok sayıda reseptör tarafından düzenlenir. VEGF reseptörler (VEGFR'ler), endotelyal spesifik reseptörlerin en bilinen ve en çok çalışılan ailesidir (Hofer & Schweighofer, 2007; Ntellas vd., 2020).

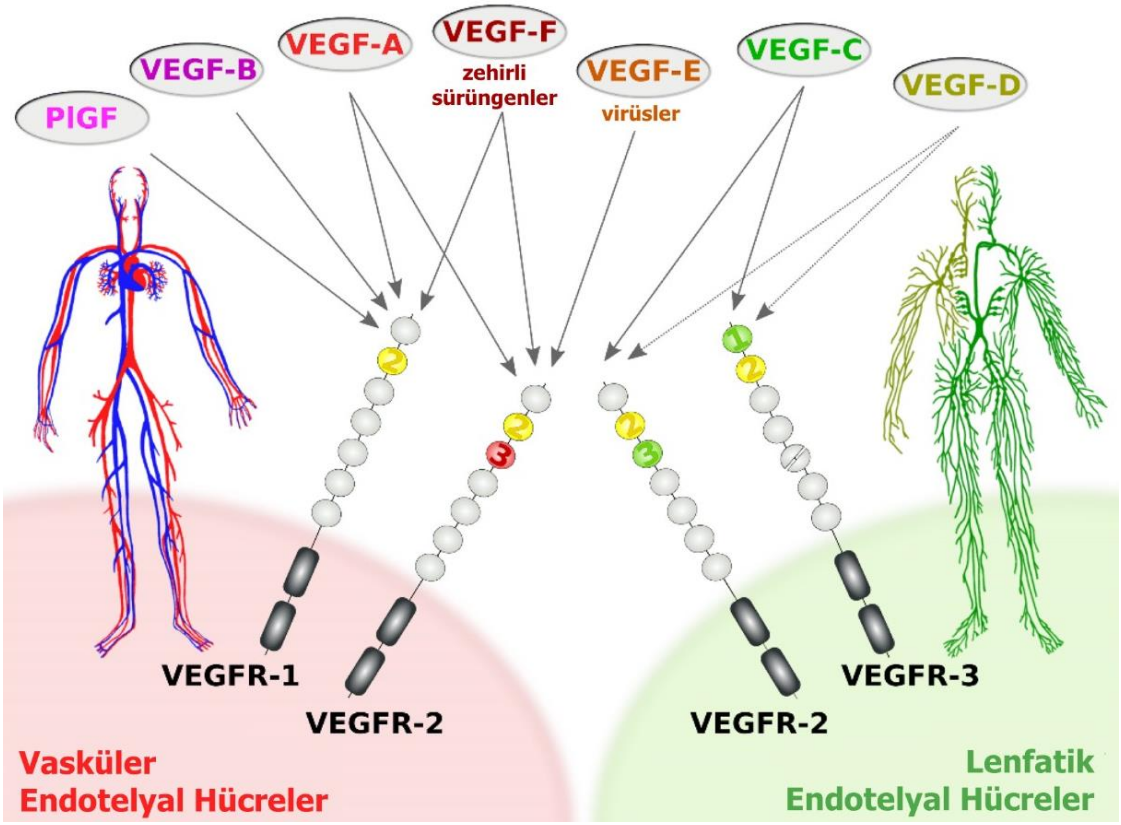
Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörleri endotel farklılaşmasında, anjiyogenez veya vaskülogenezde görevlidir. Efrin reseptörleri esas olarak arteriyel-venöz farklılaşmada yer alırken, Tie reseptörleri endotelyal filizin stabilizasyonu gibi damar oluşumunun sonraki aşamalarında görevlidir (Ntellas vd., 2020).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü, reseptörün dimerizasyonunu (homodimerizasyonunu veya heterodimerizasyonunu) indüklemek için uygun VEGFR'ye bağlanıp reseptörün hücre içinde yer alan tirozin kinaz bölümünü otofosforilasyonla aktive eder. Fosfotirozinler ve aminoasitler, çeşitli hücre içi sinyal yollarını aktifleştiren adaptör moleküller için bağlanma yerleri oluşturur. Bu sinyal yolları, vasküler geçirgenlik gibi ani tepkilere ve endotelyal hücrenin sağkalımı, migrasyonu ve proliferasyonu gibi gen düzenlemesi gerektiren uzun vadeli tepkilere aracılık eder (Simons, Gordon & Claesson-Welsh, 2016).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörlerinin sinyali, reseptör ekspresyon seviyeleri, bağlanan farklı ligandlara uyum ve afinite, VEGF bağlayıcı koreseptörlerin varlığı, VEGF bağlayıcı olmayan yardımcı proteinler ve inaktive edici tirozin fosfatazlar, hücresel reseptör alım oranı, bozulma derecesi ve geri dönüşüm hızı dahil olmak üzere çok sayıda farklı seviyede sıkı bir şekilde düzenlenir. VEGFR'ler sitoplazmaya girdikten sonra ya bozunma için lizozomlara gönderilir ya da hızlı veya yavaş geri dönüşüm yollarıyla zara geri dönüştürülür. VEGFR sinyal çıkışı, VEGFR'ler arasında ve bunların VEGFR'ye bağımlı ve VEGF'den bağımsız hücre içi sinyal yolları arasındaki etkileşim

ile doğrudan veya dolaylı olarak düzenlenir. Buna bağlı olarak karmaşık pozitif ve negatif geri besleme döngüleri oluşmaktadır. Bu düzenleyici mekanizmalar, belirli sinyal yollarının aktivasyonunu, sinyalin gücünü ve süresini kontrol eder (Simons vd., 2016).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörleri ailesi VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 reseptörlerinden oluşur, bunlar yapısal olarak benzer olmalarına rağmen aktivasyon basamakları, sinyal yolları ve biyolojik etkileri açısından farklılıklar gösterirler (Simons vd., 2016). Bu reseptörlerin çeşitli dokularda farklı ekspresyonu, ligandlarının nispeten spesifik işlevinden sorumlu olup VEGFR-1 ve VEGFR-2 esas olarak vasküler EC'lerde, VEGFR-3 büyük ölçüde lenfatik endotel ile sınırlıdır. Bu nedenle VEGFR-1 ve -2'ye olan afinitelerine göre VEGF-A, -B ve PlGF anjiyogenik aktiviteler uygularken VEGF-C ve -D ağırlıklı olarak VEGFR-3'ü aktive ederek lenfanjiyogenik büyüme faktörleri olarak hareket eder (Smani vd., 2018).



Şekil 2.12. VEGF'ler, VEGF reseptörleri 1, -2 ve -3'e olan afinitelerine bağlı olarak kan damarları ve/veya lenf damarları ile etkileşimi (Künnapuu, Bokharaie & Jeltsch, 2021).

Tüm reseptör-büyüme faktörü etkileşimleri, VEGF reseptörlerinin Şekil 2.12'de sarı ile gösterilen hücre dışı alanı 2'yi gerektirir. VEGFR-2'nin 3. alanı, VEGFR-2'nin hem VEGF-A hem de VEGF-C ile etkileşimi için önemlidir ve VEGFR-3'ün 1. alanı,

VEGF-C'nin VEGFR-3 ile etkileşimi için önemlidir. VEGFR-2, hem kan hem de lenfatik endotelde eksprese edilir. VEGFR-2'yi aktive eden büyüme faktörleri hem kan damarlarının (anjiyogenez) hem de lenfatik damarların (lenfanjiyogenez) büyümesini destekleyebilir. VEGF-E ve VEGF-F insan kaynaklı değildir. VEGF-E genleri viral genomlarda bulunur ve VEGF-F bir yılan zehri bileşenidir (Şekil 2.12) (Künnapuu vd., 2021; Leppänen vd., 2010; Leppänen vd., 2013).

2.3.1.3. Matriks Metalloproteinaz

Ekstraselüler matriksin gelişimsel ve homeostatik olarak yeniden modellenmesi, MMP olarak bilinen çinko içeren, kalsiyum bağımlı nötral proteaz ailesi tarafından düzenlenen bir süreçtir (Çizelge 2.2) (Vincenti, 2001). Yirmi üye içeren bu enzim ailesi, interstisyel kollajenler (I, II, III ve V), bazal membran kollajenleri (IV), fibronektin, laminin, proteoglikan ve elastin (IV) dahil olmak üzere ekstraselüler matriksin tüm yapısal proteinlerini topluca bozabilir (Vincenti, 2001).

Çizelge 2.1. Matriks metalloproteinazlar ve biyolojik etkileri (Vincenti, 2001).

GRUP	İSİM	ÜRÜN	SUBSTRAT	TEMEL FONKSİYON
Kollajenaz	MMP-1/İnterstisyel-fibroblast kollajenaz	Fibroblastlar, endotelyal hücreler, monositler	Kollajen (I, II, III, V, X), jelatin, MMP-2, -9	Doku yenilenmesi, metastaz
	MMP-8/Nötrofil kollajenaz	Nötrofiller, makrofajlar	Kollajen	Yara iyileşmesi, lökosit migrasyonu
	MMP-13/İnterstisyel kollajenaz	Fibroblastlar	Kollajen (I, II, III, X), laminin, proteoglikanlar	Kemik yenilenmesi/remodelling
Stromelisin	MMP-3/Stromelisin-1	Fibroblastlar, epitelyal hücreler	Kollajen (III, IV, IX), proteoglikanlar, fibronektin, elastin	Plak büyümesini sınırlar, neoplazm başlangıcı
	MMP-10/Stromelisin-2	Epitelyal hücreler, fibroblastlar	Kollajen (III, V, X), laminin, kazein, fibronektin	Aterosklerotik vasküler yenilenme, inflamatuar bağırsak hastalığı
Metalloelastaz	MMP-12	Makrofajlar, osteoklastlar	Kollajen IV, elastin, fibronektin, proteoglikanlar, plazminojen	Makrofaj migrasyonu, amfizem
Transmembran	MMP-14/MT1-MMP	Birçok hücre tipi	Kollajen (I, II, III), fibronektin, laminin, vitronektin	Anjiyogenez, malign transformasyon, hücre migrasyonu
Jelatinaz	MMP-2/Jelatinaz A	Fibroblastlar, miyositler, endotelyum	Kollajen (I, II, III, IV, V, X), elastin, fibronektin, jelatin	Hücre migrasyonu, vaskülarizasyon, kanser invazyonu ve metastaz, kemik gelişimi
	MMP-9/Jelatinaz B	Monositler, nötrofiller	Kollajen (IV, V, X), elastin, jelatin, IL-8, fibronektin, plazminojen	Anjiyogenez, hücre migrasyonu, kemik gelişimi, pro-enflamatuar
Minimal Domain	MMP-7/Matrilisin 1	Ciltteki glandüler epitel hücreleri, endometriyum, meme bezi, prostat	Kollajen (I, IV), plazminojen, insülinin β zinciri	Vazokonstrüksiyon ve hücre büyümesi, doğal bağışıklık, yara iyileşmesi, tümör büyümesi

Ekstraselüler matriks proteinleri (kollajenler ve elastin) ve diğer bileşenler (proteoglikanlar ve yapısal glikoproteinler) MMP'ler için karakterize edilmiş substratlardan bazılarıdır. MMP'ler, gelişme, büyüme veya yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerde görev alan yapısal olarak ilişkili enzim ailesidir (Novotná & Herget, 2002).

MMP aktivitesi, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre ölümüyle ilgili ekstraselüler matriks molekülleri tarafından üretilen sinyalleri kontrol eder (Matrisian & Hogan, 1990). Patolojik koşullar altında, MMP aktivitesindeki artış kanser yayılımı, akut/kronik inflamasyonlarla ilişkilidir (Fang vd., 2000; Novotná & Herget, 2002).

Matriks metalloproteinazlar mezenkimal kökenli bağ dokusu hücrelerinden salgılanır. Bunlar; fibroblastlar, miyoblastlar, kondrositler, osteoblastlar, sinovyal hücreler, keratinositler, hepatositler, endotel hücreleri ve enflamatuar kökenli (makrofajlar, monositler, nötrofiller ve mast hücreleri dahil) hücrelerdir (Emonard & Grimaud, 1990; Johnson, Jackson, Angelini & George, 1998; Tozzi vd., 1998; Turto, Lindy, Uitto, Wegelius & Uitto, 1977). Hücreler tüm MMP'leri proenzim olarak salgılar ve bu proenzimlerin aktivasyonu ekstraselüler matriks yıkımını başlatır. Genellikle nötr pH'da aktif olan MMP enzimlerinin, tam aktivitesi için kalsiyum (Ca^{2+}) iyonları gereklidir (Novotná & Herget, 2002).

Matriks metalloproteinazların ifadesi temelde hücre iskeleti tarafından düzenlenir. Hücre iskeletinin organizasyonu, fibronektin, tenaskin ve laminin gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinin etkilerine bağlı olarak, büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından düzenlenir. (Murphy vd., 1999; Novotná & Herget, 2002). MMP'lerin çoğu fizyolojik koşullar altında yüksek konsantrasyonlarda mevcut olmayıp patolojik koşullar altında ortaya çıkarlar. MMP'lerin yüksek ekspresyonu, kanser malignitesi ve tümör metastazı ile ilişkilidir (Novotná & Herget, 2002).

Matriks metalloproteinazlar anjiyogenezde de rol oynar. MMP'lerin yeni kan damarlarının mikrovasküler endotelyal hücreleri tarafından salgılanması, anjiyogenezin önemli bir adımıdır. MMP sekresyonu, bazal membranın degredasyonunu sağlayan ve endotelyal hücrelerin bağ dokusu boyunca göç etmesini sağlayan önemli bir başlangıç aşamasıdır (Novotná & Herget, 2002).

MMP-3

MMP-10 ve MMP-11 ile beraber stromelisinlerin alt grubuna dahil olan stromelisin-1 ya da MMP-3 (EC 3.4.24.17) menteşe bölgesinden katalitik bölgeye bağlanan bir hemopeksin alanı ile oldukça basit bir MMP yapısına sahiptir (Van Hove, Lemmens, Van de Velde, Verslegers & Moons, 2012). Stromelisin adı, ekstraselüler

matriks hidrolize eden stromal hücreden türetilmiş bir metalloproteinazı belirtir (Chin, Murphy & Werb, 1985). Sitokinler, reaktif oksijen türleri, büyüme faktörleri ve hücre-hücre/hücre-ekstraselüler matriks etkileşimleri MMP-3 gen transkripsiyonunu tetikleyebilirken, MMP-3 mRNA transkriptleri, forbol esterleri ve EGF ile stabilize edilebilirler (Delany & Brinckerhoff, 1992; Kim & Hwang, 2011). Ekstraselüler matrikse bırakıldıktan sonra, inaktif MMP-3 proenzimi plazmin kaskad sinyal yolağı ile ekstraselüler olarak aktive edilebilir (Nagase, Enghild, Suzuki & Salvesen, 1990).

İnsan MMP-3 geni, stromelisin 2 (MMP-10), interstisyel kollajenaz (MMP-1), kollajenaz 2 (MMP-8), kollajenaz 3 (MMP-13), matrilisin 1 (MMP-7), matrilisin 2 (MMP-26), makrofaj elastaz (MMP-12) ve enamelisin (MMP-20) dahil olmak üzere diğer matriks genlerinin de bulunduğu 11. kromozomun q22-q23 bölgesinde bulunur (Formstone vd., 1993).

Ekstraselüler olarak, MMP-3 oldukça geniş substrat özgüllüğüne sahiptir. Çoklu ekstraselüler matriks proteinlerini parçalamanın yanı sıra, büyüme faktörlerini, hücre adezyon moleküllerini, kemokinleri, sitokinleri ve çeşitli reseptörleri de aktive edebilir (Van Hove vd., 2012). Ek olarak MMP-3, proMMP-1, -3, -7, -8, -9 ve -13'ü aktive edebilir. Plazminojen ve ürokinaz-tipi plazminojen aktivatör gibi bazı akış yukarı aktivatörleri hidrolize edebilir (Arza, Hoylaerts, Félez, Collen & Lijnen, 2000; McCawley & Matrisian, 2001; Ogata, Enghild & Nagase, 1992).

MMP-3 bir dizi ekstraselüler matriks, non-ekstraselüler matriks ve hücre yüzeyi proteinlerini ayırır. Enzim prokollajenazları (MMP-1, MMP-8 ve MMP-13) ve projelatinaz B'yi (MMP-9) aktive eder. MMP-3 tarafından, projelatinaz B'nin dimerik formu monomerik formdan daha yavaş aktive edilir (Olson vd., 2000). Optimum pH'ı 5.5-6.0 civarında olan MMP-3, mezenkimal hücrelerde kolayca eksprese edilir (Nagase, 1995, 2013).

Stromelisin-1 (MMP-3) fibronektin, jelatin, proteoglikanlar, denatüre tip I kollajen, laminin ve diğer hücre dışı matriks bileşenlerini bozar (Chin vd., 1985). Kondrositler ve fibroblastlar gibi mezenkimal hücrelerin genellikle stromelisin-1 salgıladığı bulunmuştur (Matrisian, 1992). Stromelisinin önemi, MMP-1, -8, -9 ve -13 dahil olmak üzere prokollajenazların doğrudan aktivasyonundaki etkisinden kaynaklanmaktadır (Knäuper vd., 1993; Murphy, Cockett, Stephens, Smith & Docherty,

1987). Ayrıca, kollajenazlarla birlikte hastalık durumları sırasında bağ dokularının yok edilmesinde rol oynar (Brinckerhoff, 1992; Posthumus, Limburg, Westra, van Leeuwen & van Rijswijk, 2000).

MMP-9

MMP-9 cDNA ilk olarak 1989 yılında dönüştürülmüş insan fibroblastlarından klonlanmıştır (Wilhelm vd., 1989). Daha sonra, nötrofillerin tip IV kollajenazının aynı genin ürünü olduğu keşfedilmiştir (Devarajan, Johnston, Ginsberg, Van Wart & Berliner, 1992). MMP-9 birçok memeli türünde klonlanmıştır ve inek, tavşan, sıçan, fare ve insan mRNA seviyelerinde yaklaşık %80 homoloji vardır (Atkinson & Senior, 2003; Schwingshackl, Duszyk, Brown & Moqbel, 1999; Yao vd., 1997).

MMP-9 (jelatinaz B, 92 kDa, tip IV kollajenaz) ve MMP-2 (jelatinaz A, 72 kDa, tip IV kollajenaz) jelatinaz olarak adlandırılan gruba ait iki üyedir (Soydinç vd., 2006). Her iki jelatinaz, jelatini kolayca ayırmasına rağmen, substrat spesifiteleri farklıdır (Xia, Akers, Eisen & Seltzer, 1996). MMP-9, substrat spesifitesini ve bozulmaya karşı direnci etkileyebilen, tip V kollajen benzeri bir alan içerir. Jelatinazlar ayrıca hücresel üretim, transkripsiyonel düzenleme ve hücre dışı aktivasyon açısından farklılık gösterir (Atkinson & Senior, 2003).

MMP-9 hücrelerden bir proenzim olarak salınır. Aktivasyonu, organik değişkenlerin eklenmesiyle *in vitro* olarak gerçekleştirilebilir (Atkinson & Senior, 2003). *In vivo* olarak, MMP-9 bir proteaz kaskadıyla aktive edilir (Cuzner & Opdenakker, 1999). MMP-3, MMP-9'un en etkili aktivatörü kabul edilebilir (Goldberg, Strongin, Collier, Genrich & Marmer, 1992).

MMP-9, mikrovasküler endotelyal hücrelerin sitozolünde serbest aktif bir enzim olarak gösterilmiştir. Endotel hücreleri göç ettikçe, MMP-9'un aktif formu, bazal membranı lokal olarak bozmak için hücrelerden salgılanır (Nguyen, Arkell & Jackson, 1998). Ayrıca MMP-7 (matrilisin), MMP-9 ve MMP-12 (metalloelastaz), plazminojeni en güçlü anjiyogenez antagonisti olan anjiyostatine dönüştürerek anjiyogenezi bloke edebilir (Novotná & Herget, 2002; Sang, 1998).

2.3.2. Anjiyogeneze Bağlı Hastalıklar

Anjiyogenez, neredeyse tüm insan malignitelerinin ve yaşamı tehdit eden diğer bazı hastalıkların ilerlemesinde kritik bir adımdır. Anti-anjiyogenik tedavi, kanser, diyabetik retinopati ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi anjiyogeneze bağlı hastalıkların tedavisinde yeni ve etkili bir yaklaşımdır (Fallah vd., 2019).

Patolojik anjiyogenez, anjiyogeneze bağlı hastalıklar olarak adlandırılan bir dizi neovaskülatür hastalıkta rapor edilir (Çizelge 2.1). Bunlardan en çok bilinen ve üzerinde çalışılan anjiyogeneze bağlı hastalıklar; kanser, neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonu ve diyabetik retinopatidir (Fallah vd., 2019).

Çizelge 2.2. Anjiyogeneze bağlı hastalıklar (Fallah vd., 2019).

Hedef organ	Farelerde veya insanlarda hastalıklar
Çoklu organ anormalliği	Kanser, bulaşıcı hastalıklar, otoimmün bozukluklar
Kan damarlarında anormallik	Vasküler malformasyonlar, DiGeorge sendromu, Herediter hemorajik telanjiektazi, kavernöz hemanjiyom, ateroskleroz, transplant arteriyopatisi
Yağ dokusu anormalliği	Obezite, anjiyogenez inhibitörleri ile kilo kaybı
Cilt anormalliği	Sedef hastalığı, siğiller, alerjik dermatit, skar keloidleri, piyojenik granülomlar, AIDS hastalarında kaposi sarkomu
Göz anormalliği	Kalıcı hiperplastik vitröz sendromu, diyabetik retinopati, prematüre retinopatisi, koroidal neovaskülarizasyon
Akciğer anormalliği	Primer pulmoner hipertansiyon, astım, nazal polipler
Bağırsak anormalliği	Enflamatuar bağırsak ve periodontal hastalık, assit, peritoneal adezyonlar
Üreme sistemi anormalliği	Endometriozis, uterin kanama, yumurtalık kistleri, yumurtalık hiperstimülasyonu
Kemik ve eklemlerde anormallik	Artrit, sinovit, osteomiyelit, osteofit oluşumu

2.4. MikroRNA

MikroRNA’lar (miRNA), gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenleyen 22 ila 26 nükleotid uzunlukta olan, protein kodlamayan RNA'lardır. mRNA’nın translasyonunu baskılayarak protein oluşumunu azaltmak amacıyla miRNA ile indüklenen susturucu kompleks (RISC) için adaptörler olarak işlev görürler. Olgun miRNA'lar, hedef mRNA'larını, mRNA'ların 3'-translasyona uğramayan bölgesindeki (3'-UTR) tamamlayıcı nükleotitler arasındaki baz eşleştirme etkileşimleri yoluyla tanırlar (Bartel, 2009).

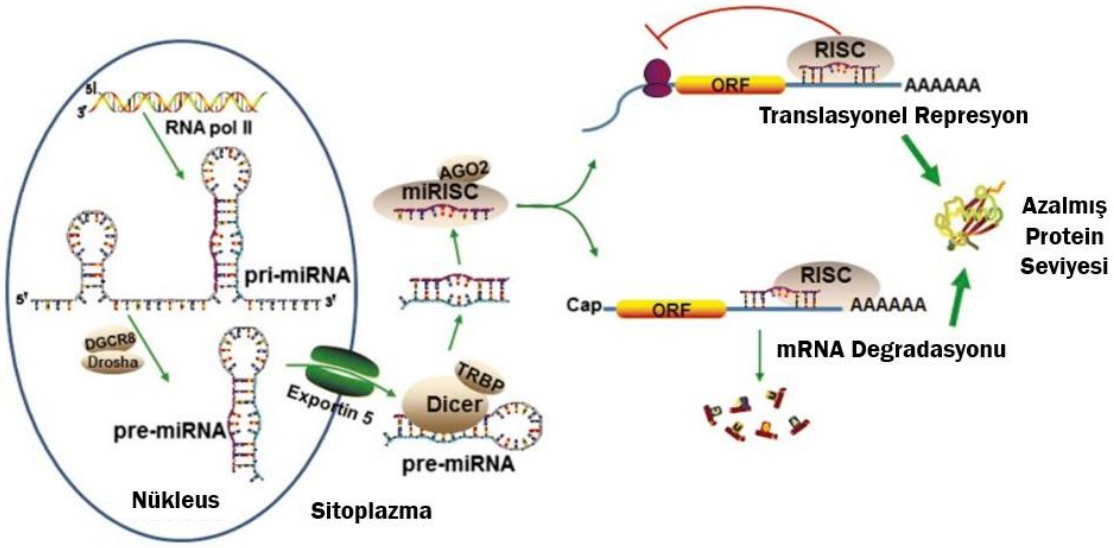
Hücresel farklılaşma, proliferasyon, apoptoz ve hücre döngüsü ilerlemesi dahil hemen hemen her hücresel olayın düzenlenmesine ve gelişim, hastalık gibi birçok biyolojik işlemin düzenlenmesine katıldığından, miRNA profilindeki değişiklikler, çeşitli uyarılara yanıt olarak hücresel bağlamdaki değişiklikleri yansıtabilir (Wilczynska & Bushell, 2015).

2.4.1. miRNA Biyogenezi

Olgun miRNA'lar, kanonik veya alternatif biyogenez yolları aracılığıyla hücreler içinde üretilir. Kanonik yol, hem Drosha ile DiGeorge sendromu kritik bölge 8'e (DGCR8) hem de Dicer ile transaktive edici yanıt oluşturan RNA bağlanma proteini (TRBP) komplekslerine bağlıdır (Yang & Lai, 2011).

Kanonik biyogenez, miRNA kodlama dizilerinin RNA polimeraz II aracılığıyla primer miRNA (pri-miRNA) transkriptlerine transkripsiyonundan başlar. Daha sonra Drosha ve kofaktörü olan DGCR8 ile çekirdek içinde pri-miRNA'ları daha kısa saç tokası (ilmek) şeklinde öncü miRNA'lara (pre-miRNA) böler. Bu pre-miRNA'lar, Exportin-5 tarafından sitoplazmaya taşındıktan sonra, Dicer-TRBP kompleksi tarafından ilmek kısmı kesilerek çift zincirli miRNA’lara ayrılırlar ve zincirlerden biri bozulurken diğeri tek sarmallı olgun miRNA’yı oluştur (Yu, Tian, Tu, Ho & Jilek, 2016).

Oluşan bu olgun miRNA'lar, sitoplazmada miRISC'ler içeren Argonaute 2'ye (AGO2) bağlandıktan sonra, hedef mRNA'larla eşleşirler. Neticede, translasyonel baskılanma veya mRNA bozulması sebebiyle protein ekspresyonu azalır (Şekil 2.13) (Gupta, Sugadev, Sharma, Ahmad & Khurana, 2018; Yu vd., 2016).

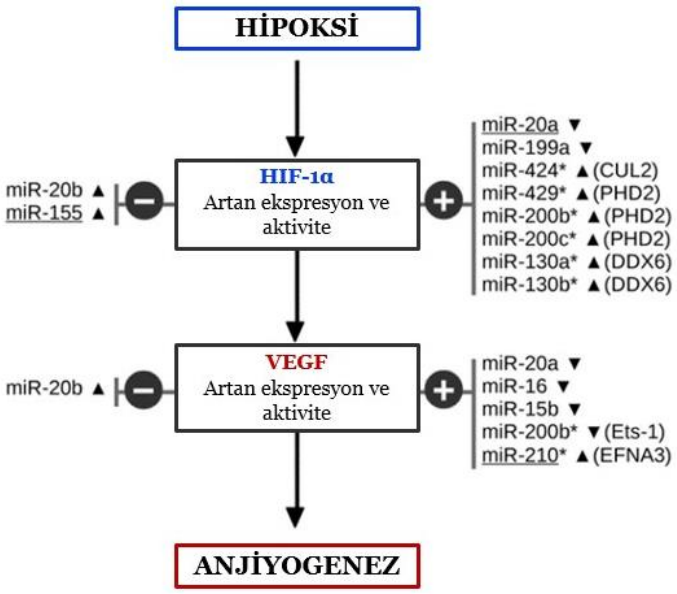


Şekil 2.13. miRNA biyogenezi ve miRNA kontrollü posttranskripsiyonel gen regülasyonunun mekanizmaları (Yu vd., 2016).

İnsan genomunda 1.000'den fazla miRNA geni olduğu ve bunların üretilen mRNA'ların üçte birinden fazlasını düzenleyebileceği tahmin edilmektedir (Berezikov vd., 2005). Birçok miRNA, doku ve yaşa özgü paternlerle ifade edilmektedir. Bu durum miRNA'ların hücre tipine özgü fonksiyonlara sahip olduğunu göstermektedir (Hooten vd., 2010; Madanecki vd., 2013; Ritchie, Rajasekhar, Flamant & Rasko, 2009).

2.4.2. miRNA Aracılı Hipoksi

Hipoksik strese yanıt veren miRNA, hipoksimiR olarak adlandırılmaktadır (Gupta vd., 2018). Hipoksi ve iskemi birçok miRNA'nın ekspresyon profillerini değiştirse de, anjiyogenezde sınırlı sayıdaki hipoksimiR'lerin etkisi gösterilmektedir (Şekil 2.14) (Madanecki vd., 2013).



Şekil 2.14. HipoksimiR'lerin hipoksiyle indüklenen anjiyogenez üzerindeki etkisi (Madanecki vd., 2013). (▲) hipoksi sırasında indüklenmiştir; (▼) hipoksi sırasında inhibe edilmiştir; (+) hipoksi sırasında ekspresyon profili HIF-1α ve/veya VEGF'in ekspresyonunun ve aktivitesinin artmasına katkıda bulunacak şekilde değişmiştir; (-) hipoksi sırasında ekspresyon profili HIF-1α ve/veya VEGF'nin ekspresyonunun ve aktivitesinin üzerinde olumsuz bir etki olacak şekilde değişmiştir; (*) HIF-1α ve/veya VEGF üzerindeki dolaylı etkiler, parantez içindeki gen kısaltmaları doğrudan miRNA hedefini temsil eder. HIF-1α transkripsiyonel kontrolü altındaki hipoksimiR'lerin altı çizilmiştir.

HIF ekspresyonunu etkileyen miR-20b, miR-199a, miR-424, miR-130a, miR-130b, miR-200b, miR-200c, miR-429 ve miR-155 olmak üzere dokuz adet hipoksimiR tanımlanmıştır (Madanecki vd., 2013). Bununla birlikte, HIF mRNA'sı sadece miR-20a, miR-20b ve miR-199a miRNA'ları için doğrudan bir hedeftir (Madanecki vd., 2013). HIF, miRNA düzenlemesinin bir hedefi olmasının yanı sıra, miR-210 gibi anjiyogenik hipoksimiR'lerin transkripsiyonundan da sorumludur (Huang vd., 2009).

Anjiyogenez yolakları kapsamlı bir şekilde incelenmiş olsa da bu süreçte miRNA'ların rolü hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Anti-miR'ler olarak da bilinen antagomirler, diğer moleküllerin bir mRNA molekülü üzerinde istenen bir bölgeye bağlanmasını önleyen, özel olarak tasarlanmış bir kimyasaldır (Yue, 2011). Antagomirler endojen miRNA'ları susturmak amacıyla kullanılmaktadır (Krützfeldt vd., 2005). miRNA'ların veya antagomirlerin, hipoksiye bağlı anjiyogenezi düzenlemek için gelecekteki terapötik yaklaşımlarda kullanılabileceği düşünüldüğünde, hipokside

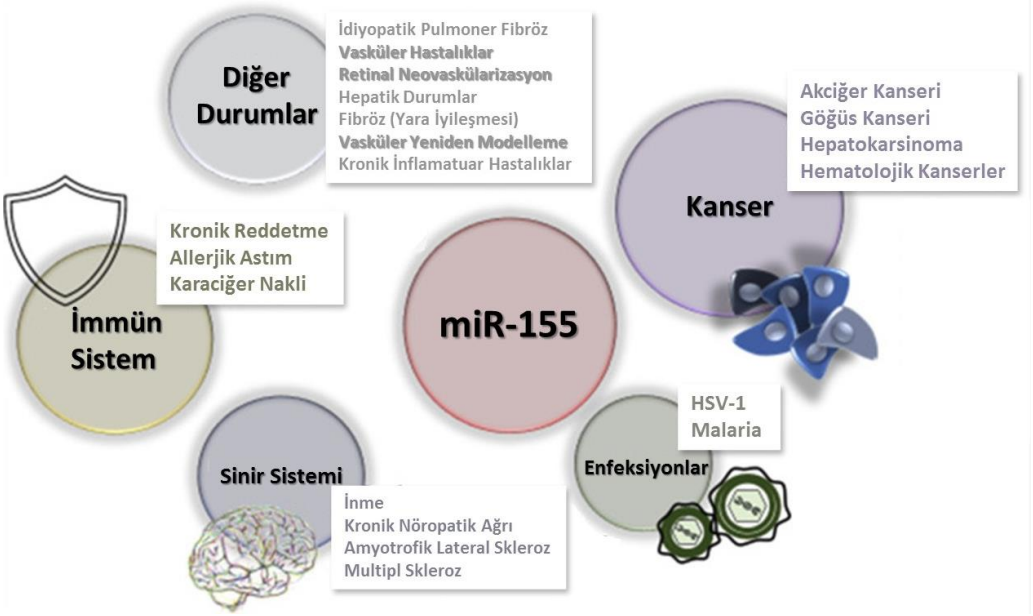
anjiyogenezin düzenlemesi için miRNA'ların rolünün anlaşılması önemlidir (Madanecki vd., 2013).

2.4.2.1. miRNA-155

HIF ile indüklenebilir miR-155, hipoksi yolağının başka bir mikroRNA aracılı transkripsiyonel regülasyon seviyesini temsil eder. Hipoksik bir durumda/uyarılmada, HIF-1α transkriptinin RISC aracılı degredasyonunu kolaylaştırarak HIF tepkisinin dinamiklerini şekillendirir (Bruning vd., 2011). HIF-1α mRNA'sında, HIF-1α protein seviyelerinde ve transkripsiyonel aktivitede bir azalmaya sebep olur. Bu nedenle miR-155 indüksiyonu, uzun süreli hipoksi sırasında HIF-1α aktivitesi için izoform-spesifik bir negatif geri besleme döngüsüne bağlıdır (Bruning vd., 2011; Madanecki vd., 2013) Aynı zamanda PHD'lerin HIF aracılı indüksiyonuna benzemekle beraber, hipoksiye hücresel reaktiviteyi daha düşük pO_2 seviyelerinde sağlayabilir (Fabian, 2018). miR-155'in aşırı ekspresyonunun, proteolitik degradasyon için HIF-α ailesi üyelerini (HIF-1, -2 ve -3) hedefleyen VHL'nin, mRNA'yı negatif olarak düzenleyerek anjiyogenezi desteklediği bildirilmiştir (Yoon vd., 2016).

miR-155, orijinal olarak B-hücresi Entegrasyon Kümesi (BIC, B-cell Integration Cluster) geni olarak tanımlanan konakçı gen MIRHG155 tarafından kodlanır. BIC geni, insan kromozomu 21 içinde 13 kilobazlık bir bölgeyi kapsayan 3 ekzondan oluşur (Mahesh & Biswas, 2019). İnsanda miR-155'in ekspresyonu ilk olarak dalak, timüs, karaciğer, akciğer ve böbrekte rapor edilmiştir (Tam, 2001; Tam, Ben-Yehuda & Hayward, 1997). miR-155'in baskın fonksiyonel özelliklerini miR-155-5p gösteriyor olsa da miR-155-3p'nin etkinliği hücrelere göre değişiklik göstermektedir (Mahesh & Biswas, 2019).

miR-155'in anormal ekspresyonu, bağışıklık, inflamasyon ve hematopoez ile bağlantılı büyük sinyal yollarında hastalık ilerlemesine sebep olmaktadır. Çalışmaların çoğu kanser üzerine yoğunlaşmıştır, bunu yakından immünolojik bozukluklar izlemektedir. Herpes simplex virüs 1 (HSV-1) ve sıtma (malaria) enfeksiyonları, sinir sistemi rahatsızlıkları, vasküler bozukluklar ve karaciğer rahatsızlıkları gibi diğer karmaşık hastalıklar hakkında da araştırmalar vardır (Şekil 2.15) (Gulei, Raduly, Broseghini, Ferracin & Berindan-Neagoe, 2019).



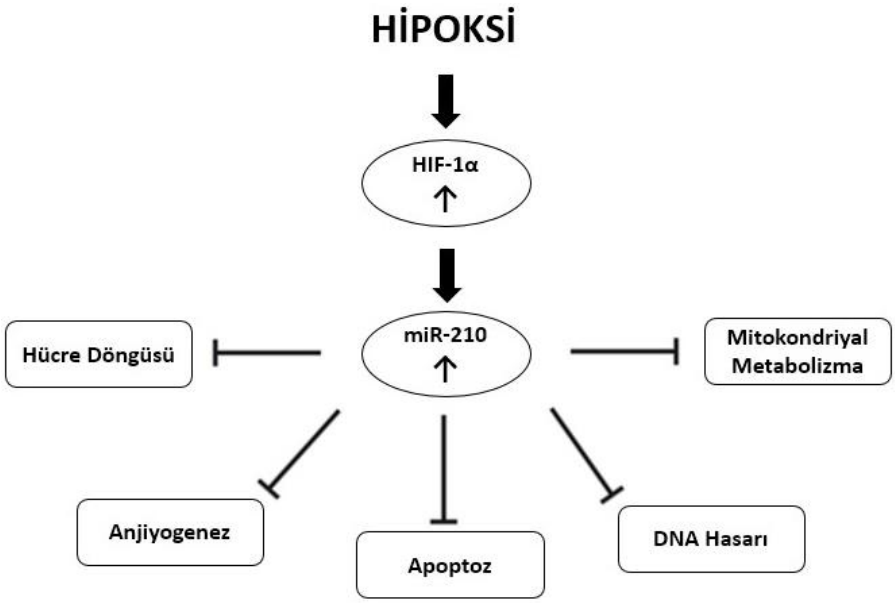
Şekil 2.15. miR-155 ile ilişkili hastalıklar (Gulei vd., 2019).

Stromal keratit, HSV-1 ile oküler enfeksiyonlardan sonra ortaya çıkabilen ve potansiyel olarak körlüğe yol açabilen kronik inflamatuar bir patolojidir. Oküler HSV-1 ile enfekte olmuş fare modellerinde, miR-155 inhibitörlerinin uygulanmasıyla korneal seviyede stromal keratit lezyonlarının ve vaskülarizasyonun azaldığını göstererek miR-155'in buradaki yüksek ekspresyonunu göstermiştir (Bhela vd., 2015).

2.4.2.2. miRNA-210

Hipoksik mikro çevrede tüm dokularda eksprese edildiği bildirilen miR-210, hipokside düzenlenen ana miRNA olarak kabul edilmektedir (Gupta vd., 2018; Huang, Le & Giaccia, 2010). Bu miRNA'nın ekspresyonu hem HIF-1α hem de HIF-2α tarafından düzenlenir (Camps vd., 2008; Z. Zhang vd., 2009). Anjiyogenezin, mitokondriyal metabolizmanın, DNA onarımının ve hücre sağkalımının düzenlenmesinde rol oynadığı açıklanmıştır (Devlin, Greco, Martelli & Ivan, 2011; Huang vd., 2010; Ye vd., 2019) (Şekil 2.16). Bu düzenlemelere bağlı olarak, tümörlerin evrimi ve iskemik bozukluklar gibi birçok patolojik durumun yüksek oranda etkilenebileceği de bildirilmiştir (Devlin vd., 2011). miR-210'un ekspresyonunun artması, bir anti-anjiyogenez faktörü olan reseptör tirozin kinaz ligand efrin-A3'ü (EFNA3) hedefleyerek anjiyogenezi indüklemektedir (Fasanaro vd., 2008; Goradel vd., 2019). Efrin ligandlarının ve reseptörlerinin, kardiyovasküler sistemin gelişiminde ve VEGF sinyal yolunun

düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Goradel vd., 2019; Kuijper, Turner & Adams, 2007; Pandey, Shao, Marks, Polverini & Dixit, 1995).



Şekil 2.16. miR-210'un etkilediği genlerin temel fonksiyonları (Ivan & Huang, 2014).

miR-210'un miR-210-3p ve miR210-5p olmak üzere iki çeşidi vardır. miR-210-3p, RISC'e bağlanan kılavuz zincirdir, miR-210-5p ise bozulma yoluyla inaktive edilen yolcu (passenger) zinciridir (Bavelloni vd., 2017). miR-210 ekspresyonu ile hipoksi arasında doğrudan bir bağlantı olduğu ve özellikle, promotöründe HIF-1α bağlanma bölgelerini taşıyan miR-210'un hem normal hem de dönüştürülmüş hücrelerde önemli ölçüde yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (Bavelloni vd., 2017; Qin, Furong & Baosheng, 2014).

miR-210'un sinir sisteminde de önemli rollere sahip olduğu bildirilmiştir. Yetişkin farelerde, miR-210'un aşırı ekspresyonunun veya yıkımının sırasıyla duyusal akson rejenerasyonunu desteklediği veya bozduğu gösterilmiştir (Hu, Jiang, Wang & Tu, 2016; Lyu vd., 2021). Yakın zamanda yapılan iki çalışma, miR-210'un bir model organizma olan *Drosophila*'daki sirkadiyen ritimleri de düzenlediğini göstermiştir (Cusumano vd., 2018; Niu, Liu, Nian, Xu & Zhang, 2019).

miR-210, *Drosophila*'da fotoreseptör nöronlarda ve diğer duyu organlarında ifade edilir. miR-210'un kaybı, aşamalı olarak fotoreseptör dejenerasyonuna ve lipid damlacık birikimine yol açar. miR-210'un lipid metabolizmasını düzenlediğini ve *Drosophila* retinasında nörodejenerasyonu önlediği bildirilmiştir. Bu çalışma, miR-210'un lipid

metabolizmasını ve nöronal fonksiyonları modüle etmede yeni bir rolünü ortaya çıkarmıştır (Lyu vd., 2021).

miR-210, hücresel metabolizmayı ve yara iyileşmesi için önemli süreçleri düzenler. Diyabetik hastaların yaralarında ve diyabetik farelerin deneysel yaralarında miR-210 indüksiyonunun baskılandığı, miR-210'un lokal olarak rekonstitüsyonu (yeniden yapılandırılması), metabolik dengeyi düzenleyerek ve yara iyileşmesi için merkezi süreçleri iyileştirerek özellikle farelerde yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir (Narayanan vd., 2020).

2.4.5.3. miRNA-221

miR-221, kanserle ilişkili bir miRNA'dır. X kromozomunun kısa kolundaki miR-222 ile birlikte bir gen kümesinde kodlanır. Yüksek seviyede homolog olan bu iki miRNA, sıklıkla bir gen grubu (miR-221/222) olarak işlev görür ve birçok insan malignitesinde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. (Song vd., 2017).

Sağlıklı koşullarda, anjiyogenez, neointimal hiperplazi, damar yara iyileşmesi, vasküler yaşlanma ve aterosklerotik vasküler yeniden şekillenme gibi temel fizyolojik vasküler süreçleri düzenlediği bulunmuştur (Çizelge 2.3) (Chistiakov, Sobenin, Orekhov & Bobryshev, 2015; Kuehbacher, Urbich & Dimmeler, 2008; Rippe vd., 2012; Song & Li, 2010).

İlk çalışmalar, endotel hücrelerinde miR-221 ve miR-222'nin yüksek ekspresyonunun rolünü belirlemek üzerine yapılmıştır. Endotel hücrelerinin miR-221 ve miR-222 ile transfeksiyonunun tüp oluşumunu ve migrasyonu engelleyerek *in vitro* anjiyogenezi inhibe ettiği ve *in vitro* endotel hücrelerinin yara iyileşmesini azalttığı bulunmuştur. miR-221 ve miR-222, kök hücre faktörü için reseptör olan c-Kit'in protein düzeylerini azalttığı, ancak mRNA seviyesinde herhangi bir azalmanın olmadığı görülmüştür. Bu durum, miR-221 ve miR-222'nin protein translasyonunu engelleyerek c-Kit ekspresyonunu etkilediğini gösterir (Poliseno vd., 2006).

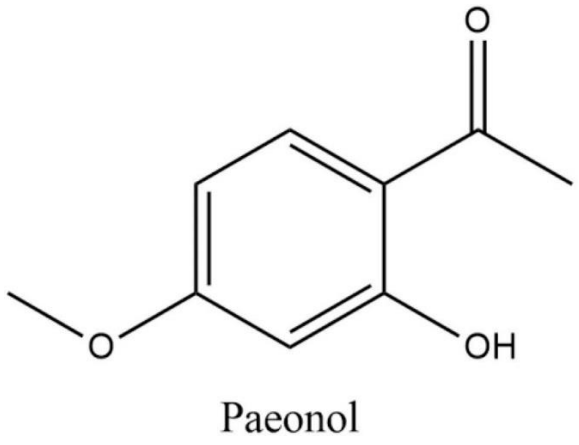
miR-221 ve miR-222'nin aşırı ekspresyonunun endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ekspresyonunu dolaylı olarak azalttığı gösterilmiştir (Suárez, Fernández-Hernando, Pober & Sessa, 2007). eNOS'un endotel hücre fonksiyonlarına etkisi göz önüne alındığında, miR-221 ve miR-222 ile azalması, bu miRNA'larla transfekte edilmiş

endotel hücrelerinde, tüp oluşumunun inhibisyonu, migrasyon ve yara iyileşmesi dahil olmak üzere fonksiyonel bozukluklara neden olabilmektedir. Pro-anjiyogenik endotelyal hücre fonksiyonunun önemli düzenleyicilerinden c-Kit ve eNOS'u hedeflediğinden, miR-221 ve miR-222, anjiyogenezi engellemek için potansiyel bir araç olabilir (Kuehbacher vd., 2008).

2.5. Paeonol

Paeonol, *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia lactiflora*, *Dioscorea japonica* ve *Arisaema erubescens* gibi bitkilerden elde edilen biyoaktif bir fenoldür (Adki & Kulkarni, 2020; Harada & Yamashita, 1969). Paeonol, Çin'de potansiyel bir ilaç olarak uzun bir geçmişe sahip olup ilk farmakolojik aktivitesi, elli yıl önce geleneksel Çin tıbbında bildirilmiştir (Harada & Yamashita, 1969). *Paeonia suffruticosa*, çeşitli tıbbi faydalara sahiptir ve binlerce yıldır yaygın olarak kullanılmaktadır. Farmakolojik etkileri oluşturan paeonol, *Paeonia suffruticosa*'nın kök kabuğundan izole edilen ana bileşendir (Zhang, Li & Liu, 2019).

Paeonol, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'ne (IUPAC) göre 1-(2-hidroksi-4-metoksifenil) etanon olarak adlandırılır. Moleküler formülü $C_9H_{10}O_3$, moleküler ağırlığı 166.17 g/mol, erime noktası 52.5°C olan bir bileşiktir (Şekil 2.17). Suda çözünmeyen beyaz kristal bir tozdur (Adki & Kulkarni, 2020; Chunhu, Suiyu, Meiqun, Guilin & Yunhui, 2008).



Şekil 2.17. Paeonolün kimyasal yapısı (1-(2-hidroksi-4-metoksifenil) etanon) (Adki & Kulkarni, 2020).

Paeonolün, anti-enflamatuar, antidiyabetik, antineoplastik, nöroprotektif, kardiyoprotektif, nefroprotektif ve anti-tümör ajan olmak üzere çeşitli farmakolojik

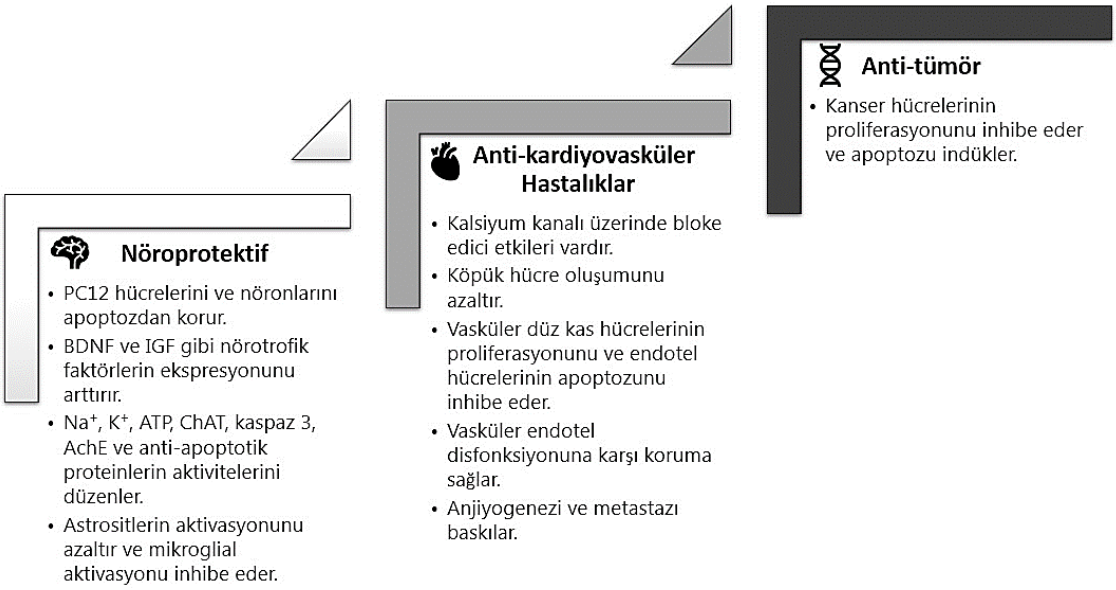
özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.18) (Adki & Kulkarni, 2020; Chunhu vd., 2008; Tan, Ye, Qian, Ji & Liu, 2007).



Şekil 2.18. Paeonolün farmakolojik etkileri (Zhang vd., 2019).

Şu anda, Çin Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanan paeonol dozaj formları arasında tablet, enjeksiyon, merhem ve yapışkan flaster gibi harici preparatlar bulunmaktadır (Zhang vd., 2019).

Paeonol'ün ateş, baş ağrısı, iltihaplanma, nevralji, alerji, romatoid artrit gibi durumlarda, bazı cilt hastalıklarında (egzama, dermatit, kaşıntılı cilt, sivrisinek ve tahtakurusu ısırıkları) ve ayrıca alerjik rinit, soğuk algınlığı gibi durumlarda da önemli etkileri olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, anti-enflamatuar aktivite dışında paeonolün diğer farmakolojik aktiviteleri henüz klinikte uygulanmamıştır (Zhang vd., 2019). Daha önce yapılan çalışmalarda paeonolün, Akt sinyal yolağının ve matriks metalloproteinaz aktivitesinin inhibisyonuyla anjiyogenezi ve metastazı bastırma potansiyeli olduğu bildirilmiştir (Kim vd., 2009). Paeonolün, miyokardiyal iskemi ve reperfüzyonla ilişkili hasarları azaltarak miyokard enfarktüsü ve bunun gibi hastalıkların tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmektedir (Ma vd., 2016; Nizamutdinova vd., 2008) (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. Paeonolün diğer farmakolojik mekanizmalara etkileri (Zhang vd., 2019).

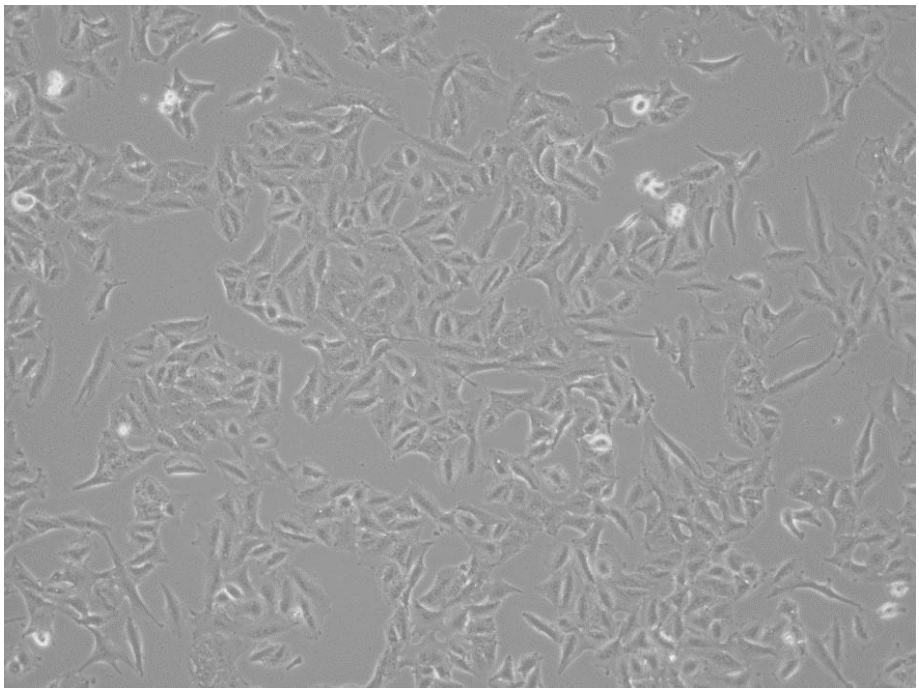
Ek olarak paeonolün, anti-anafilaktik aktivite, antioksidan aktivite, trombosit agregasyonunu inhibe edici aktivite (antiagregan) ve azalmış erken neointimal hiperplazi gösterdiği bildirilmiştir (Chunhu vd., 2008; Kim vd., 2004; Terawaki vd., 2015; Zhang vd., 2017).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Hattı

Çalışmamızda 19 yaşında sağlıklı bir erkek bireyden (Amy Aotaki-Keen) elde edilen insan retinal pigment epitel hücre hattı ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™) kullanılmıştır (Şekil 3.1). Morfolojik olarak epitelyal özellikte olan ARPE-19 hücreleri, kültür ortamında yapışan özelliğe sahiptir. Buhar fazında, sıvı azotta dondurularak saklanır (ATCC, 2016).



Şekil 3.1. ARPE-19 insan retinal pigment epitel hücrelerinin invert ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.

3.2. Hücre Besiyeri Hazırlanması

Hücrelerin gelişmesi ve çoğalmaları için %8 fetal sığır serumu (FBS, Fetal Bovine Serum), %1 penisilin/streptomisin ve 6 ml L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's F-12 içinde kültüre alınmıştır. Kültür %5 karbondioksit (CO_2) içeren bir inkübatör içerisinde 37°C sıcaklıkta devam etttirilmiştir.

3.3. Hücrelerin Kültüre Alınması, Pasajlanması ve Dondurulması

3.3.1. Dondurulan Hücrelerin Kültüre Alınması

Bu işlem için dondurucuda saklanan hücreler önceden 37°C'ye getirilmiş olan besiyeri içerisine alınarak 1250 rpm'de (revolutions per minute, dakikadaki devir sayısı) 1:30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüp tekrar kabine alınıp, süpernatantın tamamı pipetle çekilip atıldıktan sonra, bir miktar besiyeri hücrelerin üzerine eklenerek iyice karıştırılmış ve 75 cm^2'lik flaska ekilmiştir. Flaskın tabanına eşit derecede yaydırılan hücreler, 37°C'de %5 CO_2 seviyesine ayarlı inkübatöre (Heal Force, Çin) yerleştirilmiştir. Ekimden yaklaşık 4-6 saat sonra, dondurulmuş hücre besiyeri içerisinde bulunan dimetil sülfoksitin (DMSO) tamamen uzaklaştırılması için besiyeri, yeni yapışmaya başlayan hücreleri kaldırmadan mümkün olduğunca yavaş biçimde değiştirilmiştir.

3.3.2. Hücrelerin Pasajlanması

1. Hücreler uygun yoğunluğa ulaştığında flaskın içindeki besiyerinin tamamı pipetle çekilip atılmış ve hücreler 37°C sıcaklıkta olan fosfat tamponlu salin (PBS, Phosphate-buffered saline) ile yıkanmıştır.
2. Flaskın içine tabana yapışan hücreleri kaldırmak amacıyla 37°C sıcaklıkta olan tripsin eklenmiş ve inkübatöre yerleştirilmiştir.
3. Mikroskop ile hücrelerin tabandan ayrıldığı belirlendikten sonra flaskın içindeki tripsin+hücre karışımının tamamı 15 ml'lik falkona aktarılarak, hücreleri tripsinden ayırmak amacıyla 1:30 dk, 1250 rpm'de santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj edilen tüp tekrar kabine alınıp, süpernatantı pipetle yavaş yavaş çekilerek atılmıştır.

5. Peletin bulunduğu falkon tüpün üstüne bir miktar besiyeri eklenmiş pelet, mümkün olduğunca homojen olacak şekilde karıştırılmıştır.
6. Flask tabanının tamamına yaydırılan hücreler kontrol edilmiş daha sonra inkübatöre (37°C, %5 CO_2) yerleştirilmiştir.

3.3.3. Hücrelerin Dondurulması

1. Flaskın içindeki besiyerinin tamamı pipetle çekilip atılmış ve hücreler PBS eklenerek hücreler yıkanmıştır.
2. Flaskın içine tabana yapışan hücreleri kaldırmak amacıyla tripsin eklenmiş ve inkübatöre kaldırılmıştır.
3. Bekleme süresinde boş bir tüpe %7 DMSO içeren besiyeri hazırlanmıştır.
4. Mikroskop ile hücrelerin tabandan ayrıldığı belirlendikten sonra flaskın içindeki tripsin+hücre karışımının tamamı 15 ml'lik falkona aktarılarak, hücrelerin tripsinden ayrılması amacıyla 1:30 dk, 1250 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant pipetle yavaş yavaş çekilerek atılmıştır.
5. Önceden hazırlanan DMSO içeren besiyeri alınarak süpernatantı atılan hücrelerin bulunduğu falkon tüpe eklenmiş ve kriyojenik/mikrosantrifüj tüpe yavaş yavaş pipetlenmiştir ve daha sonra tekrar kullanılmak üzere -80°C'lik derin dondurucuya (Wisd, Daihan Scientific, Kore) kaldırılmıştır.

3.4. Çalışma Grupları

Çalışmada 4 temel grup belirlenmiş ve aşağıda verilmiştir.

Grup 1: Kontrol grubu

Grup 2: Paeonol grubu

Grup 3: Hipoksi grubu (DFX uygulaması ile elde edilmiştir)

Grup 4: Paeonol+Hipoksi grubu (Hipoksi grubuna paeonol uygulanarak elde edilmiştir)

3.5. MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) Analizi

Tetrazolyum tuzları, memeli hücrelerinin canlılığını ve proliferasyonunu belirlemek için kantitatif kolorimetrik bir yöntemin geliştirilmesini sağlamıştır. Kolorimetrik yöntemin ana avantajları; hızlılığı, hassasiyeti ve herhangi bir radyoizotopunun olmamasıdır (Mosmann, 1983).

Tetrazolyum tuzlarından olan MTT ile yapılan bu analiz, hücre canlılığını tespit eden ve bu verileri spektrofotometre ile yüksek derecede doğrulukla belirleyebilen bir analizdir (Mosmann, 1983). Kantitatif olan MTT testi, hücre büyüme oranlarının belirlenmesinde, ilaç etkisinin ve sitotoksik ajanların test edilmesinde ve diğer biyolojik olarak aktif bileşiklerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kit; Mosmann, 1983).

Hücrelere hipoksi uygulanması literatürde yer alan konsantrasyon ve uygulama süresine göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, Deferoxamine Mesylate Salt (DFX) hipoksi ajanı aracılığıyla, normal ARPE-19 hücrelerinde 24 saat boyunca 100 µM uygulanarak hipoksik ortam oluşturulmuştur (D'Amico vd., 2018; Doğanlar vd., 2021).

MTT analizi, ARPE-19 hücrelerinde DFX aracılığıyla elde edilen hipoksik ortamı, kontrole göre anlamlı bir şekilde azaltacak en uygun paeonol dozunun ve uygulama süresinin bulunması için kullanılmıştır.

Bu uygulamalar sonucunda MTT analizi ile elde edilen hücre canlılığını, sadece DFX uygulanan gruba göre anlamlı şekilde yükselten paeonol (PAE) dozu ve süresi belirlenmiştir.

3.5.1. Deferoxamine Mesylate Salt Stok ve Uygulama Dozunun Hazırlanması

Toz halde -20°C'de saklanan, moleküler ağırlığı 656,79 g/mol olan "Deferoxamine Mesylate Salt (Sigma Aldrich)" maddesinden öncelikle 10.000 µM ana stok çözeltisi hazırlanmış ve çözelti 1,5 ml tüplere bölünerek kullanıma hazır şekilde -20°C'de saklanmıştır. Uygulama yapılacağı zaman hazırlanan ana stok çözeltiden uygun hacimlerde kullanılmıştır.

3.5.2. Paeonol Stok ve Uygulama Dozlarının Belirlenmesi

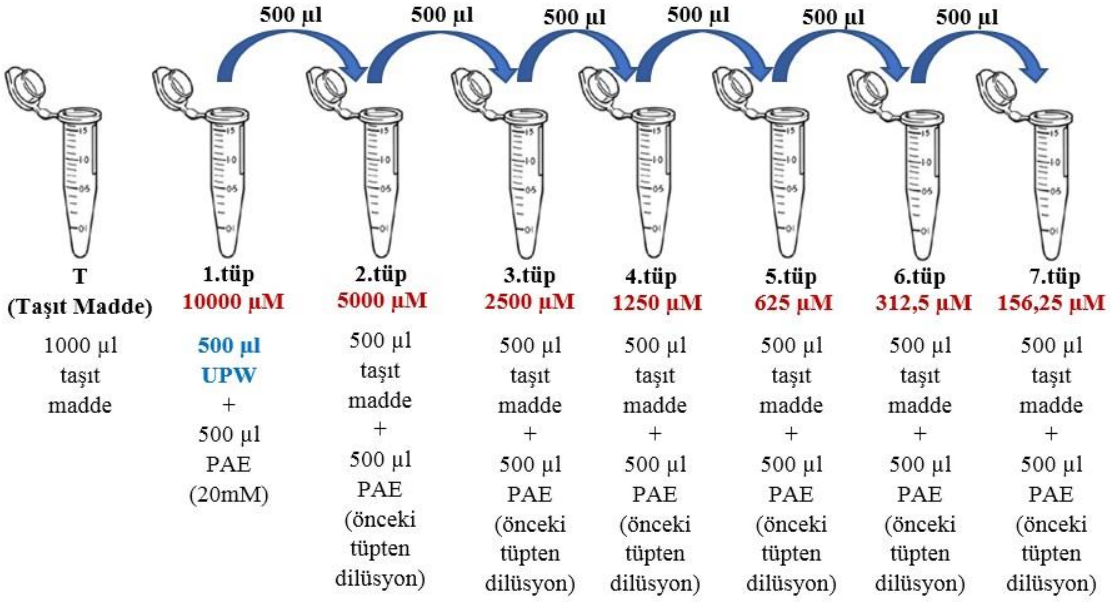
Toz halde oda sıcaklığında saklanan, moleküler ağırlığı 166,17 g/mol olan "Paeonol (2′-hydroxy-4′-methoxyacetophenone, H35803-10G, CAS:552-41-0, Sigma Aldrich)" plakaya en yüksek doz 1000 µM'dan başlayacak şekilde uygulama yapmak için öncelikle 20.000 µM'lık ana stok çözeltisi hazırlanmıştır.

16,67 mg tartılıp 15 ml'lik falkon tüpe aktarılarak üzerine 1 ml DMSO eklenip çözdürülmüş ve daha sonra üzerine 4 ml ultra saf su eklenmiştir. Eklenen her 1 ml ultra

saf suda çözeltinin çöküp çökmediği kontrol edilerek 20.000 µM, 5 ml PAE ana stok çözeltisi elde edilmiştir. Bu çözelti 1,5 ml'lik tüplere bölünerek -20°C'de saklanmıştır.

Taşıt Madde ve PAE Dozlarının Hazırlanması

Kontrol grubuna uygulanacak olan taşıt madde, DMSO'nun 1:10 oranında ultra saf su ile sulandırılmasıyla elde edilmiştir (DMSO'nun son konsantrasyonu 1:1000 oranındadır). Plakaya uygulanacak olan en yüksek uygulama dozu 1000 µM olacağından 1,5 ml'lik tüplerde 10.000 µM'dan başlayıp seri sulandırım yöntemiyle Şekil 3.2'de belirtildiği gibi 7 doz hazırlanmıştır.



Şekil 3.2. PAE uygulama dozları ve seri sulandırım yöntemi.

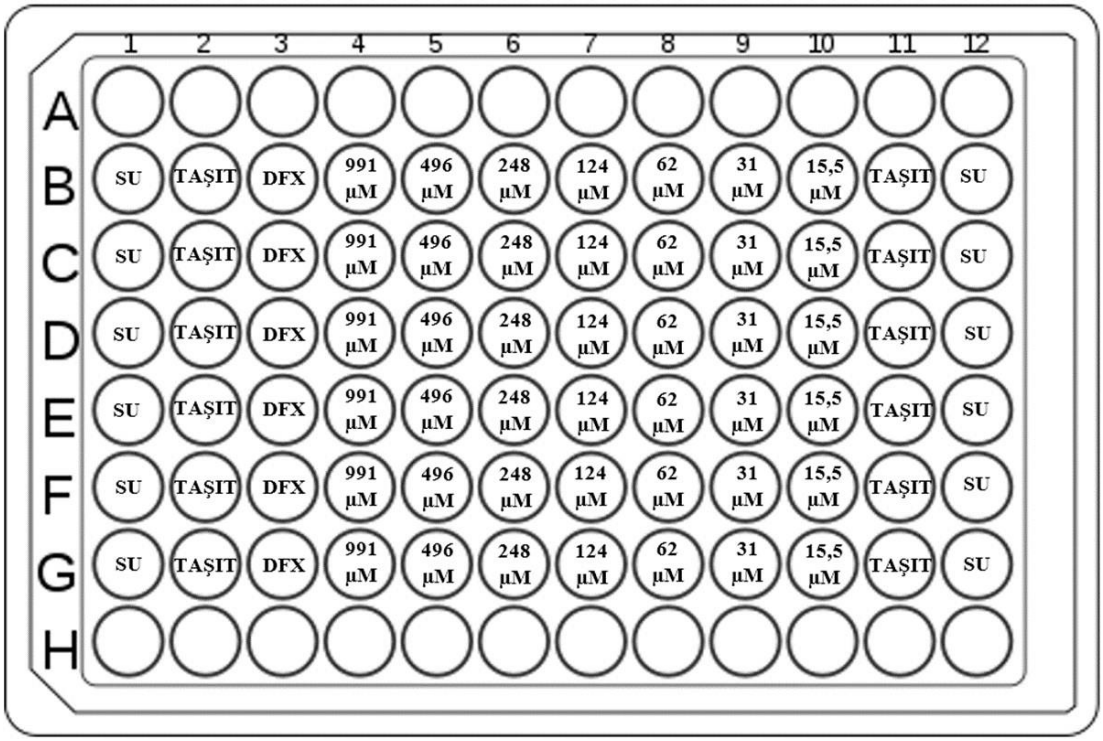
3.5.3. MTT Solüsyonu Hazırlanması

Bir cam beher içerisinde 100 ml saf suda (dH_2O) 1 kapsül PBS manyetik karıştırıcı ile çözdürülmüştür. 50 ml'lik falkon tüpe hazırlanan toz haldeki MTT'nin ana stok konsantrasyonu 5 mg/ml'dir. 40 ml elde etmek için hassas terazide 200 mg olacak şekilde tartılmıştır. 200 mg toz haldeki MTT falkon tüpe alınarak, üstü PBS-dH_2O karışımı ile 40 ml'ye tamamlanmıştır. Tozun tamamı çözünene kadar vortekslenmiş daha sonra alüminyum folyoya sarılıp etiketlenerek, +4°C'ye kaldırılmıştır.

ARPE-19 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücrelerin uygun yoğunlukta olup olmadığı mikroskopta kontrol edildikten sonra hücrelerin yapışması için plaka, bir gece boyunca inkübatörde (37°C, %5 CO_2) inkübe edilmiştir.

MTT Analiz Protokolü

1. Ertesi gün uygun şekilde kuyucuklara yapışan hücrelere son konsantrasyon 100 µM olacak şekilde DFX uygulaması yapılmıştır.
2. DFX uygulandıktan 24 saat sonra taşıt madde ve PAE uygulaması yapılmıştır (Şekil 3.3).
3. Paeonol ve taşıt madde uygulandıktan 48 saat sonra 90 µl MTT uygulaması yapılmış ve inkübatörde 3 saat bekletilmiştir.
4. Bu sürenin ardından kuyucukların içindeki sıvı, hücrelere zarar vermeden tamamen boşaltılmıştır. Boşalan plakanın her bir kuyucuğuna 180 µL DMSO pipetlenmiştir.
5. 37°C inkübatörde 1 saat bekleme süresinin sonunda Multiscan™ GO Mikroplate (Thermo Fisher Scientific) spektrofotometre okuyucu ile 492 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür.
6. Elde edilen absorbans değerleri ile hücre canlılığı analizi yapılmıştır.



Şekil 3.3. Uygulamalar sonucu hücre kültürü plakasındaki gruplar.

3.6. Genetik Analizler

3.6.1. Ribonükleik Asit (RNA) İzolasyonu

Çalışmamızda kontrol ve uygulama gruplarından RNA izolasyonu, "PureLink® RNA Mini Kit" (Life Sciences, USA) kullanılarak kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu yapılacak hücrelerin tamamı flasklardan toplanıp -80°C'de 2 ml'lik eppendorf tüplerde saklanmıştır. Dolayısıyla RNA izolasyonu, "Donmuş hücre peleti (Frozen cell pellets)" protokolüne uygun şekilde yapılmıştır.

- %1 2-merkaptoetanol içerecek şekilde örnek sayısına göre hesaplanarak Lizis tamponu (Lysis Buffer) hazırlanmıştır.
- %70'lik etanol hazırlanmıştır.

RNA İzolasyon Protokolü (Donmuş Hücre Peleti);

1. Her bir örnek üzerine 300 µl lizis tamponu eklenmiştir.
2. Tüpler, oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika boyunca çalkalama cihazında (Bioer, Çin) inkübe edilmiştir.
3. Parçalama işleminden sonra 300 µl %70 etanol eklenip tüm örnekler hızlı bir şekilde ve görünür bir parça kalmayana kadar iyice vortekslenerek 700 µl kapasiteli spin kolonlara aktarılmıştır.
4. Spin kolonlar, oda sıcaklığında 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edildikten sonra toplama tüplerinde biriken sıvı atılarak tekrar spin kolonlara takılmıştır.
5. Spin kolonların üstüne 700 µl birinci yıkama tamponu eklenerek 12.000 g'de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası toplama tüpleri atılarak yerine yenileri takılmıştır.
6. Spin kolonların üstüne 500 µl ikinci yıkama tamponu eklenerek 12.000 g'de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra, toplama tüplerinde biriken sıvı atılarak tekrar spin kolonlara takılmıştır. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır.
7. Spin kolonlarda membrana yapışan RNA'nın kurutulması amacıyla 12.000 g'de 2 dk boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir.
8. Santrifüj işlemi sonunda toplama tüpleri atılarak her spin kolon için 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüp takılmıştır.

9. Spin kolonların tam ortasına gelecek şekilde 50 µl RNaz içermeyen su eklenerek 1 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
10. 12.000 g'de 2 dk santrifüj edilerek RNA'nın membrandan mikrosantrifüj tüpe suda çözünerek geçmesi sağlanmıştır.
11. İzole edilen RNA saflıkları (A_{260}/A_{280} oranı) ve miktarları (ng/µl), nanodrop cihazı ile belirlenerek not edilmiştir.
12. Elde edilen RNA'lar, gerekli etiketlemeler yapılarak çok bekletilmeden -80°C derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.6.2. Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit (cDNA) Sentezi

cDNA sentezi "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (Applied Biosystems) kullanılarak kit protokolüne göre yapılmıştır. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpte hazırlanan cDNA master mix, tek bir örnek için aşağıdaki miktarlarda eklenerek iyice vortekslenmiştir (Çizelge 3.1). Deney öncesinde hesaplanan örnek sayısından %10 fazla hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. cDNA kit bileşenleri ve kullanım miktarları.

Kullanılan Karışım Bileşeni	Miktar
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1 µl
Nükleaz içermeyen su	4,2 µl
Her Örnek İçin Toplam	**10 µl**

1. Soğuk blok üstünde miktarları eşitlenen RNA'lardan 10 µl ve master mix'ten 10 µl olacak şekilde pipetlenip vortekslenmiştir.
2. PCR işlemi, ayarlanan programa göre gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2).
3. Sentezlenen cDNA'lar gen ekspresyonu yapılmak üzere 4°C'ye kaldırılmıştır.

Çizelge 3.2. PCR işleminin döngüleri için ayarlanan sıcaklık ve süre değerleri.

	1. Döngü	2. Döngü	3. Döngü	4. Döngü
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Süre	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

3.6.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

ARPE-19 hücrelerinde her bir grup için HIF-1α, HIF-1β, VEGF, VEGFR, MMP-3, MMP-9 genlerinin ekspresyon seviyeleri BlasTaq™ Green 2X qPCR Master Mix kiti kullanılarak qRT-PCR analizi ile elde edilmiştir. Endojen kontrol (kalibratör) olarak β-aktin ve 18S primerleri kullanılmıştır. Gen ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi için kullanılan primerler ve primer dizileri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Primer baz dizileri ve uzunlukları.

Gen Adı	Primer Dizisi	Primer Uzunluğu (bç)
β-aktin	F: 5' GTCCACCGCAAATGCTTCTA 3'	20
	R: 5' TGCTGTCACCTTCACCGTTC 3'	20
18S	F: 5' CGCTTCCTTACCTGGTTGAT 3'	20
	R: 5' GAGCGACCAAAGGAACCATA 3'	20
HIF-1α	F: 5' AGCCAGATCTCGGCGAAGT 3'	19
	R: 5' CAGAGGCCTTATCAAGATGCG 3'	21
HIF-1β	F: 5' CAAGCCCCTTGAGAAGTCAG 3'	20
	R: 5' GAGGGGCTAGGCCACTATTC 3'	20
VEGF	F: 5' AGGAGGGCAGAATCATCACG 3'	20
	R: 5' CAAGGCCCACAGGGATTTTCT 3'	21
VEGFR	F: 5' GAACATTTGGGAAATCTCTTGC 3'	22
	R: 5' CGGAAGAACAATGTAGTCTTTGC 3'	23
MMP-3	F: 5' GGTCTCTTTCACTCAGCCAACAC 3'	23
	R: 5' CAGGCGGAACCGAGTCAGG 3'	19
MMP-9	F: 5' TACCCTATGTACCGCTTCAC 3'	20
	R: 5' GAACAAATACAGCTGGTTCC 3'	20

qRT-PCR Protokolü;

1. Gen ifadeleri belirlenmesi 384 kuyucuklu QuantStudio 5 Real Time PCR cihazı (Applied Biosystems) ile gerçekleştirilmiştir.
2. Primerler ve örnekler uygun şekilde 384'lük plakaya pipetlenmiştir.
3. Pipetleme işleminden sonra plaka sealer ile kaplanmış ve qRT-PCR cihazına uygun şekilde yerleştirilerek döngüleri ayarlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. qRT-PCR işlemi için ayarlanan sıcaklık ve süre değerleri.

	1. Adım	2. Adım	3. Adım
İşlem	Denatürasyon	Uzama	Bağlanma
Sıcaklık	95°C	95°C	60°C
Süre	10 dakika	15 saniye	1 dakika
Döngü	x1	x52	

4. Gen ekspresyon seviyesi ΔΔCt yöntemi (Yaklaşım metodu/Relative Quantitation) ile hesaplanmıştır (Şekil 3.4).

$$Ct_{\text{hedef gen}}^{\text{örnek}} - Ct_{\text{endojen kontrol}}^{\text{örnek}} = \Delta Ct_{\text{örnek}}$$

$$Ct_{\text{hedef gen}}^{\text{kalibratör}} - Ct_{\text{endojen kontrol}}^{\text{kalibratör}} = \Delta Ct_{\text{kalibratör}}$$

$$\Delta Ct_{\text{örnek}} - \Delta Ct_{\text{kalibratör}} = \Delta\Delta Ct$$

$$\textit{Kat Artışı} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Şekil 3.4. ΔΔCt yöntemi hesaplama aşamaları.

5. β-aktin ve 18S primerlerinin ortalamaları, endojen kontrol olarak kullanılmıştır.

3.6.4. miRNA cDNA Sentezi ve Ekspresyonu

3.6.4.1. miRNA cDNA Sentezi

miRNA cDNA sentezi TaqMan® Advanced miRNA cDNA Sentez Kiti (Thermo, Life Technologies, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonunda elde edilen örneklerin konsantrasyonu ≤ 5 ng/µl olacak şekilde eşitlenmiştir. Gerekli reaksiyon sayısını hesaplanarak %10 fazla olacak şekilde hazırlanmıştır.

<u>miRNA cDNA Sentez Protokolü</u>

<u>A. Poli (A) Kuyruk Oluşturma Reaksiyonu</u>

1. Örnekler ve cDNA sentez reaktifleri buz üzerinde çözdürülüp hafifçe vortekslenmiştir.
2. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüp içinde, reaksiyon sayısına göre hesaplanmış %10 fazla olacak şekilde aşağıdaki gibi Poli (A) Reaksiyon Karışımı hazırlanmıştır ve iyice vortekslenmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Poli (A) reaksiyon karışımı bileşenleri.

Bileşenler	1 Örnek için
10X Poli (A) Tamponu	0,5 µl
ATP	0,5 µl
Poli (A) Enzimi	0,3 µl
RNaz içermeyen dH_2O	1,7 µl
Toplam Poli (A) Reaksiyon Karışım Hacmi	**3,0 µl**

3. Her bir PCR tüpü, 2 µl RNA örneği ve 3 µl Poli (A) Reaksiyon Karışımı içerecek şekilde hazırlanmıştır.
4. Tüpler vortekslenerek PCR cihazına yerleştirilmiş, Çizelge 3.6'da verilen programa göre işlem gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. Poli (A) reaksiyon karışımı PCR protokolü.

Adım	Sıcaklık	Süre
Poliadenilasyon	37°C	45 dk
Reaksiyon Durdurma	65°C	10 dk
Bekleme (Hold)	4°C	∞

B. Adaptör Ligasyon Reaksiyonu

5. PCR devam ederken 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüp içinde reaksiyon sayısına göre Ligasyon Reaksiyon Karışımı örnek sayısından %10 fazla olacak şekilde hazırlanmıştır ve iyice vortekslenmiştir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Ligasyon reaksiyon karışımı bileşenleri.

Bileşenler	1 Örnek için
5X DNA Ligaz Tamponu	3 µl
%50 PEG 8000	4,5 µl
25X Ligasyon Adaptör	0,6 µl
RNA Ligaz	1,5 µl
RNaz içermeyen dH_2O	0,4 µl
Toplam Ligasyon Reaksiyon Karışım Hacmi	**10 µl**

6. A bölümünde elde edilen Poli (A) Reaksiyon Ürünün üzerine her bir örnek için 10 µl Ligasyon Reaksiyon Karışımı pipetlenmiş ve iyice vortekslenmiştir. Böylece toplam reaksiyon hacmi örnek başına 15 µl olmuştur.
7. Reaksiyon tüpleri PCR cihazında Çizelge 3.8'de verilen koşullarda tutularak ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.8. Ligasyon reaksiyon karışımı PCR protokolü.

Adım	Sıcaklık	Süre
Ligasyon	16°C	60 dk
Bekleme	4°C	∞

C. Ters Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu

8. PCR devam ederken 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüp içinde reaksiyon sayısına göre hesaplanmış %10 fazla olacak şekilde RT Reaksiyon Karışımı hazırlanmış ve iyice vortekslenmiştir (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Ters transkripsiyon reaksiyon karışımı bileşenleri.

Bileşenler	1 Örnek için
5X RT Tamponu	6 µl
dNTP Mix (25mM)	1,2 µl
20X Universal RT Primer	1,5 µl
10X RT Enzim Mix	3 µl
RNaz içermeyen dH_2O	3,3 µl
Toplam RT Reaksiyon Karışım Hacmi	**15 µl**

9. B bölümünde elde edilen Ligasyon Reaksiyon Ürünün üzerine her bir örnek için 15 µl RT Reaksiyon Karışımı pipetlenmiş ve iyice vortekslenmiştir. Böylece toplam reaksiyon hacmi örnek başına 30 µl olmuştur.
10. Reaksiyon tüpleri PCR cihazına yerleştirilerek aşağıdaki koşullarda reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. Ters transkripsiyon reaksiyon karışımı PCR protokolü.

Adım	Sıcaklık	Süre
Ters Transkripsiyon	42°C	15 dk
Reaksiyonu Durdurma	85°C	5 dk
Bekleme	4°C	∞

D. miR-Amp Reaksiyonu

11. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüp içinde reaksiyon sayısına göre hesaplanmış %10 fazla olacak şekilde miR-Amp Reaksiyon Karışımı hazırlanmış ve iyice vortekslenmiştir (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. miR-Amp reaksiyon karışımı bileşenleri.

Bileşenler	1 Örnek için
2X miR-Amp Master Mix	25 µl
20X miR-Amp Primer Mix	2,5 µl
RNaz içermeyen dH_2O	17,5 µl
Toplam miR-Amp Reaksiyon Karışım Hacmi	**45 µl**

12. Yeni PCR tüplerinin her birine önce 45 µl miR-Amp Reaksiyon Karışımı, sonra 5 µl RT Reaksiyon Ürünü pipetlenmiştir. Böylece toplam reaksiyon hacmi örnek başına 50 µl olmuştur.
13. Reaksiyon tüpleri termal döngü PCR cihazına yerleştirilerek, işlem gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12. miR-Amp reaksiyon karışımı PCR protokolü.

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü
Enzim Aktivasyonu	95°C	5 dk	1
Denatürasyon	95°C	3 sn	14
Bağlanma/Uzama	60°C	30 sn	
Reaksiyonun Durması	99°C	10 dk	1
Bekleme	4°C	∞	1

14. PCR sonucu elde edilen miR-Amp Reaksiyon ve RT Reaksiyon ürünleri seyreltilmeden bir sonraki işleme kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.4.2. miRNA Ekspresyonu

Çalışma kapsamında miR-155-3p, miR-210-3p ve miR-221-3p ifadeleri QuantStudio 5 Real Time PCR cihazı (Applied Biosystems) ile ve TaqMan Fast Advanced Master mix test kiti kullanılarak belirlenmiştir. Endojen kontrol olarak U6 kullanılmıştır. Primerler ve baz dizileri Çizelge 3.13'de verilmiştir.

Çizelge 3.13. miRNA primerleri ve primer dizileri.

Gen Adı	Primer Dizisi	
U6	F: 5' CTCGCTTCGGCAGCACA	3'
	R: 5' ACGCTTCACGAATTTG	3'
miR-155-3p	F: 5' CGCAGCTCCTACATATTAGCA	3'
	R: 5' AGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTGTT	3'
miR-210-3p	F: 5' GCTGTGCGTGTGACA	3'
	R: 5' GTTTTTTTTTTTTTTCAGCCGCT	3'
miR-221-3p	F: 5' GCAGAGCTACATTGTCTGCT	3'
	R: 5' CAGTTTTTTTTTTTTTTGAAACCCA	3'

Çizelge 3.14. miRNA PCR reaksiyon karışımı bileşenleri.

Bileşenler	1 Örnek için
TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X)	10 µl
TaqMan Fast Advanced miRNA Assay (20X)	1 µl
RNaz içermeyen dH_2O	4 µl
Toplam PCR Reaksiyon Karışım Hacmi	**15 µl**

1. Hazırlanan PCR Reaksiyon Karışımı iyice vortekslenmiştir.
2. PCR reaksiyon plakasının her kuyucuğuna 15 µl PCR Reaksiyon Karışımı pipetlenmiştir (Çizelge 3.14).
3. Bu kuyucukların üzerine 5 µl seyreltilmiş cDNA örneği eklenmiştir. Böylece son durumda her bir kuyucuğun toplam hacmi 20 µl olmuştur.

4. Plakanın üzeri sealer ile kapatılmıştır, hafifçe vortekslemeden sonra karışımın kuyucukların dibine inmesi sağlanmıştır.
5. PCR koşulları aşağıdaki şekilde ayarlanmıştır (Çizelge 3.15).

Çizelge 3.15. miRNA qRT-PCR işlemi için ayarlanan sıcaklık ve süre değerleri.

	1. Adım	**2. Adım**	**3. Adım**
İşlem	Denatürasyon	Uzama	Bağlanma
Sıcaklık	95°C	95°C	60°C
Süre	10 dakika	15 saniye	1 dakika
Döngü	x1	x52	

3.7. Western Blot Protein Analizi

Çalışmamızda kontrol ve uygulama gruplarında protein ifadelerinin belirlenmesi için ilk olarak hücrelerden protein izolasyonu yapılmıştır. Bunun için;

1. Hücre pelleti -80°C'deki dolaptan çıkarılarak +4°C'de eritilmiştir.
2. Her bir tüpün üzerine cam bilye eklenerek doku parçalama cihazına (Tissue Lyser LT, Qiagen) yerleştirilmiştir.
3. En yüksek seviyede 2 dk boyunca hücreler parçalanmıştır.
4. Her bir mikrosantrifüj tüpüne 200 µl RIPA Buffer eklenerek aynı şekilde doku parçalama cihazında parçalanmış ve daha sonra 14.000 g'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj işleminden sonra süpernatant alınmış ve protein miktarları nanodrop cihazı ile belirlenmiştir.
6. Proteinler, -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.7.1. İzole Edilen Proteinlerin Denatürasyonu

1. Miktarları su ile eşitlenen protein örnekleri 200 µl'lik PCR tüplerinin her birine 20 µl pipetlenmiştir.
2. Her bir örnek için 2,5 µl NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) ve 1 µl Bolt™ Sample Reducing Agent (10X) eklenmiştir.
3. PCR cihazına yerleştirilmeden iyice vortekslenen PCR tüpleri 80°C'de 12 dakika boyunca denatüre edilmiş ve soğuk blokta soğutulmuştur.

3.7.2. Jel Elektroforezi

1. 55 ml NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X) üzeri distile su ile 1100 ml'ye tamamlanarak 1X'lik Buffer hazırlanmıştır.
2. Protein ağırlıklarının (kDa) belirlenebilmesi için hazırlanan marker içeriği;
    a. MagicMark™ XP Western Protein Standard = 7 µl
    b. SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard = 5 µl
3. Hazırlanan running buffer tanka doldurulmuştur.
4. +4°C'de saklanan jelin tarakları kontrollü bir şekilde iki taraftan da aynı anda yavaşça yukarıya doğru ittirilerek çıkartılmıştır.
5. Kuyucukların sağlamlığını kontrol etmek için tanka konan running buffer'dan, 1 ml'lik pipetle çekilip sırayla tüm kuyucukların içi dolacak şekilde pipetlenmiş, sağlam olduğu anlaşılan kuyucuklar yavaşça sallanarak boşaltılmıştır.
6. Jel, tanka yerleştirilmeden önce kuyucukların altındaki beyaz bant çıkartılmış ve daha sonra tanka yerleştirilerek kilitlenmiştir.
7. Kuyucuklara her birine yaklaşık 10-17 µl olacak şekilde örnekler pipetlenmiştir.
8. Kuyucuklar yüklendikten sonra tankın kapağı uygun şekilde takılarak elektrotlar güç kaynağına bağlanmıştır.
9. Güç kaynağı (Cleaver, Scientific Ltd., İngiltere) 1 saat boyunca 70 V'a ayarlanarak, elektroforez işlemi başlatılmıştır.

3.7.3. Yürütülen Proteinlerin Jelden Membrana Aktarılması

1. Jelin sığacağı şekilde temiz bir kaba bir miktar ultra saf su eklenmiştir.
2. Yürütme işlemi bittikten sonra jel kasetleri tanktan çıkartılıp, jel bıçağı ile kasetler dikkatlice jelden ayrılmıştır.
3. Jelin üst ve alt kısımları yine jel bıçağı ile kesilip atılmıştır.
4. Kurumaması için jel, tamamı içinde olacak şekilde ultra saf su olan kaba yerleştirilmiştir.
5. Jelin kasete yapışan bölümü, suyun içinde jel ile kaset arasına su girmesi sağlanarak dikkatlice ayrılmıştır.
6. Anode Stack Bottom açılıp, cihaza altındaki plastikle beraber yerleştirilerek sırasıyla diğer bileşenler de uygun şekilde hazırlanmıştır.
7. Ayrılan jel yavaşça alınıp Anode Stack Bottom üzerine yerleştirilmiştir.

8. Nitroselüloz membran, jel boyutuna uygun kesilip jelin çıkarıldığı suda ıslatılıp jelin üzerine konulmuştur.
9. Membran, aynı jelin yerleştirildiği gibi hava kabarcıklarından arındırılmıştır.
10. Cathode Stack Top, filtre kağıdının üzerine yerleştirilerek, rulo ile hava kabarcıkları giderildikten sonra cihazın kapağı kapatılmıştır.
11. Yeşil ışık yanan cihazda 20 V, 7 dakikalık program çalıştırılmıştır.
12. İşlem sonunda tüm proteinler membrana aktarılmıştır.
13. İşlem bittikten sonra membran, belirlenen yerlerden bistüri ile kesilerek, kurumaması için ultra saf suyun içine yerleştirilmiştir.

3.7.4. Bloklama Aşaması ve Birincil Antikor Bağlanması

1. +4°C'de saklanan WesternBreeze™ Chromogenic Kit içindeki bloklama solüsyonu her bir membran için 10 ml eklenecek şekilde hesaplanarak aşağıdaki orana uygun hazırlanmıştır.
    a. Blocker/Diluent (Part A) = 4 ml
    b. Blocker/Diluent (Part B) = 2 ml
    c. Ultra saf su = 14 ml
2. HIF-1α antikoru 1:500, MMP-3 antikoru 1:500, VEGF antikoru 1:750, MMP-9 antikoru 1:500 oranında bloklama solüsyonu ile seyreltilerek her bir membran için 10 ml'lik birincil antikorlar hazırlanmış, alüminyum folyoya sarılıp -20°C'ye kaldırılmıştır.
3. İnkübasyon kaplarına yerleştirilen membranlara birincil antikorlar, hazırlanan bloklama solüsyonundan her kap için pipetle 10 ml eklenmiştir.
4. 18°C, 30 devirde 3 saat boyunca karıştırıcı blok (Wisemix, Wisd Laboratory Instruments) üzerinde çalkalanmıştır. Yarım saatte bir kapların yönü değiştirilmiştir.
5. Çalkalama işlemi sonunda bloklama solüsyonunun tamamı 50 ml'lik falkon tüpte toplanarak -20°C'ye kaldırılmıştır.
6. Membranlar, çalkalama cihazının üzerinde 5 dakika boyunca ultra saf su ile çalkalanmıştır.

7. Membran üzerine uygun sıcaklıktaki birincil antikorlar pipetlenerek karıştırıcı blok üzerinde, inkübatörün içinde (30 devir, 4°C'de) bir gece boyunca çalkalanarak inkübe edilmiştir.

3.7.5. İkincil Antikor Bağlanması ve Görüntüleme

1. +4°C'de saklanan WesternBreeze™ Chemiluminescent kit içindeki Wash Solution, her bir membran için 10 ml eklenecek şekilde hesaplanarak aşağıdaki orana uygun hazırlanmıştır.
    a. Antibody Wash Solution (16X) = 10 ml
    b. Ultra Saf Su = 150 ml
2. Chemiluminescent Substrate Solution, her bir membran için 2,5 ml eklenecek şekilde hesaplanarak 15 ml'lik falkon tüpe aşağıdaki oranda hazırlanmıştır.
    a. Chemiluminescent Substrate = 2,375 ml
    b. Chemiluminescent Substrate Enhancer = 0,125 ml
3. Bir gece boyunca inkübatörde membrana yapışması amacıyla inkübe edilen birincil antikorlar, pipetle 15 ml'lik falkon tüplere toplanarak -20°C'ye kaldırılmıştır.
4. Membranlar, karıştırıcı blok üzerinde 3x5 dakika boyunca wash solution ile çalkalanmıştır.
5. Membranlar, karıştırıcı blok üzerinde 3x5 dakika boyunca ultra saf su ile çalkalanmıştır.
6. Ultra saf su atıldıktan sonra, ikincil antikorlar membran üzerine pipetlenerek, 1 saat boyunca 30 devirde karıştırıcı blokta inkübe edilmiştir. İşlem başladıktan yarım saat sonra kapların yönü değiştirilmiştir.
7. İnkübasyon sonunda ikincil antikorlar da pipetle 15 ml'lik falkon tüplere toplanarak -20°C'ye kaldırılmıştır.
8. Membranlar, karıştırıcı blok üzerinde 3x5 dakika boyunca wash solution ile çalkalanmıştır.
9. Membranlar, karıştırıcı blok üzerinde 5 dakika boyunca ultra saf su ile çalkalanmıştır.

10. Önceden açılan Micro ChemiDoc (DNR Bio-Imaging Systems Ltd, USA) görüntüleme cihazına membran, hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice yerleştirilmiştir.
11. Her bir membran için Chemiluminescent Substrate Solution'dan pipetle 2,5 ml çekilerek, membranın tamamına yayılacak şekilde yavaş yavaş pipetlenmiştir.
12. Cihazın içinde yaklaşık 4-6 dakikalık bir inkübasyondan sonra bilgisayarda "GelCapture Chemi" yazılımı kullanılarak görüntülenen veriler kaydedilmiştir.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel verilerin analizleri SPSS 18 programı ile yapılmıştır. qRT-PCR analizinde ΔΔCt yöntemi ile elde edilen gen ve miRNA ekspresyon değerlerinin ortalamaları arasındaki farklar tek yönlü ANOVA (Analysis Of Variance) yöntemi ile belirlenmiştir. Ortalamaların girdiği gruplar çalışma verilerinin durumuna göre "Tukey" testi ile saptanmıştır. Elde edilen "*p*" değerleri 0,05'den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($p \leq 0,05$).

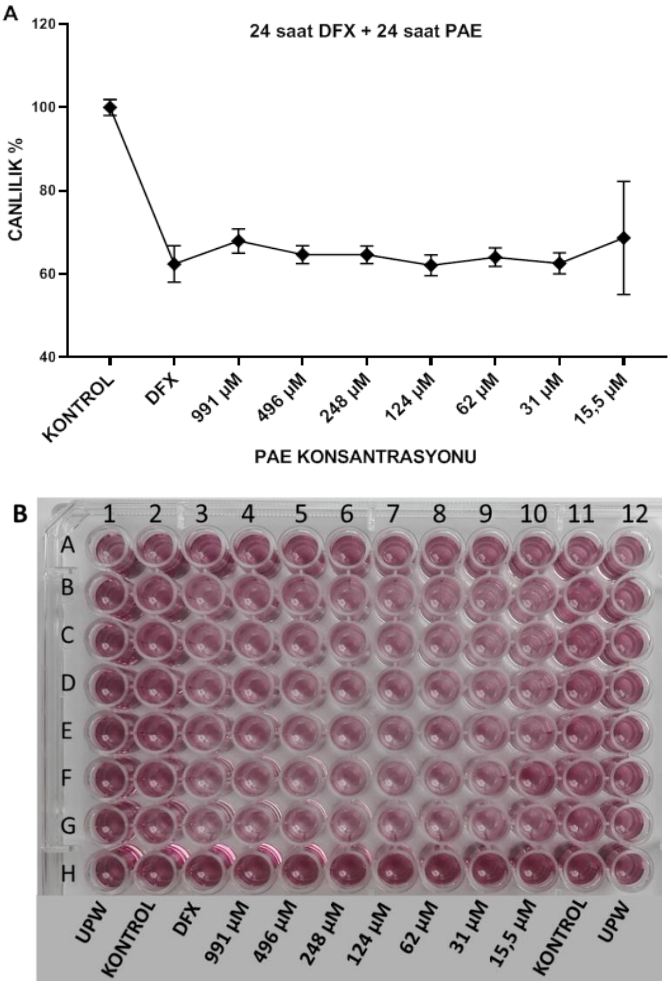
BÖLÜM 4

SONUÇLAR

4.1. MTT Hücre Canlılık Analizi

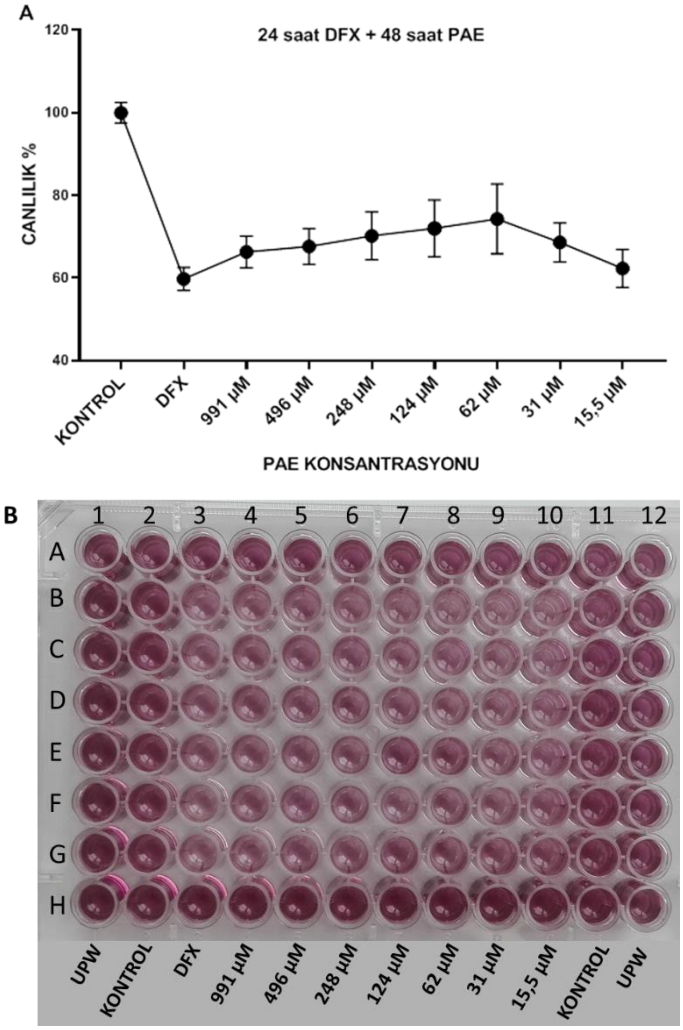
Çalışma kapsamında, DFX ile hipoksi oluşturulan ARPE-19 hücrelerinde, hücre canlılığını sadece DFX uygulanan gruba göre anlamlı ölçüde arttıran PAE dozu MTT testi ile belirlenmiştir. Bu amaçla 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekilen ARPE-19 hücreleri 100 µM DFX dozu ile 24 saat muamele edildikten sonra sırasıyla 24 ve 48 saat süreyle 991-15,5 µM aralığında 7 farklı PAE dozu uygulanmıştır.

Çalışmamızda DFX uygulamasının hücre canlılığında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (DFX; % 62,41±4,38). Bununla birlikte 24 saat DFX uygulamasını takiben 24 saat PAE uygulamasında; hücre canlılığı en yüksek (991 µM) PAE dozunda % 67,95±2,90 olarak belirlenirken, en düşük 15,5 µM PAE dozunda ise % 68,67±13,59 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1). DFX ile birlikte PAE uygulamasının sadece DFX uygulanan gruba göre, hücre canlılığında anlamlı bir artış sağlamadığı tespit edilmiştir ($F_{24\ saat}$= 32,144; sd=8,45; p<0,0001).



Şekil 4.1. A. ARPE-19 hücre hattına sırasıyla 24 saat 100 µM DFX, 24 saat 991-15,5 µM doz aralıklarında PAE uygulanarak MTT analizi ile elde edilen canlı hücrelerin yüzdesi. n=6, ortalama±standart hata. **B.** ARPE-19 hücre hattına sırasıyla 24 saat 100 µM DFX, 24 saat 991-15,5 µM doz aralıklarında PAE uygulamasının hücre canlılığına etkisini gösteren MTT plakası.

Çalışmamızda 24 saat DFX uygulamasını takiben 48 saat PAE uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 4.2'de verilmiştir. Buna göre sadece DFX uygulaması yapılan grupta hücre canlılığı, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (DFX; % 59,75±2,79). DFX uygulaması sonrası hücre canlılığı en yüksek (991 µM) PAE dozunda % 66,28±3,84 olarak belirlenirken, en düşük (15,5 µM) PAE uygulamasında % 62,30±4,64 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2). Hücre canlılığının kontrolden sonra en yüksek olduğu grup % 74,28±8,44 ile 62 µM PAE uygulanan grup olmuştur. DFX grubu ile 62 µM PAE uygulanan grup karşılaştırıldığında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ($F_{48\ saat}$= 30,369; sd= 8,45; p<0,0001).



Şekil 4.2. A. ARPE-19 hücre hattına sırasıyla 24 saat 100 µM DFX, 48 saat 991-15,5 µM doz aralıklarında PAE uygulanarak MTT analizi ile elde edilen canlı hücrelerin yüzdesi. n=6, ortalama±standart hata. **B.** ARPE-19 hücre hattına sırasıyla 24 saat 100 µM DFX, 48 saat 991-15,5 µM doz aralıklarında PAE uygulamasının hücre canlılığına etkisini gösteren MTT plakası.

4.1.1. Hipoksik ARPE-19 Hücre Hattına 24 ve 48 Saatlik PAE (991-15,5 µM) Uygulamasının Doz-Zaman İlişkisi

Normal ARPE-19 hücrelerinde 24 saat boyunca DFX ile hipoksik ortam oluşturulduktan sonra 7 farklı konsantrasyonda PAE uygulaması sonucunda belirlenen hücre canlılığı Çizelge 4.1'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre 24 saatlik uygulamada DFX grubuna göre canlılık oranında en fazla artışa neden olan doz 15,5 µM olarak belirlenmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,494). 48 saatlik uygulamada ise DFX grubuna göre canlılık oranının istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmasına neden olan doz 62 µM olarak belirlenmiştir ($p \leq 0,0001$). Elde edilen verilere

göre PAE uygulama dozu 60 µM olarak belirlenmiş ve sonraki çalışmalar bu doz ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1. ARPE-19 hücre hattında PAE uygulamasının farklı dozlara ve zamana bağlı olarak hücre canlılığına etkisi. Farklı harfler ile gösterilen gruplardaki ortalamalar, kontrole kıyasla istatistiksel olarak farklıdır (ANOVA Tukey test, $p \leq 0,05$).

Doza ve Zamana Bağlı Hücre Canlılığı (%)			
DOZ	**N**	**24 saat**	**48 saat**
Kontrol	6	$100,00 \pm 1,91^{b}$	$100,00 \pm 2,50^{d}$
DFX+Taşıt madde	6	$62,41 \pm 4,38^{a}$	$59,75 \pm 2,79^{a}$
DFX+**991 µM** PAE	6	$67,95 \pm 2,90^{a}$	$66,28 \pm 3,84^{abc}$
DFX+**496 µM** PAE	6	$64,66 \pm 2,15^{a}$	$67,63 \pm 4,34^{abc}$
DFX+**248 µM** PAE	6	$64,63 \pm 2,13^{a}$	$70,19 \pm 5,78^{bc}$
DFX+**124 µM** PAE	6	$62,10 \pm 2,49^{a}$	$72,00 \pm 6,88^{bc}$
DFX+**62 µM** PAE	6	$64,04 \pm 2,22^{a}$	$74,28 \pm 8,44^{c}$
DFX+**31 µM** PAE	6	$62,55 \pm 2,53^{a}$	$68,59 \pm 4,71^{abc}$
DFX+**15,5 µM** PAE	6	$68,67 \pm 13,59^{a}$	$62,30 \pm 4,64^{ab}$

4.2. Gen Ekspresyon Analizleri

Çalışmamızda tüm gruplar için hipoksi ve anjiyogenez yolağında başlıca etkin olan HIF-1α, HIF-1β, VEGF, VEGFR, MMP-3 ve MMP-9 genlerinin ifadelerindeki değişimler qRT-PCR ile belirlenmiş ve analiz sonuçları Şekil 4.3 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çalışma sonuçlarımıza göre en yüksek HIF-1α gen ifadesinin sadece DFX uygulaması yapılan ARPE-19 hücrelerinde belirlendiği ve kontrol grubuna göre $5,26 \pm 0,67$ kat artış gösterdiği saptanmıştır ($p \leq 0,01$). Sadece PAE ve DFX+PAE uygulaması yapılan gruplarda gen ifadesinin kontrole göre anlamlı bir değişim göstermediği, bununla birlikte sadece DFX uygulama grubuna göre anlamlı bir azalma gösterdiği belirlenmiştir ($p \leq 0,01$).

Çalışmamızda sadece DFX uygulamasının HIF-1β gen ifadesinde kontrole göre $11,59 \pm 0,76$ kat artışa neden olurken, PAE uygulamasının gen ifadesinde kontrole göre anlamlı bir değişim göstermediği saptanmıştır. DFX+PAE uygulamasının ise HIF-1β gen ifadesinde kontrole göre $2,63 \pm 0,08$ artışa neden olurken, sadece DFX uygulaması yapılan gruptan ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği saptanmıştır ($p \leq 0,01$).

Çalışmamızda VEGF ve VEGFR gen ifadelerinin en yüksek olduğu grubun sadece DFX uygulama grubu olduğu saptanmış, bunu her iki gen ifadesinde de

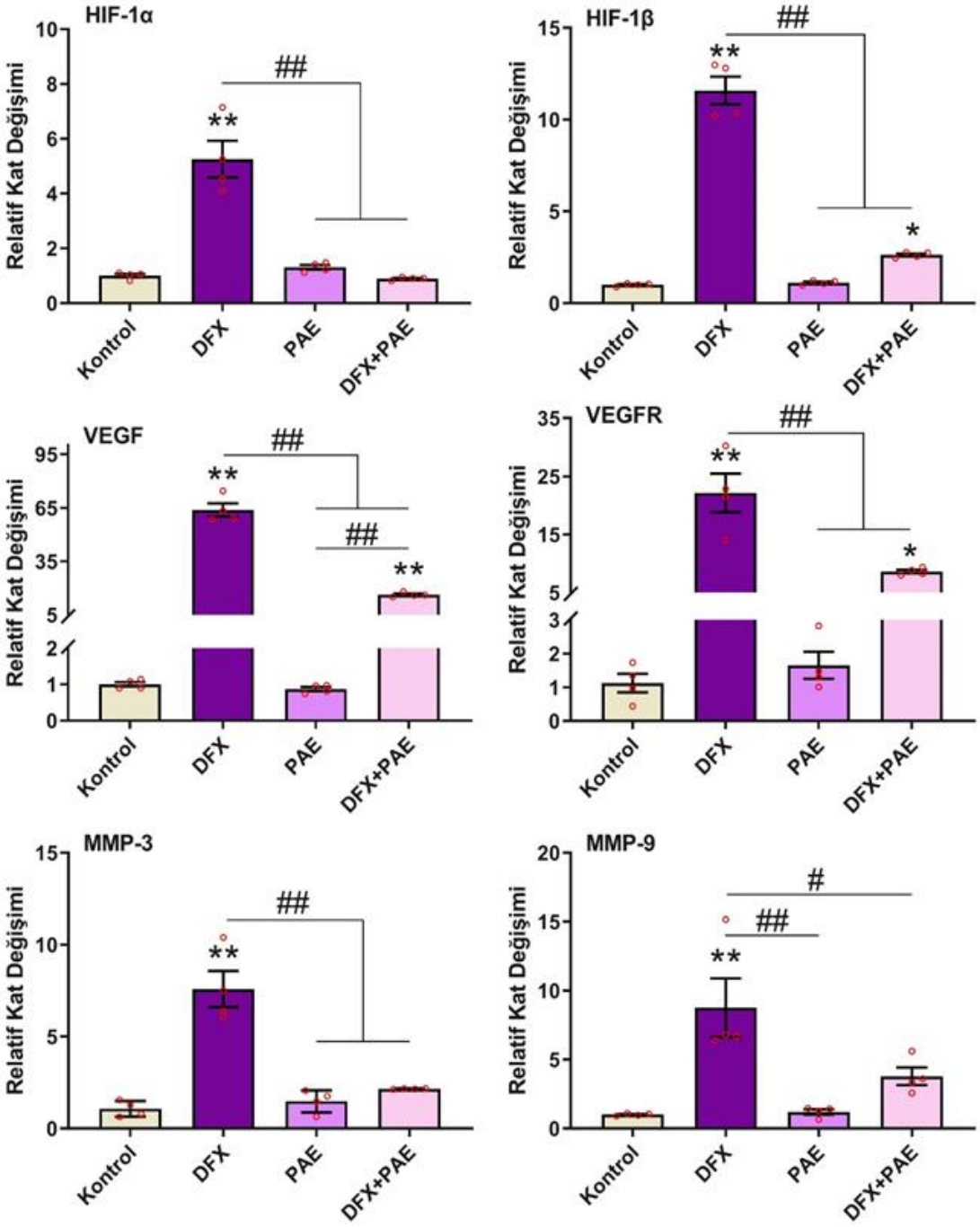
DFX+PAE grubu izlemiştir (Şekil 4.3). VEGF gen ifadesi, DFX grubunda kontrole göre 63,82±3,72 kat, VEGFR gen ifadesi ise 22,16±3,32 kat artmıştır ($p \leq 0,01$). DFX+PAE grubunda da VEGF ve VEGFR gen ifadeleri sırası ile kontrole göre 16,31±0,63 kat ve 8,62±0,31 kat artış göstermiştir. Şekil 4.3'ten de görüldüğü gibi sadece PAE uygulaması gen ifadelerinde kontrole göre anlamlı bir değişime neden olmamıştır. Bununla birlikte, DFX ile birlikte uygulanan PAE'nin sadece DFX uygulamasına göre gen ifadelerinde anlamlı azalmalara neden olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0,01$).

Çalışmamızda matriks metalloproteinazlardan MMP-3 ve MMP-9 gen ifadeleri de belirlenmiştir (Şekil 4.3). Hem MMP-3 hem de MMP-9 gen ifadelerinin en yüksek değerlerinin sadece DFX uygulanan grupta kontrole göre sırası ile 7,58±0,99 kat ve 8,76±2,13 kat olduğu belirlenmiştir. DFX ile birlikte uygulanan PAE'nin, MMP-3 ve MMP-9 gen ifadelerinde sadece DFX uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı azalmalara neden olduğu saptanmıştır. Daha da ötesi DFX+PAE grubunun kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık içermemesi PAE'nin DFX'in etkisini kontrol düzeyine geri çevirdiğini göstermektedir.

Çizelge 4.2. İnsan retinal pigment epitel ARPE-19 hücre hattına DFX, PAE ve DFX+PAE uygulamaları sonucu, kontrole kıyasla belirlenen relatif gen ekspresyon değerleri. Tüm veriler β-aktin ve 18S ifadelerinin ortalaması ile normalleştirilmiştir. n=4, ortalama±standart hata (Tek yönlü ANOVA, Tukey Test, $p \leq 0,05$).

Gen	Kontrol	DFX	PAE	DFX+PAE
HIF-1α	$1,00 \pm 0,06^{a}$	$5,26 \pm 0,67^{b}$ ⬆	$1,31 \pm 0,08^{a}$ ➡	$0,90 \pm 0,03^{a}$ ➡
HIF-1β	$1,00 \pm 0,04^{a}$	$11,59 \pm 0,76^{c}$ ⬆	$1,12 \pm 0,06^{ab}$ ➡	$2,63 \pm 0,08^{b}$ ⬆
VEGF	$1,00 \pm 0,06^{a}$	$63,82 \pm 3,72^{c}$ ⬆	$0,87 \pm 0,06^{a}$ ➡	$16,31 \pm 0,63^{b}$ ⬆
VEGFR	$1,12 \pm 0,28^{a}$	$22,16 \pm 3,32^{c}$ ⬆	$1,65 \pm 0,40^{ab}$ ➡	$8,62 \pm 0,31^{b}$ ⬆
MMP-3	$1,07 \pm 0,21^{a}$	$7,58 \pm 0,99^{b}$ ⬆	$1,48 \pm 0,30^{a}$ ➡	$2,15 \pm 0,01^{a}$ ➡
MMP-9	$1,00 \pm 0,04^{a}$	$8,76 \pm 2,13^{b}$ ⬆	$1,20 \pm 0,19^{a}$ ➡	$3,78 \pm 0,66^{a}$ ➡

⬆ Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış, ➡ Kontrole göre istatistiksel fark yok



Şekil 4.3. HIF-1α, HIF-1β, VEGF, VEGFR, MMP-3 ve MMP-9 gen ifadelerine ait relatif kat değişim grafikleri. Tüm veriler, β-aktin ve 18S mRNA ifadelerinin ortalaması ile normalize edilmiştir. *Kontrol vs. deney grupları tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi $p \leq 0{,}05$; ** $p \leq 0{,}01$; deney grupları istatistiksel olarak farklıdır ($^{\#}$ $p \leq 0{,}05$; $^{\#\#}$ $p \leq 0{,}01$).

HIF-1α: Hipoksi ile indüklenen faktör 1-α, **HIF-1β:** Hipoksi ile indüklenen faktör 1-β, **VEGF:** Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü, **VEGFR:** Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü, **MMP-3:** Matriks Metalloproteinaz 3, **MMP-9:** Matriks Metalloproteinaz 9.

4.3. miRNA Ekspresyon Analizleri

Çalışma kapsamında HIF-1α, HIF-1β, VEGF, VEGFR, MMP-3 ve MMP-9 genlerine ilaveten miRNA-155-3p, miRNA-210-3p ve miRNA-221-3p ekspresyonları da saptanmış, Şekil 4.4 ve Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çalışma sonuçlarımıza göre en yüksek miR-155-3p gen ifadesinin sadece DFX uygulaması yapılan grupta kontrole göre 6,41±0,21 kat artışa sebep olduğu, bunu kontrole göre 5,50±0,14 kat ile PAE uygulamasının izlediği saptanmıştır ($p \leq 0,01$). DFX ile birlikte PAE uygulamasının ise her iki uygulama grubundan anlamlı düzeyde düşük olmasına rağmen, kontrole göre 2,05±0,20 kat yüksek olduğu saptanmıştır ($p \leq 0,05$). DFX+PAE grubu hem DFX grubu ile hem de PAE grubu ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur ($p \leq 0,01$).

Çizelge 4.3. miRNA-155-3p, miRNA-210-3p ve miRNA-221-3p qRT-PCR cihazında belirlenen relatif ekspresyon değerleri. Tüm veriler U6 miRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Farklı harfler, gruplar arasında anlamlı bir fark olduğunu gösterir. n=4, ortalama±standart hata (Tek yönlü ANOVA, Tukey Test, $p \leq 0,05$).

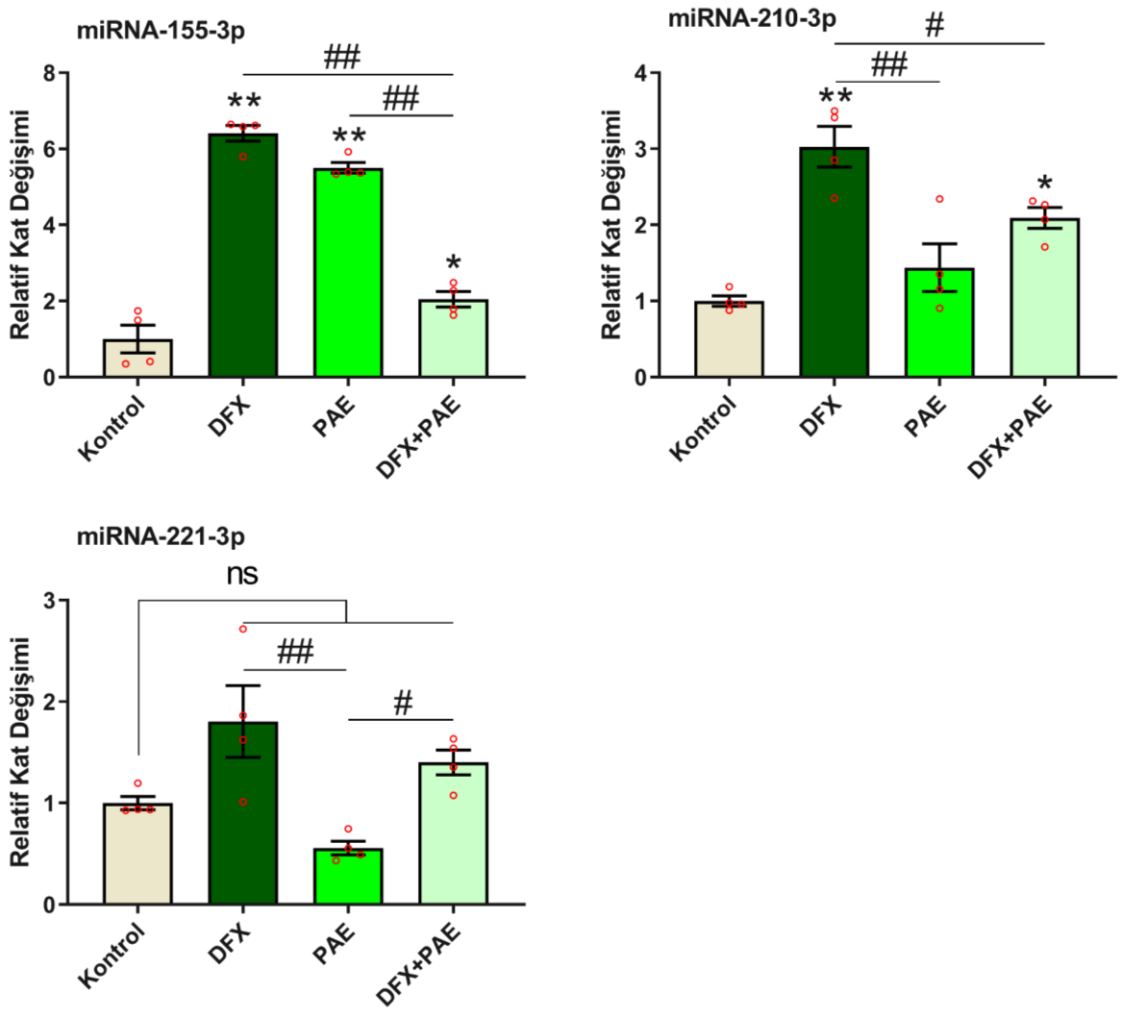
	Kontrol	DFX	PAE	DFX+PAE
miR-155-3p	$1,00\pm0,36^{a}$	$6,41\pm0,21^{c}$ ⬆	$5,50\pm0,14^{c}$ ⬆	$2,05\pm0,20^{b}$ ⬆
miR-210-3p	$1,00\pm0,07^{a}$	$3,03\pm0,27^{c}$ ⬆	$1,44\pm0,31^{ab}$ ➡	$2,09\pm0,14^{b}$ ⬆
miR-221-3p	$1,00\pm0,07^{ab}$	$1,80\pm0,35^{b}$ ➡	$0,56\pm0,07^{a}$ ➡	$1,40\pm0,12^{b}$ ➡

⬆ Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış, ➡ Kontrole göre istatistiksel fark yok

miR-210-3p gen ifadesinin sadece DFX uygulaması yapılan grupta kontrole göre 3,03±0,27 kat artış gösterirken ($p \leq 0,01$), DFX+PAE uygulaması yapılan grupta ise kontrole göre 2,09±0,27 kat artış gösterdiği belirlenmiştir ($p \leq 0,05$). DFX ile birlikte PAE uygulaması sonucunda miR-210-3p gen ifadesi sadece DFX uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermesine rağmen miRNA ekspresyonunun kontrol düzeyine gerilemediği saptanmıştır. PAE uygulamasının miR-210-3p gen ifadesinde kontrole göre anlamlı bir değişime neden olmadığı, ancak sadece DFX uygulaması yapılan gruptan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır ($p \leq 0,01$).

Çalışmamızda miR-221-3p ekspresyonunun DFX ve DFX+PAE gruplarında kontrol grubuna göre yükseldiği ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Yine PAE grubunda görülen azalma da istatistiksel olarak anlamlı

bulunmamıştır. Bununla birlikte sadece DFX uygulaması yapılan grupta miR-221-3p ekspresyonunun hem sadece PAE hem de DFX+PAE uygulaması yapılan gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0,05$).



Şekil 4.4. miRNA ekspresyonlarının relatif kat değişimi. Tüm değerler U6 miRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. *Kontrol vs. deney grupları tek yönlü ANOVA, Tukey HSD testi $p \leq 0,05$; **$p \leq 0,01$; deney grupları istatistiksel olarak farklıdır (#$p \leq 0,05$; ##$p \leq 0,01$). ns; istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur.

4.4. Western Blot Protein Analizi

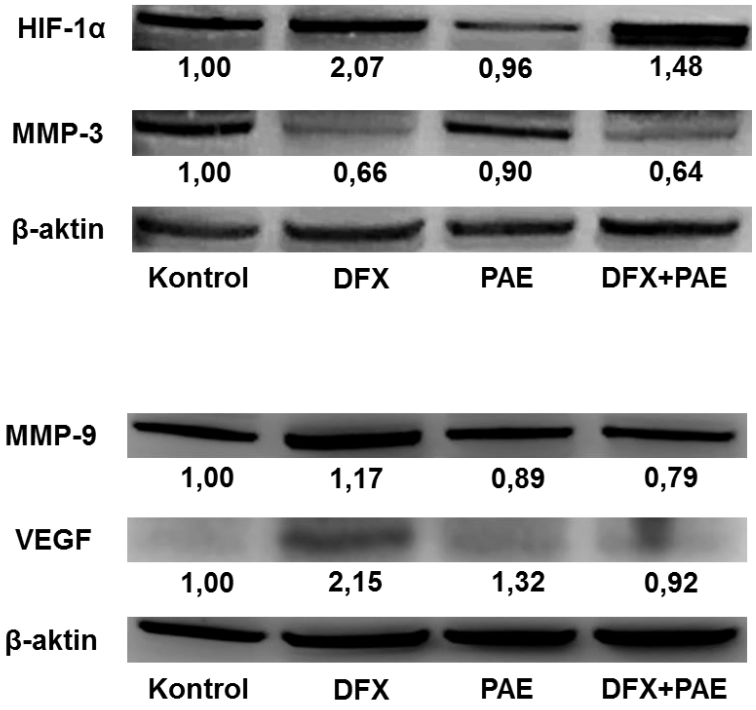
Çalışmamızda DFX, PAE ve DFX+PAE uygulaması yapılan ARPE-19 hücrelerinde HIF-1α, MMP-3, MMP-9 ve VEGF proteinlerinin ekspresyonları endojen kontrol olarak β-aktin kullanılarak western blot analizi ile belirlenmiştir (Şekil 4.5). Protein ekspresyonlarında meydana gelen değişim, kontrol grubuna göre relatif kat değişimi olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.6). Şekil 4.5'ten de görüldüğü gibi, HIF-1α

protein ifadesinin DFX ve DFX+PAE gruplarında kontrole göre sırası ile 2,07 ve 1,48 kat artış gösterdiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, PAE grubunda HIF-1α protein ifadesinin DFX ve DFX+PAE gruplarına göre daha düşük olduğu saptanmıştır.

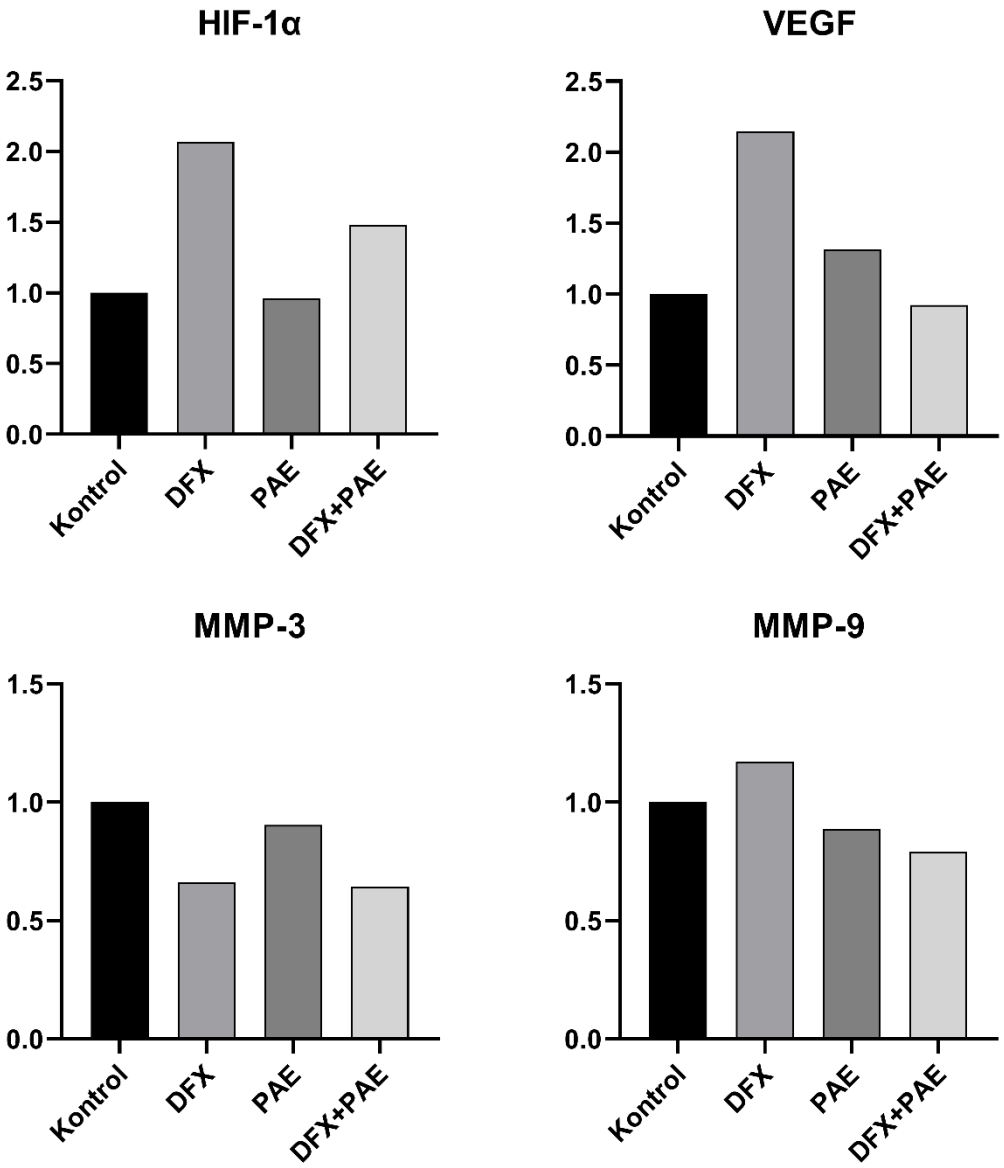
MMP-3 protein ifadesinin DFX ve DFX+PAE gruplarında kontrole göre sırası ile 0,66 ve 0,64 kat azaldığı belirlenmiştir. PAE grubunda ise protein ifadesinin kontrol ile benzer düzeylerde olduğu tespit edilmiştir.

MMP-9 protein ifadesinin DFX grubunda kontrole göre 1,17 kat artış gösterirken, PAE ve DFX+PAE gruplarında ise kontrole göre sırası ile 0,89 ve 0,79 kat azalma gösterdiği belirlenmiştir.

VEGF protein ifadesinin DFX ve PAE grubunda kontrole göre sırasıyla 2,15 ve 1,32 kat artış gösterirken, DFX+PAE grubunda kontrole göre sırası ile 0,92 kat azalma gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.5. ARPE-19 hücre hattında kontrol ve deney gruplarının HIF-1α, MMP-3, MMP-9, VEGF ve β-aktin protein bantlarının görüntüsü.



Şekil 4.6. ARPE-19 hücre hattında kontrol ve deney gruplarının HIF-1α, MMP-3, MMP-9 ve VEGF protein ekspresyon seviyelerinin relatif kat değişim grafikleri.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Hipoksi homeostazı sürdürmek için doku düzeyinde yeterli oksijenin bulunmadığı durum olarak tanımlanmaktadır. Düşük kan temini veya kanda oksijen düzeyinin düşük olması gibi koşullarda meydana gelebilir. Bazı dokular hipoksi/iskemik şartları uzun süre tolere edebildikleri halde bazıları ise düşük oksijen düzeylerinden şiddetli hasar görebilirler (Bhutta, Alghoula & Berim, 2021; Hiraga, 2018; Keuski, 2018; Watts & Walmsley, 2019).

Oksijenin hücre içi ATP seviyelerini korumada ve çok sayıda biyokimyasal reaksiyonda sensör görevi görmesi nedeni ile hipoksiye verilen yanıtlar oldukça önemlidir. Oksijen tüketen reaksiyonların örnekleri arasında aerobik solunum, yağ asidi desatürasyonu, RNA, DNA ve histon demetilasyon reaksiyonları dahil olmak üzere çeşitli metabolik reaksiyonlar yer alır. Hipoksinin vasküler yetmezlik, kan damarı hasarı ve doku ödemi nedeniyle, katı tümörlerin büyümesi de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Lee, Chandel & Simon, 2020).

Metabolik olarak en aktif dokulardan olan retina, çift kan dolaşımına bağlı olarak hızla oksijen tüketmektedir. Dolayısıyla bu oksijene duyarlı dokulardaki oksijen seviyesinin azalması ile indüklenen hipoksi, patolojik neovaskülarizasyon, diyabetik retinopati, prematüre retinopatisi, retinal ven tıkanıklığı ve yaş tip yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi çeşitli retinal hastalıklarda en sık görülen patofizyolojidir (Wangsa-Wirawan & Linsenmeier, 2003).

Oksijen seviyelerindeki değişikliklere karşı hücresel tepkilerin anlaşılmasında, HIF'lerin keşfi ve bunların üyeleri olan pVHL ve PHD'ler büyük önem taşımaktadır. Bu bulgu, oksijen seviyelerindeki değişikliklerin farklı transkripsiyonel tepkiler oluşturabileceğini moleküler boyutta göstererek kanser, kardiyovasküler hastalıklar, anemi ve bunun gibi çoğu hastalık için terapötik hedefler sağlamıştır (Lee vd., 2020).

HIF'ler, hipoksiye hücresel tepkiler için gerekli olan HIF-α ve aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokatör (ARNT; HIF-1β) alt birimlerinden oluşan heterodimerik transkripsiyon faktörleridir (Borton vd., 2018). O_2 varlığında HIF-1α ve HIF-2α hidroksillenir ve proteazomal degredasyon için hedeflenir. Hipoksik koşullar, hipoksi yanıt elemanları içeren gen promotörlerine bağlanarak ve aktive ederek O_2 homeostazının ana düzenleyicileri olarak işlev gören aktif HIF-1 veya HIF-2 oluşturmak üzere her yerde eksprese edilen HIF-1β ile dimerize olan -α alt birimlerinin hidroksilasyonunu engeller (Ramírez-Bergeron & Simon, 2001).

Anjiyogenez, önceden var olan damarlardan yeni damarların oluşumu olarak tanımlanan çok aşamalı bir süreçtir. Bu aşamalar sırasıyla; vasküler endotelyal hücrelerde anjiyogenik büyüme faktörü reseptörlerinin uyarılması, endotelyal hücre bazal membranının proteolitik yıkımı, endotelyal hücre proliferasyonu ve migrasyonu, çevreleyen ekstraselüler matriksin bozunması, damar olgunlaşması, destekleyici hücrelerin (örn. perisitler) toplanması ve son olarak yeni oluşan arteriyovenöz halkaların kapanmasıdır (Bryan & d'Amore, 2007). Tipik olarak proliferatif diyabetik retinopatide, retinal ven tıkanıklığında veya prematüre retinopatisinde görülen retinal anjiyogenez, retinal iskemi veya hipoksiye karşı anormal bir vasküler yanıtın sonucudur. Retinal anjiyogenez sırasında retinal vasküler endotel hücreleri, iç membrandan vitröze doğru çoğalmaya başlayarak zamanla vitröz kanamasına veya retina dekolmanına neden olabilirler. Retinal anjiyogenez patogenezinden sorumlu olan temel büyüme faktörleri, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), eritropoietin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), hepatosit büyüme faktörü (HGF), anjiyopoietin ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) dür (Kvanta, 2006).

Hipoksi ve iskemik durumlar, proliferatif diyabetik retinopati, prematüre retinopatisi ve neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonu dahil olmak üzere körlüğe yol açabilen çeşitli oküler neovasküler hastalıkların fizyopatolojisinde önemli bir rol

oynar (Arjamaa & Nikinmaa, 2006). VEGF, önceden var olan yeni kan damarlarının oluşumu olarak tanımlanan vasküler geçirgenlik ve neoanjiyogenezin merkezi bir destekleyicisidir (Semenza, 2011). Oküler neovasküler hastalıkların tedavisinde anti-VEGF ilaçları pegaptanib (Macugen®), bevacizumab (Avastin®), ranibizumab (Lucentis®) ve aflibercept (Eylea®) yaygın olarak kullanılmaktadır (Fogli vd., 2018; Plastino, Pesce & André, 2021). Anti-VEGF ajanlarının intravitreal enjeksiyonunun, proliferatif diyabetik retinopati ve neovasküler glokomda yeni damarların oluşmasının inhibisyonunda ve makula ödeminde vasküler geçirgenliği iyileştirmede etkili olduğu bildirilmiştir (Kimoto & Kubota, 2012). Bununla birlikte, anti-VEGF tedavilerinin, pahalı olmasının yanı sıra enfeksiyon, göz içi basıncı, vitröz kanama riski ve birden fazla intravitreal enjeksiyon gerektirmesi nedeni oküler anjiyogenez patolojilerinde yeni terapötik stratejilerin araştırılması gündeme gelmiştir (Li, Yuan, Fu, Wang & Gao, 2020; Plastino vd., 2021).

Hipoksi ve iskemi durumlarında miRNA'ların rolüne ilişkin çalışmalar, miRNA'ların anjiyogenezin düzenlenmesinde işlevsel bir rolü olduğunu göstermiştir (Chan & Loscalzo, 2010; Crosby vd., 2009; Gee vd., 2010; Madanecki vd., 2013). Özellikle, bazı anjiyogenez ile ilişkili miRNA'lar, HIF/VEGF ekseninin modülasyonunda spesifik etkileri nedeni ile hipoksimiR'ler olarak adlandırılmıştır (Plastino vd., 2021).

Son zamanlarda, doğal ürünlerden ve bitkilerden elde edilen bileşiklerin, birçok hastalığı önleme ve tedavi etme özelliklerinin keşfedilmesi ile bu bileşiklere ilgi gittikçe artmaktadır (López-Malo vd., 2020; Sulaiman, Basavarajappa & Corson, 2014). *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia lactiflora*, *Dioscorea japonica* ve *Arisaema erubescens* bitkilerinden elde edilebilen PAE'nin vasküler hücre proliferasyonu, migrasyonu ve inflamasyon üzerinde iyileştirici etkileri vardır (Adki & Kulkarni, 2020; Liu, Song, Wu, Sun & Dai, 2021; Zhang, Shi, Zhang, Jiang & Zhou, 2021). PAE'nin hipoksik şartlardaki etkilerinin belirlenmesi amacı ile yapılan bir çalışmada kronik hipoksi tarafından indüklenen pulmoner hipertansiyonda PAE'nin hem sıçan hem de farelerde sağ ventrikül fonksiyonunda, sağ ventrikül sistolik basıncında ve medial duvarların kalınlaşmasında hipoksiye bağlı artışları tersine çevirdiği bildirilmiştir. Ek olarak PAE, hipoksi ile indüklenen pulmoner arter düz kas hücrelerinin çoğalmasını iyileştirmiştir (Zhang vd., 2018). Benzer bir başka çalışmada, yetişkin erkek Sprague-Dawley sıçanlarında pulmoner arteriyel hipertansiyonda *in vivo* hipoksinin sebep olduğu mitokondriyal

hasarın PAE varlığında azaldığı ve böylece PAE'nin hipoksi altında mitokondriyal hasara aracılık etmedeki koruyucu etkisi bildirilmiştir (Wang, Du, Xu, Pan & Wang, 2019).

PAE'nin, otofajiyi azaltarak HIF-1 ile indüklenen ektopik endometriyal stromal hücrelerin migrasyonunu ve invazyonunu azalttığı, sıçanlarda da HIF-1 ile indüklenen endometriyotik lezyonu azaltarak endometriozis tedavisi için potansiyel terapötik strateji sağladığı bildirilmiştir (Pang vd., 2021).

Proliferatif diyabetik retinopati, prematüre retinopatisi ve neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi oküler neovasküler hastalıklar, dünya çapında görme bozukluğunun önde gelen nedenleridir (Arjamaa & Nikinmaa, 2006). HIF'ler ve VEGF'ler, oküler neovaskülarizasyonun anahtar moleküler göstergeleridir. Anjiyogenezin düzenleyicileri olarak işlev gören mikroRNA'lar, özellikle hipoksimiR olarak adlandırılan hipoksi ile ilişkili mikroRNA olarak açıklanmıştır. Doğrudan ve spesifik olarak HIF-1α ve VEGF mRNA'larını hedef alan, oküler neovasküler patolojilerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan hipoksimiR'ler, proliferatif diyabetik retinopati, prematüre retinopatisi ve neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonu dahil olmak üzere koroidal ve retinal anjiyogenik hastalıklarda varsayılan tanısal belirteçler ve terapötik ajanlar ile ilişkilidir (Plastino vd., 2021).

Yaptığımız tez çalışması kapsamında insan retinal pigment epitel hücrelerinde hipoksinin hücre canlılığının, hipoksi ve anjiyogenez gen ve/veya protein ekspresyonlarının, miR-155-3p, miR-210-3p ve miR-221-3p ekspresyonları üzerine etkilerinin ve hipoksik durumda PAE'nin terapötik etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmamızda ilk olarak ARPE-19 hücrelerinde hipoksi ajanı olan DFX ve PAE uygulanarak MTT testi yapılmıştır. Bu test ile hücre canlılığını DFX grubuna göre istatistiksel olarak en fazla yükselten değerin bulunması amaçlanmıştır. Çalışma sonucuna göre bu değerin uygulamanın 48. saatinde 62 µM PAE olduğu belirlenmiş ve çalışmanın devamında 48 saatlik 60 µM PAE uygulaması yapılarak devam edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, 661W retinal fotoreseptör hücre hattında, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile oluşturulan fotokimyasal hasarın PAE ile azaltıldığı bildirilmiştir. 661W hücre hattında 48 saat H_2O_2 ve farklı dozlarda PAE uygulamasından sonra, PAE uygulanan gruplar ile sadece H_2O_2 uygulanan grup karşılaştırıldığında, hücre canlılığını en belirgin şekilde arttıran PAE dozu 50 µM olarak belirlenmiştir. H_2O_2 tarafından azalan hücre

canlılığının, 661W hücrelerinde PAE uygulaması ile etkili bir şekilde arttığı açıklanmıştır (Zhang, Wu, Wu & Zhang, 2021). Bir başka çalışmada, sıçan diz eklemlerinden izole edilen kondrosit hücrelerine, 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda PAE (25, 50 ve 100 μM) ile muamele edilmiş ve hücre canlılığında, PAE'nin 100 μM'a kadar olan konsantrasyonlarında bile herhangi bir toksisiteye neden olmadığı ve kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmediği bildirilmiştir (Liu vd., 2017). Bir başka çalışmada, insan epidermal keratinosit hücre hattında (HaCaT), ultraviyole B (UVB) (125 mJ/cm^2) uygulaması yapılan hücrelere, 72 saat boyunca 1 ve 10 μg/ml konsantrasyonlarda, PAE ve *Paeonia suffruticosa* Andr. kökünden elde edilen ekstrat uygulandığında kontrol grubunda hücre canlılığının ekstrat uygulamalarından istatistiksel olarak anlamlı ölçüde etkilenmediği ve reaktif oksijen türü (ROS) oluşumunu önemli ölçüde indükleyen UVB'ye maruz kalan hücrelerde, PAE ve *Paeonia suffruticosa* Andr. kökünden elde edilen ekstrat (10 μg/ml) uygulaması ile ROS seviyesinin anlamlı şekilde azaldığı bildirilmiştir (Sun, Du, Hwang & Yi, 2018).

İnsan fetal akciğer fibroblast hücre hattı (HFL-1) üzerine *in vitro* PAE uygulamasının 400 μM konsantrasyonunda anlamlı bir sitotoksik etki oluşturmadığı gibi akciğer epitel hücrelerinin (HBEC) ve insan monositik lösemi hücre hattı (THP-1) makrofajlarının canlılığı üzerinde de sitotoksik etki oluşturmadığı bildirilmiştir (Liu vd., 2017; Liu vd., 2014; Ping vd., 2014). Öte yandan, insan normal bronşiyal epitel hücre hattında BEAS-2B (0, 10, 20, 40, 80, 100 ve 200 μg/mL) PAE ile 24 saat boyunca muamele edilerek PAE'nin 100 ve 200 μg/mL dozunun normal BEAS-2B hücrelerinde hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı bildirilmiştir (Lv vd., 2021). Çalışmamızda ARPE-19 hücrelerinde DFX ile indüklenen hipoksi grubunun hücre canlılığının 24 ve 48. saatlerde sırasıyla % 62,41±4,38 ve % 59,75±2,79 olduğu tespit edilmiştir. DFX grubuna 24 ve 48 saatlik en yüksek PAE konsantrasyonu (991 μM) uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi sırasıyla % 67,95±2,90 ve % 66,28±3,84 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). PAE'nin yüksek doz uygulaması sitotoksik etki oluşturuyor olsa dahi bizim çalışmamızda, hipoksik ARPE-19 hücreleri üzerinde tüm dozlarda hücre canlılığını arttırıcı etki yaratmıştır. Nitekim, hücre canlılığının en yüksek olduğu 48 saatlik 60 μM PAE uygulamasının toksik etkisiyle ilgili herhangi bir literatür bilgisine rastlanmamıştır.

Çalışmamızda HIF-1α, HIF-1β, VEGF, VEGFR, MMP-3 ve MMP-9 gen ifadelerinin DFX uygulaması yapılan grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olduğu, sadece PAE uygulaması yapılan grupta ise kontrole göre anlamlı bir değişim göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.3). ARPE-19 hücrelerinde uzun süreli hiperglisemi ve hipoksi patogenezi ile karakterize olan diyabetik makula ödemi modelinde, DFX ile indüklenen hipoksinin HIF-1α, HIF-1β, VEGF ve VEGFR gen ifadelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar olduğu bildirilmiştir (Doğanlar vd., 2021). Başka bir çalışmada, %1 düzeyinde oksijen ile hipoksi oluşturulan ARPE-19 hücre hattında, hipoksik grubun MMP-3 ve MMP-9 gen ifadelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışların olduğu rapor edilmiştir (Zhang vd., 2015). Yine, 24 saat boyunca %1 O_2'ye maruz kalan ARPE-19 hücrelerinde VEGF düzeyinin kontrole göre 3 kat yüksek olduğu bildirilmiştir (Arjamaa vd., 2017). Çalışma bulgularımız Arjamaa vd. (2017), Doğanlar vd. (2021) ve Zhang vd. (2015), adlı araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir. Benzer şekilde çalışmamızda da ARPE-19 hücrelerinde DFX ile indüklenen hipoksinin, VEGF ifadesinin kontrole göre anlamlı düzeyde artmasına neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.3). Bu durum, çalışmamızda uyguladığımız DFX konsantrasyonunun ve uygulama süresinin ARPE-19 hücrelerinde hipoksik ortam oluşturduğunu ve hipoksiye cevaben HIF-1α, HIF-1β, VEGF, VEGFR, MMP-3 ve MMP-9 gen ifadelerinde artışlara neden olduğunu düşündürmektedir. Nitekim Arjamaa ve ekibi de (Arjamaa vd., 2017) hipoksinin meydana gelmesinden sorumlu temel protein HIF-1α'nın VEGF ekspresyonunu doğrudan indükleyerek retinal neovaskülarizasyonu ve buna bağlı olarak diğer retinal hastalıkların gelişiminde anahtar bir faktör olabileceğini bildirmiştir. Çalışma bulgularımız DFX uygulamasının retinal pigment epitel hücrelerinde hipoksiye neden olduğunu bununla birlikte PAE'nin hipoksi indükleme etkisinin olmadığını göstermiştir (Şekil 4.3).

Yapılan bir başka çalışmada sitotoksik 3 mM metil glioksalın tek olarak uygulamasının ARPE-19 hücrelerinde canlılığı kontrole göre anlamlı düzeyde azalttığı, 10 µM PAE ile kombine uygulandığında ise hücre canlılığının tek başına uygulamaya göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu bildirilmiştir. Yine insan retinal mikrovasküler endotelyal hücrelerinde (HRMEC) ve insan retinal pigment epitel hücrelerinde (ARPE-19) PAE'nin hücre migrasyonunu, tüp oluşumunu ve hiperpermeabiliteyi azalttığı bildirilmiştir. Bu deney sonucunda, halihazırda kullanılan anti-VEGF ajanlarının

intravitreal enjeksiyonunun yanında bu ekstratların oral olarak kullanılmasının, ıslak yaşa bağlı makula dejenerasyonu olan hastalar için daha güçlü bir terapötik etki ile sonuçlanabileceğini böylelikle anti-VEGF oküler enjeksiyon sayılarında azalma sağlayabileceği bildirilmiştir (Lee vd., 2021).

Uzun süreli hipokside HIF yanıtının nasıl düzenlendiğinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, insan kolon epidermal adenokarsinom hücre hattı (Caco-2), farelerden izole edilen embriyonik fibroblastlar, insan karaciğer kanseri hücre hattı (HepG2) ve insan serviks kanseri hücre hattı (HeLa) %1 O_2 seviyesine maruz bırakılarak hipoksi indüklenmiştir. Elde edilen verilere göre, hipoksiye (0 ila 48 saat) maruz kalan Caco-2 hücreleri, farklı HIF-α alt birim ekspresyon paternleri göstermiş, hem nüklear hem de sitoplazmik HIF-1α protein seviyeleri geçici olarak artmasına rağmen, HIF-2α protein seviyelerinin sürekli bir şekilde arttığı bildirilmiştir. HIF-1α mRNA ifadelerinin, hipoksik maruziyetten bir süre sonra azaldığı, HIF-2α mRNA ifadelerinin ise değişmediği tespit edilmiştir. Uzun süreli hipoksiye maruz kalan bağırsak epitel hücrelerinin HIF-1α yanıtında artış olduğunu ve devamında bu yanıtın kısmen HIF-1α mRNA ekspresyonunun azalmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Bruning vd., 2011).

Bulgularımıza göre HIF-1α, HIF-1β, VEGF, VEGFR, MMP-3 ve MMP-9 gen ifadelerinin DFX+PAE grubunda, DFX uygulanan gruba göre anlamlı bir azalma gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3). Ek olarak, HIF-1α, MMP-3 ve MMP-9 gen ifadelerinde DFX+PAE gruplarının kontrol ile istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmaması, PAE'nin DFX'in etkisini kontrol düzeyine geri çevirdiğini göstermektedir (Şekil 4.3).

HipoksimiR'ler, anjiyogenez sinyal yolağı üzerinde önemli bir etkisi olan HIF-1α ve VEGF mRNA'larını spesifik olarak hedef alabilmektedir (Wang & Olson, 2009). Kanser ve diğer patolojilerde etkilerinin yanı sıra oküler patolojilerde anjiyogenezin düzenlenmesinde hipoksimiR'lerin önemli bir rol oynadığı ve bu nedenle, hipoksiye yanıt olarak miRNA'ların etkisinin anlaşılmasının oküler neovasküler hastalıklar için yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine yardımcı olabileceği bildirilmiştir (Plastino vd., 2021). Bu kapsamda çalışmamızda miRNA-155-3p, miRNA-210-3p ve miRNA-221-3p ekspresyonları belirlenmiştir (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.3).

Çalışma bulgularımıza göre miR-155-3p ve miR-210-3p ifadeleri, DFX grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Ancak, miR-221-3p ifadesi DFX grubunda kontrole göre anlamlı bir fark oluşturmadığı gibi PAE ve DFX+PAE gruplarında da anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.4) (Çizelge 4.3).

mRNA'yı destabilize ederek veya translasyonu baskılayarak gen ekspresyonunu düzenleyen yaklaşık 22 nükleotitten oluşan endojen küçük RNA molekülleri olan miRNA'ların, memelilerdeki tüm genlerin yaklaşık üçte birinin düzenlenmesinde görevli olduğu tahmin edilmektedir (Bruning vd., 2011; Xie vd., 2005). miRNA'ların yüzlerce farklı mRNA'yı hedefleyebildiği bilinmektedir (Griffiths-Jones, Grocock, Van Dongen, Bateman & Enright, 2006; Krek vd., 2005). Protein ekspresyonunun miRNA'lar tarafından düzenlenmesi, hematopoez, gelişim, hücre proliferasyonu, apoptoz, bağışıklık ve metabolizma dahil olmak üzere tüm fizyolojik süreçleri etkiler (Williams, 2008). Ayrıca, bazı spesifik miRNA'ların ekspresyonlarının kronik inflamasyon ve tümör gelişimi patolojileri ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Yang vd., 2017; Zhao vd., 2020). Azalmış doku perfüzyonu ve/veya artan oksijen tüketimine bağlı olarak mikroçevresel hipoksinin meydana geldiği patofizyolojik durumlarda, birçok miRNA hücre tipine/dokuya özgü bir şekilde hipoksi tarafından düzenlenmektedir. miR-210 gibi hipoksi ile indüklenen miRNA'ların apoptoz, çoğalma, hücre döngüsü, DNA onarımı, hücre göçü ve mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesinde görev aldığı bildirilmiştir (Ivan & Huang, 2014). Bununla birlikte, hücresel düzeyde hipoksi kaynaklı miRNA'ların işlevi hakkında bilgi sınırlıdır.

İntraoküler basınçtaki artış ve vasküler düzensizlik glokomun önemli iki nedeni olarak kabul edilmektedir. Bu durumlar optik sinir başının bileşenlerinde iskemi ve hipoksiye neden olarak mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif strese yol açabilirler (Kamel, Farrell & O'Brien, 2017). Primer açık açılı glokom ile ilişkili dolaşımdaki miRNA'ların tanımlanması ve bunların tanısal belirteçler olarak faydalarının belirlenmesinin amaçlandığı bir çalışmada, glokomlu bir gözün retinasında meydana gelen hipoksinin, retinal ganglion hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyonu ve oksidatif stresi arttırabilen aynı zamanda bu hücrelerin ölümüne ve retina sinir lifi tabakasının incelmesine yol açabilen hsa-miR-210-3p ekspresyonunun artmasına neden olabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre dolaşımdaki hsa-miR-210-3p'nin özellikle şiddetli glokom hastaları için potansiyel bir tanısal belirteç olabileceği rapor edilmiştir

(Liu vd., 2019). Bizim çalışmamızda da bu çalışma sonuçlarına paralel olarak miR-210-3p ifadesinin, DFX grubunda kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.4). Bu durum miR-210-3p ekspresyonunun retinal pigment epitel hücrelerinde de hipoksik şartlarda belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

HIF-1α'nın miR-27, miR-155, miR-199 ve miR-210'u yukarı regüle ettiği ve miR-221, miR-222 ve miR-320'yi aşağı regüle ettiği bildirilmiştir (Kulshreshtha vd., 2007; Shen, Li, Jia, Piazza & Xi, 2013; Yang, Wang, Xiao, Zhou & Shi, 2016). miR-155 gibi bazı mikroRNA'ların, oksijen homeostazını korumak için bir HIF-1α/miR-155 negatif geri besleme döngüsü oluşturarak HIF-1α'yı kontrol edebildiği rapor edilmiştir (Bruning vd., 2011). HIF-1α'nın bağırsak epitel hücrelerinde hipoksi ile indüklenebilir bir miRNA olan miR-155'in doğrudan hedefi olduğu, buna ilaveten HIF-1α'ya bağlı sinyalizasyonun miR-155 tarafından azaltıldığı ve HIF-1α'nın, hipokside miR-155 indüksiyonundan birincil olarak sorumlu olan transkripsiyon faktörü olduğu rapor edilmiştir (Yang vd., 2016). Çalışmamızda da DFX uygulaması ile hem HIF-1α hem de miR-155-3p ifadesinde artış meydana gelmesi önceki çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Öte yandan, PAE uygulanan grupta HIF-1α ifadesi kontrol grubuna göre (Şekil 4.3) değişim göstermediği halde miR-155-3p ifadesinde (Şekil 4.4) DFX grubuna benzer şekilde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu da PAE'nin miR-155-3p ifadesini farklı sinyal yolakları aracılığıyla da indükleyebileceğini düşündürmüştür. Nitekim, miR-155-3p'nin DFX+PAE grubunda DFX grubuna göre etkin şekilde PAE aracılığıyla inhibe edildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).

miR-155'in fare oksijen kaynaklı retinopati (Liu, Wang, Sun, SanGiovanni & Chen, 2016; Yan vd., 2015), sıçan ışık kaynaklı retinal dejenerasyon (Pilakka-Kanthikeel vd., 2015) ve streptozosin kaynaklı diyabet (Kovacs, Lumayag, Cowan & Xu, 2011) gibi birçok oküler hastalık modelinde ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu hastalığı (Lukiw, Surjyadipta, Dua & Alexandrov, 2012) olan insanların retinalarında önemli düzeyde artış gösterdiği bildirilmiştir (Liu, Huang, Britton & Chen, 2020). miR-155'in HIF bağımlı bir miRNA olduğu ve eksikliğinin fare oksijen kaynaklı retinopati modelinde avasküler alanda ve neovaskülarizasyonda azalmaya neden olduğu da rapor edilmiştir (Yan vd., 2015; Zhuang vd., 2015). Buna ilaveten miR-155'in hipoksik Caco2 hücrelerinde artış gösterdiği ve HIF-1α'nın bu mikroRNA'nın potansiyel hedefi olduğu da bildirilmiştir. Bununla birlikte miR-155 transfeksiyonunun hipoksi ile indüklenen HIF aktivitesinin

azalmasına neden olduğu da rapor edilmiştir (Bruning vd., 2011). Bu durum miR-155 ile HIF-1α'nın negatif kontrol mekanizmasına sahip olduğunu göstermekle birlikte konu ile ilgili farklı literatür verilerinin olması miR-155'in retinal anjiyogenezdeki rolünün belirsiz olduğunu düşündürmektedir (Zhuang vd., 2015). Bizim çalışmamızda hipoksi ile miR-155 ve HIF-1α gen ifadesinde paralel bir artışın olduğu her iki molekülün ifadesinin de hipoksi ile indüklendiğini göstermektedir. Buna ilaveten miR-155'in ifadesinde meydana gelen artışın HIF'in baskılanması için olduğu düşünülmektedir. Ancak miR-155'in hipoksik şartlardaki etkilerinin doku ve hücre tipine bağlı olarak değiştiği de bildirilmiştir (Bruning vd., 2011). Nitekim Lei vd. (2009), hipoksi şartları altında miR-155 ifadesinin değişmediğini bildirmişlerdir (Lei vd., 2009). Bu durumun nedeninin hipoksi süresi ve hipoksinin derecesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Bruning vd., 2011).

Endotel hücrelerinde miR-221-3p'nin rolünü araştırmak için yapılan bir çalışmada, kalp yetmezliği modeli oluşturulan farelerin kalp dokularında miR-221-3p ifadesinde artış olduğu bildirilmiştir. Buna bağlı olarak, miR-221-3p'nin aşırı ekspresyonunun, *in vitro* endotelyal hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve tüp oluşumunu inhibe ettiği ve miR-221-3p'nin HIF-1α'yı hedefleyerek endotel hücrelerinde anjiyogenezi engellediği rapor edilmiştir. Ayrıca, miR-221-3p'nin endotel hücreleri üzerindeki olumsuz etkilerinin, HIF-1α'nın yeniden ifadesi ile azaltıldığı bildirilmiştir (Li, Yan, Fan, Hou & Han, 2021). Çalışma sonuçlarımıza göre HIF-1α gen ifadesi DFX grubunda kontrole göre anlamlı şekilde artış göstermişken (Şekil 4.3), miR-221-3p ifadesinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir (Şekil 4.4). Ayrıca uzun süreli hipoksi maruziyetinde HIF-1α'nın ifadesinin azaldığı bildirilmiştir (Bruning vd., 2011). Bu durum, miR-221-3p'nin kronik hipoksi ile indüklenebileceğini de düşündürmektedir. Ancak PAE uygulanan grupta DFX grubuna göre anlamlı şekilde azalma görülen miR-221-3p'nin ifadesi, DFX+PAE grubunda PAE grubuyla kıyaslandığında anlamlı şekilde artmıştır (Şekil 4.4). Ek olarak, DFX grubuna PAE uygulamasının Şekil 4.4'te de belirtildiği üzere miR-221-3p ifadesini azalma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, kronik hipokside PAE'nin miR-221-3p ifadesini etkili şekilde inhibe edeceği düşünülmektedir.

Tez kapsamında miR-155-3p ve miR-210-3p ifadelerinin DFX+PAE grubunda DFX grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Ancak, her

iki miRNA için bu azalma oranı kontrol düzeyine gerilememiş ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (Şekil 4.4). Buna istinaden literatürde bildirildiği üzere hipoksiyi indükleyen bu miRNA'ların ifadelerinin, PAE aracılığıyla inhibe edildiği belirlenmiştir. Ek olarak, HIF-1α, VEGF gibi hipoksik faktörlerin ifadelerinin de azalması bunu kanıtlar niteliktedir (Şekil 4.4). miR-221-3p ifadesinin ise kontrol grubuna göre deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ya da azalışa sebep olmadığı belirlenmiştir. Ek olarak, miR-155-3p ve miR-210-3p ifadelerinin DFX gruplarına göre DFX+PAE grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiş olsa da bu durum miR-221-3p ifadesinde tespit edilmemiştir. miR-221-3p ifadesinde anlamlı bir fark tespit edilebilmesi için hücrelerin daha uzun süreli hipoksiye maruz kalması gerektiği düşünülmüştür.

Çalışmamızda western blot analiziyle HIF-1α, MMP-3, MMP-9 ve VEGF proteinlerinin ekspresyonları belirlenmiştir. DFX grubunda HIF-1α, VEGF ve MMP-9 protein ifadeleri, kontrole göre sırasıyla 2,07 kat, 2,15 kat ve 1,17 kat artış gösterirken, MMP-3 protein ifadesinde 0,66 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.5) (Şekil 4.6). Yapılan bir çalışmada, deneysel diyabetik retinopatide zamana bağlı olarak Sprague-Dawley sıçanlarında intraperitoneal streptozosin enjeksiyonu ile diyabet oluşturulmuştur. HIF-1α ve VEGF ekspresyonu diyabet başlangıcından 15 gün, 1, 2, 4 ve 6 ay sonra western blot analizi ile incelendiğinde, diyabetik sıçan retinalarında diyabetin ilerlemesi ile normal kontrol retinalarındaki ekspresyona göre yukarı regüle edildiği bildirilmiştir. Çalışmamız ile paralel şekilde hipoksinin, HIF-1α ve VEGF protein ekspresyonlarında anlamlı bir artışa sebep olduğu bildirilmiştir (Gu vd., 2019).

Prematüre retinopatisi olan erken doğmuş bebeklerin vitröz ve gözyaşı matriks metalloproteinazların aktivitesinde, prematüre retinopatisi olmayanlara göre, VEGF ve MMP (MMP-2, MMP-9) ekspresyonlarında anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, prematüre bebeklerin gözyaşında MMP ekspresyon düzeylerinin hastalık şiddeti ile büyük oranda ilişkili olduğu açıklanmıştır. MMP aktivitesinin inhibisyonunun, hipoksi maruziyetinde diğer anahtar sinyal moleküllerinin ifadesini değiştirdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma ile hipoksi altında MMP'lerin artan aktivitesinin anjiyogenezi indükleyerek prematüre retinopatisi gelişmesine neden olduğu bildirilmiştir (Patnaik vd., 2021). Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak, DFX grubunda MMP-9 protein ifadesinin kontrole göre 1,17 kat arttığı belirlenmiştir. Ek olarak, DFX grubuna PAE uygulanması

neticesinde kontrole göre MMP-9 protein ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Bu sonuç, PAE'nin MMP-9 ekspresyonunu anlamlı şekilde inhibe ettiğini düşündürmüştür (Şekil 4.5). Öte yandan, hipoksinin bağırsak mukozasında fibrotik gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya göre, farelerde dekstran sodyum sülfat ile indüklenen kolit modelinde hipoksinin farelerin kolonunda MMP-3 ve MMP-9 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Simmen vd., 2021). Çalışmamızda HIF-1α'nın aşağı akış hedef geni olan MMP-9 ifadesinin kontrole göre arttığı göz önüne alındığında birbirine zıt iki durumun hipoksi uygulamasının süresi, incelenen hücrelerin farklılığı veya oluşturulan hastalık modelleri ile ilgili olabileceği düşünülmüştür (Li & Zheng, 2017). Nitekim, Bruning vd. (2011), HIF-1α mRNA ifadelerinin, hipoksik maruziyetten bir süre sonra azaldığını bildirmişlerdir (Bruning vd., 2011). MMP-3'ün ekstrasellüler matriks proteinlerini parçalama özelliğinin yanı sıra, MMP-1, MMP-7, MMP-9 ve MMP-13 gibi diğer MMP'leri de aktive edebildiği bilinmektedir (Ogata vd., 1992; Simmen vd., 2021). Buna göre DFX grubunda kontrole göre birçok anjiyogenez faktörünün indüklenmesini sağlayan MMP-3'ün protein ekspresyonun sonuçlarımız ile uyumlu şekilde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.5) (Simmen vd., 2021). Nitekim, PAE uygulanan grupta da kontrole göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Dolayısıyla, PAE'nin MMP-3 ekspresyonu üzerinde doğrudan bir etkisi olduğu düşünülmemektedir (Şekil 4.6).

Çalışmamızda, DFX+PAE grubunda DFX grubuna kıyasla HIF-1α, VEGF ve MMP-9 protein ifadelerinin azalma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Hatta DFX grubunun DFX+PAE grubuna kıyasla 2,34 kat ile en fazla azalma VEGF protein ifadesinde belirlenmiş, bunu takiben 1,48 kat azalma da MMP-9 protein ifadesinde tespit edilmiştir. Benzer şekilde HIF-1α protein ifadesinde de DFX+PAE grubunda DFX grubuna göre 1,40 kat azalma meydana gelmiştir. Öte yandan, MMP-3 protein ifadesinde de azalma eğilimi olsa da diğer protein ifadelerindeki gibi anlamlı bir azalma görülmemiştir (Şekil 4.5). Bu durumda PAE'nin, HIF-1α protein ifadesi hariç DFX uygulanan grupta artış gösteren diğer protein ifadelerindeki relatif kat değişimlerini, kontrol seviyesine geri döndürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

Tez kapsamında elde edilen verilere göre PAE'nin, hipoksiye maruz kalan ARPE-19 hücrelerinde hipoksiyi ve anjiyogenezi baskıladığı düşünülmektedir. Bulgularımıza göre PAE'nin körlüğe yol açabilecek birçok göz hastalığının temel sebebi olarak

bildirilen hipoksi ve buna bağlı olarak gelişen anjiyogenezin neden olduğu çeşitli komplikasyonların etkisini azaltabileceği ve bu komplikasyonlarda belirlenen hedef miRNA'ların ifadelerine bağlı olarak farklı uygulamalarla terapötik çalışmalara yeni bir yaklaşım getirebileceği ve daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir.

SONUÇLAR

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Anti-anjiyogenik, antioksidan, nöroprotektif, kardiyoprotektif olmak üzere pek çok faydalı etkisinin olduğu bildirilen PAE'nin hipoksi ile indüklenen ARPE-19 hücreleri üzerinde anjiyogenez ve hipoksi yolağı faktörlerine ve bu yolaklar üzerinde başlıca etkili miR-155, miR-210 ve miR-221 ekspresyonlarına etkisinin araştırıldığı bu çalışma sonucunda;

1. Kimyasal hipoksi ajanı DFX uygulamasının ARPE-19 hücre canlılığında azalmaya neden olarak hipoksi ve anjiyogenezi tetiklediği belirlenmiştir.
2. DFX uygulamasını takiben PAE uygulamasının azalan hücre canlılığında anlamlı artışa neden olduğu belirlenmiştir.
3. Uygulanan PAE dozunun ve süresinin normal ARPE-19 hücrelerinde herhangi bir toksik etki yaratmadığı, hipoksi veya anjiyogenezi tetiklemediği belirlenmiştir.
4. Yapılan qRT-PCR analizi neticesinde, PAE'nin hipoksi ve anjiyogenez yolak gen ve/veya proteinlerinin ekspresyonlarını baskıladığı ve miRNA ekspresyonlarının da bu mRNA seviyeleri ile uyumlu şekilde değişim gösterdiği saptanmıştır.

KAYNAKLAR

Adki, K. M., & Kulkarni, Y. A. (2020). Chemistry, pharmacokinetics, pharmacology and recent novel drug delivery systems of paeonol. *Life Sciences*, 117544.

Aki, D., Li, Q., Li, H., Liu, Y.-C., & Lee, J. H. (2019). Immune regulation by protein ubiquitination: roles of the E3 ligases VHL and Itch. *Protein & cell, 10*(6), 395-404.

Ames III, A. (1992). Energy requirements of CNS cells as related to their function and to their vulnerability to ischemia: a commentary based on studies on retina. *Canadian journal of physiology and pharmacology, 70*(S1), S158-S164.

Anderson, B., & Saltzman, H. A. (1964). Retinal oxygen utilization measured by hyperbaric blackout. *Archives of ophthalmology, 72*(6), 792-795.

Arjamaa, O., Aaltonen, V., Piippo, N., Csont, T., Petrovski, G., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. (2017). Hypoxia and inflammation in the release of VEGF and interleukins from human retinal pigment epithelial cells. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 255*(9), 1757-1762.

Arjamaa, O., & Nikinmaa, M. (2006). Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Experimental eye research, 83*(3), 473-483.

Arjamaa, O., Nikinmaa, M., Salminen, A., & Kaarniranta, K. (2009). Regulatory role of HIF-1α in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Ageing research reviews, 8*(4), 349-358.

Arza, B., Hoylaerts, M. F., Félez, J., Collen, D., & Lijnen, H. R. (2000). Prostromelysin-1 (proMMP-3) stimulates plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *European journal of biochemistry, 267*(21), 6378-6384.

ATCC. (2016). ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™). 19 Mayıs 2021 tarihinde https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2302.aspx adresinden erişildi.

Atkinson, J. J., & Senior, R. M. (2003). Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *American journal of respiratory cell and molecular biology, 28*(1), 12-24.

Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell, 136*(2), 215-233.

Bavelloni, A., Ramazzotti, G., Poli, A., Piazzi, M., Focaccia, E., Blalock, W., & Faenza, I. (2017). MiRNA-210: a current overview. *Anticancer research, 37*(12), 6511-6521.

Beck, H., & Plate, K. H. (2009). Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta neuropathologica, 117*(5), 481-496.

Berezikov, E., Guryev, V., van de Belt, J., Wienholds, E., Plasterk, R. H., & Cuppen, E. (2005). Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell, 120*(1), 21-24.

Bertout, J. A., Patel, S. A., & Simon, M. C. (2008). The impact of O 2 availability on human cancer. *Nature Reviews Cancer, 8*(12), 967-975.

Bhela, S., Mulik, S., Gimenez, F., Reddy, P. B., Richardson, R. L., Varanasi, S. K., . . . Rouse, B. T. (2015). Role of miR-155 in the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *The American journal of pathology, 185*(4), 1073-1084.

Bhutta, B. S., Alghoula, F., & Berim, I. (2021). Hypoxia. *StatPearls [Internet]*.

Borton, A. H., Benson, B. L., Neilson, L. E., Saunders, A., Alaiti, M. A., Huang, A. Y., . . . Ramirez-Bergeron, D. L. (2018). Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in vascular smooth muscle cells is required for optimal peripheral perfusion recovery. *Journal of the American Heart Association, 7*(11), e009205.

Boulton, M., & Dayhaw-Barker, P. (2001). The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye, 15*(3), 384-389.

Bracha, P., Moore, N. A., Ciulla, T. A., WuDunn, D., & Cantor, L. B. (2018). The acute and chronic effects of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor injections on intraocular pressure: A review. *Survey of ophthalmology, 63*(3), 281-295.

Brinckerhoff, C. (1992). Regulation of metalloproteinase gene expression: implications for osteoarthritis. *Critical reviews in eukaryotic gene expression, 2*(2), 145-164.

Bruick, R. K., & McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science, 294*(5545), 1337-1340.

Bruning, U., Cerone, L., Neufeld, Z., Fitzpatrick, S. F., Cheong, A., Scholz, C. C., . . . Cummins, E. P. (2011). MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1α activity during prolonged hypoxia. *Molecular and Cellular Biology, 31*(19), 4087-4096.

Bryan, B., & d'Amore, P. (2007). What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences, 64*(16), 2053-2065.

Burke, J. M., Kaczara, P., Skumatz, C. M., Zareba, M., Raciti, M. W., & Sarna, T. (2011). Dynamic analyses reveal cytoprotection by RPE melanosomes against non-photic stress. *Molecular vision, 17*, 2864.

Cammalleri, M., Dal Monte, M., Pavone, V., De Rosa, M., Rusciano, D., & Bagnoli, P. (2019). The uPAR system as a potential therapeutic target in the diseased eye. *Cells, 8*(8), 925.

Camps, C., Buffa, F. M., Colella, S., Moore, J., Sotiriou, C., Sheldon, H., . . . Ragoussis, J. (2008). hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clinical cancer research, 14*(5), 1340-1348.

Caprioli, J., & Coleman, A. L. (2010). Blood pressure, perfusion pressure, and glaucoma. *American journal of ophthalmology, 149*(5), 704-712.

Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature, 438*(7070), 932-936.

Carreau, A., Hafny-Rahbi, B. E., Matejuk, A., Grillon, C., & Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of cellular and molecular medicine, 15*(6), 1239-1253.

Casson, R. J., Chidlow, G., Wood, J. P., Crowston, J. G., & Goldberg, I. (2012). Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts. *Clinical & experimental ophthalmology, 40*(4), 341-349.

Chan, S. Y., & Loscalzo, J. (2010). MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell cycle, 9*(6), 1072-1083.

Chen, P.-S., Chiu, W.-T., Hsu, P.-L., Lin, S.-C., Peng, I.-C., Wang, C.-Y., & Tsai, S.-J. (2020). Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases. *Journal of biomedical science, 27*, 1-19.

Chin, J. R., Murphy, G., & Werb, Z. (1985). Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. *Journal of Biological Chemistry, 260*(22), 12367-12376.

Chistiakov, D. A., Sobenin, I. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2015). Human miR-221/222 in physiological and atherosclerotic vascular remodeling. *BioMed research international, 2015*.

Chu, K., Chen, L., Xu, W., Li, H., Zhang, Y., Xie, W., & Zheng, J. (2013). Preparation of a paeonol-containing temperature-sensitive in situ gel and its preliminary efficacy on allergic rhinitis. *International journal of molecular sciences, 14*(3), 6499-6515.

Chunhu, Z., Suiyu, H., Meiqun, C., Guilin, X., & Yunhui, L. (2008). Antiproliferative and apoptotic effects of paeonol on human hepatocellular carcinoma cells. *Anti-cancer drugs, 19*(4), 401-409.

Clardy, J., & Walsh, C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature, 432*(7019), 829-837.

Clinic, M. (2015). Inner eye. 22 Mayıs 2020 tarihinde https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/dry-macular-degeneration/multimedia/parts-of-the-eye/img-20008502 adresinden erişildi.

Cohen, L. (1965). Relationships between visual function and metabolism. *Biochemistry of the Eye*, 36-50.

Costa, V. P., Harris, A., Anderson, D., Stodtmeister, R., Cremasco, F., Kergoat, H., . . . Lanzl, I. (2014). Ocular perfusion pressure in glaucoma. *Acta ophthalmologica, 92*(4), e252-e266.

Crosby, M. E., Glazer, P. M., & Ivan, M. (2009). "Micro"-management of DNA repair genes by hypoxia. In: Taylor & Francis.

Cusumano, P., Biscontin, A., Sandrelli, F., Mazzotta, G. M., Tregnago, C., De Pitta, C., & Costa, R. (2018). Modulation of miR-210 alters phasing of circadian locomotor activity and impairs projections of PDF clock neurons in Drosophila melanogaster. *PLoS genetics, 14*(7), e1007500.

Cuzner, M., & Opdenakker, G. (1999). Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *Journal of neuroimmunology, 94*(1-2), 1-14.

D'Amico, A. G., Maugeri, G., Rasà, D. M., La Cognata, V., Saccone, S., Federico, C., . . . D'Agata, V. (2018). NAP counteracts hyperglycemia/hypoxia induced retinal pigment epithelial barrier breakdown through modulation of HIFs and VEGF expression. *Journal of cellular physiology, 233*(2), 1120-1128.

De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B. W., Cantelmo, A. R., . . . Eelen, G. (2013). Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell, 154*(3), 651-663.

De Palma, M., Biziato, D., & Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer, 17*(8), 457.

De Spiegelaere, W., Casteleyn, C., Van den Broeck, W., Plendl, J., Bahramsoltani, M., Simoens, P.,Cornillie, P. (2012). Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis. *Journal of vascular research, 49*(5), 390-404.

De Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., & Williams, L. T. (1992). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science, 255*(5047), 989-991.

Delaey, C., & Van de Voorde, J. (2000). Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation. *Ophthalmic research, 32*(6), 249-256.

Delany, A. M., & Brinckerhoff, C. E. (1992). Post-Transcriptional regulationa of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth factor and dexamethasone in cultured human fibroblasts. *Journal of cellular biochemistry, 50*(4), 400-410.

DeNiro, M., Alsmadi, O., & Al-Mohanna, F. (2009). Modulating the hypoxia-inducible factor signaling pathway as a therapeutic modality to regulate retinal angiogenesis. *Experimental eye research, 89*(5), 700-717.

Devarajan, P., Johnston, J., Ginsberg, S., Van Wart, H., & Berliner, N. (1992). Structure and expression of neutrophil gelatinase cDNA. Identity with type IV collagenase from HT1080 cells. *Journal of Biological Chemistry, 267*(35), 25228-25232.

Devlin, C., Greco, S., Martelli, F., & Ivan, M. (2011). miR-210: More than a silent player in hypoxia. *IUBMB life, 63*(2), 94-100.

Doğanlar, Z. B., Doğanlar, O., Kurtdere, K., Güçlü, H., Chasan, T., & Turgut, E. (2021). Melatonin prevents blood-retinal barrier breakdown and mitochondrial dysfunction in high glucose and hypoxia-induced in vitro diabetic macular edema model. *Toxicology in Vitro, 75*, 105191.

Emonard, H., & Grimaud, J.-A. (1990). Matrix metalloproteinases. A review. *Cellular and molecular biology, 36*(2), 131-153.

Fabian, Z. (2018). The Signaling Nature of Cellular Metabolism: The Hypoxia Signaling. In *Cell Signalling-Thermodynamics and Molecular Control*: IntechOpen.

Fallah, A., Sadeghinia, A., Kahroba, H., Samadi, A., Heidari, H. R., Bradaran, B., . . . Molavi, O. (2019). Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 110*, 775-785.

Fang, J., Shing, Y., Wiederschain, D., Yan, L., Butterfield, C., Jackson, G., . . . Moses, M. A. (2000). Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 97*(8), 3884-3889.

Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., Martelli, F. (2008). MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *Journal of Biological Chemistry, 283*(23), 15878-15883.

Ferrara, N., & Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews, 18*(1), 4-25.

Ferrara, N., & Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature, 438*(7070), 967-974.

Fogli, S., Del Re, M., Rofi, E., Posarelli, C., Figus, M., & Danesi, R. (2018). Clinical pharmacology of intravitreal anti-VEGF drugs. *Eye, 32*(6), 1010-1020.

Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature reviews Drug discovery, 6*(4), 273-286.

Formstone, C., Byrd, P., Ambrose, H., Riley, J., Hernandez, D., McConville, C., & Taylor, A. (1993). The order and orientation of a cluster of metalloproteinase genes, stromelysin 2, collagenase, and stromelysin, together with D11S385, on chromosome 11q22-q23. *Genomics, 16*(1), 289-291.

Gee, H. E., Camps, C., Buffa, F. M., Patiar, S., Winter, S. C., Betts, G., . . . West, C. M. (2010). hsa-miR-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer. *Cancer, 116*(9), 2148-2158.

Gibson, J., Cossins, A., & Ellory, J. (2000). Oxygen-sensitive membrane transporters in vertebrate red cells. *Journal of Experimental Biology, 203*(9), 1395-1407.

Goldberg, G. I., Strongin, A., Collier, I., Genrich, L., & Marmer, B. (1992). Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *Journal of Biological Chemistry, 267*(7), 4583-4591.

Goradel, N. H., Mohammadi, N., Haghi-Aminjan, H., Farhood, B., Negahdari, B., & Sahebkar, A. (2019). Regulation of tumor angiogenesis by microRNAs: State of the art. *Journal of cellular physiology, 234*(2), 1099-1110.

Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R. H., Kvietikova, I., Toftgård, R., Tora, L., . . . Poellinger, L. (1996). Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Molecular and Cellular Biology, 16*(10), 5221-5231.

Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Bateman, A., & Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research, 34*(suppl_1), D140-D144.

Gu, L., Xu, H., Zhang, C., Yang, Q., Zhang, L., & Zhang, J. (2019). Time-dependent changes in hypoxia-and gliosis-related factors in experimental diabetic retinopathy. *Eye, 33*(4), 600-609.

Guillemin, K., & Krasnow, M. A. (1997). The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell, 89*(1), 9-12.

Gulei, D., Raduly, L., Broseghini, E., Ferracin, M., & Berindan-Neagoe, I. (2019). The extensive role of miR-155 in malignant and non-malignant diseases. *Molecular aspects of medicine, 70*, 33-56.

Gundersen, D., Orlowski, J., & Rodriguez-Boulan, E. (1991). Apical polarity of Na, K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *The Journal of cell biology, 112*(5), 863-872.

Gupta, A., Sugadev, R., Sharma, Y., Ahmad, Y., & Khurana, P. (2018). Role of miRNAs in hypoxia-related disorders. *Journal of biosciences, 43*(4), 739-749.

Güçlü, H., Doganlar, Z. B., Gürlü, V. P., Özal, A., Dogan, A., Turhan, M. A., & Doganlar, O. (2018). Effects of cisplatin-5-fluorouracil combination therapy on oxidative stress, DNA damage, mitochondrial apoptosis, and death receptor signalling in retinal pigment epithelium cells. *Cutaneous and Ocular Toxicology, 37*(3), 291-304.

Haider, H. K., Akbar, S. A., & Ashraf, M. (2009). Angiomyogenesis for myocardial repair. *Antioxidants & redox signaling, 11*(8), 1929-1944.

Harada, M., & Yamashita, A. (1969). Pharmacological studies on the root bark of Paeonia moutan. I. Central effects of paeonol. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 89*(9), 1205.

Harris, A., Ciulla, T. A., Chung, H. S., & Martin, B. (1998). Regulation of retinal and optic nerve blood flow. *Archives of ophthalmology*, *116*(11), 1491-1495.

Hegasy, G. (2019). Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019: How Cells Sense and Adapt to Oxygen Availability. 22 Mayıs 2020 tarihinde https://en.wikipedia.org/wiki/Hypoxia-inducible_factor#/media/File:HIF_Nobel_Prize_Physiology_Medicine_2019_Hegasy_ENG.png adresinden erişildi.

Henkind, P., Hansen, R. I., & Szalay, J. (1979). Ocular circulation. *Physiology of the human eye and visual system*, 98-155.

Hewitson, K. S., & Schofield, C. J. (2004). The HIF pathway as a therapeutic target. *Drug discovery today*, *9*(16), 704-711.

Hillen, F., & Griffioen, A. W. (2007). Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews*, *26*(3-4), 489-502.

Hiraga, T. (2018). Hypoxic microenvironment and metastatic bone disease. *International journal of molecular sciences*, *19*(11), 3523.

Hirsilä, M., Koivunen, P., Günzler, V., Kivirikko, K. I., & Myllyharju, J. (2003). Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(33), 30772-30780.

Hofer, E., & Schweighofer, B. (2007). Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. *Thrombosis and haemostasis*, *97*(03), 355-363.

Hoffman, E. C., Reyes, H., Chu, F.-F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A., & Hankinson, O. (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*, *252*(5008), 954-958.

Hooten, N. N., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., Ejiogu, N., Zonderman, A. B., & Evans, M. K. (2010). microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PloS one*, *5*(5).

Hu, Y.-W., Jiang, J.-J., Wang, R.-Y., & Tu, G.-J. (2016). MicroRNA-210 promotes sensory axon regeneration of adult mice in vivo and in vitro. *Neuroscience letters*, *622*, 61-66.

Huang, X., Ding, L., Bennewith, K. L., Tong, R. T., Welford, S. M., Ang, K. K., Giaccia, A. J. (2009). Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Molecular cell*, *35*(6), 856-867.

Huang, X., Le, Q.-T., & Giaccia, A. J. (2010). MiR-210–micromanager of the hypoxia pathway. *Trends in molecular medicine*, *16*(5), 230-237.

Iida, K., Okimura, Y., Takahashi, K., Inomata, S., Iguchi, G., Kaji, H., & Chihara, K. (2004). A variety of phenotype with R161Q germline mutation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in Japanese kindred. *International journal of molecular medicine*, *13*(3), 401-404.

Ivan, M., & Huang, X. (2014). miR-210: fine-tuning the hypoxic response. *Tumor Microenvironment and Cellular Stress*, 205-227.

Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y.-M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Schofield, C. J. (2001). Targeting of HIF-α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, *292*(5516), 468-472.

Jain, S., Maltepe, E., Lu, M. M., Simon, C., & Bradfield, C. A. (1998). Expression of ARNT, ARNT2, HIF1α, HIF2α and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mechanisms of development*, *73*(1), 117-123.

Jiang, B.-H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., & Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry, 271*(30), 17771-17778.

Johnson, J. L., Jackson, C. L., Angelini, G. D., & George, S. J. (1998). Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 18*(11), 1707-1715.

Kamel, K., Farrell, M., & O'Brien, C. (2017). Mitochondrial dysfunction in ocular disease: focus on glaucoma. *Mitochondrion, 35*, 44-53.

Keuski, B. M. (2018). Updates in diving medicine: evidence published in 2017-2018. *Undersea & hyperbaric medicine: journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc, 45*, 511-520.

Kim, E. M., & Hwang, O. (2011). Role of matrix metalloproteinase-3 in neurodegeneration. *Journal of neurochemistry, 116*(1), 22-32.

Kim, S.-A., Lee, H.-J., Ahn, K. S., Lee, H.-J., Lee, E.-O., Ahn, K.-S., . . . Baek, N. (2009). Paeonol exerts anti-angiogenic and anti-metastatic activities through downmodulation of Akt activation and inactivation of matrix metalloproteinases. *Biological and Pharmaceutical Bulletin, 32*(7), 1142-1147.

Kim, S. H., Kim, S.-A., Park, M.-K., Kim, S.-H., Park, Y.-D., Na, H.-J., Ahn, K. S. (2004). Paeonol inhibits anaphylactic reaction by regulating histamine and TNF-α. *International Immunopharmacology, 4*(2), 279-287.

Kim, W. Y., & Kaelin, W. G. (2004). Role of VHL gene mutation in human cancer. *Journal of clinical oncology, 22*(24), 4991-5004.

Kimoto, K., & Kubota, T. (2012). Anti-VEGF agents for ocular angiogenesis and vascular permeability. *Journal of ophthalmology, 2012*.

Kit, C. P. A. CyQUANT™ MTT Cell Proliferation Assay Kit.

Knäuper, V., Wilhelm, S., Seperack, P., DeClerck, Y., Langley, K., Osthues, A., & Tschesche, H. (1993). Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin. *Biochemical Journal, 295*(2), 581-586.

Kovacs, B., Lumayag, S., Cowan, C., & Xu, S. (2011). MicroRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Investigative ophthalmology & visual science, 52*(7), 4402-4409.

Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., . . . Stoffel, M. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nature genetics, 37*(5), 495-500.

Krock, B. L., Skuli, N., & Simon, M. C. (2011). Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes & cancer, 2*(12), 1117-1133.

Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., & Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature, 438*(7068), 685-689.

Kuehbacher, A., Urbich, C., & Dimmeler, S. (2008). Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. *Trends in pharmacological sciences, 29*(1), 12-15.

Kuijper, S., Turner, C. J., & Adams, R. H. (2007). Regulation of angiogenesis by Eph–ephrin interactions. *Trends in cardiovascular medicine, 17*(5), 145-151.

Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S. E., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F. J., Negrini, M. (2007). A microRNA signature of hypoxia. *Molecular and Cellular Biology, 27*(5), 1859-1867.

Kurihara, T. (2018). Roles of hypoxia response in retinal development and pathophysiology. *The Keio journal of medicine, 67*(1), 1-9.

Kuznetsova, A. V., Kurinov, A. M., & Aleksandrova, M. A. (2014). Cell models to study regulation of cell transformation in pathologies of retinal pigment epithelium. *Journal of ophthalmology, 2014*.

Künnapuu, J., Bokharaie, H., & Jeltsch, M. (2021). Proteolytic cleavages in the VEGF family: Generating diversity among angiogenic VEGFs, essential for the activation of lymphangiogenic VEGFs. *Biology, 10*(2), 167.

Kvanta, A. (2006). Ocular angiogenesis: the role of growth factors. *Acta ophthalmologica Scandinavica, 84*(3), 282-288.

Lafuente, M., Villegas-Perez, M., Selles-Navarro, I., Mayor-Torroglosa, S., De Imperial, J. M., & Vidal-Sanz, M. (2002). Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neuroscience, 109*(1), 157-168.

Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J., & Whitelaw, M. L. (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. *Science, 295*(5556), 858-861.

Lang, G. E., & Kuba, G. B. (1997). High-altitude retinopathy. *American journal of ophthalmology, 123*(3), 418-420.

Lang, M., Harris, A., Ciulla, T. A., Siesky, B., Patel, P., Belamkar, A., Verticchio Vercellin, A. C. (2019). Vascular dysfunction in retinitis pigmentosa. *Acta ophthalmologica, 97*(7), 660-664.

Lee, I. S., Kim, C.-S., Kim, J., Jo, K., Hyun, S. W., Zhang, H., Kim, J. S. (2021). Extract of Moutan radicis cortex and Cinnamomi ramulus ameliorates laser-induced choroidal neovascularization in Brown-Norway rats. *Phytomedicine*, 153794.

Lee, P., Chandel, N. S., & Simon, M. C. (2020). Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 21*(5), 268-283.

Lee, W. J., Kim, Y. K., Kim, Y. W., Jeoung, J. W., Kim, S. H., Heo, J. W., Park, K. H. (2017). Rate of macular ganglion cell-inner plexiform layer thinning in glaucomatous eyes with vascular endothelial growth factor inhibition. *Journal of glaucoma, 26*(11), 980-986.

Lei, Z., Li, B., Yang, Z., Fang, H., Zhang, G.-M., Feng, Z.-H., & Huang, B. (2009). Regulation of HIF-1α and VEGF by miR-20b tunes tumor cells to adapt to the alteration of oxygen concentration. *PloS one, 4*(10), e7629.

Leppänen, V.-M., Prota, A. E., Jeltsch, M., Anisimov, A., Kalkkinen, N., Strandin, T., Alitalo, K. (2010). Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 107*(6), 2425-2430.

Leppänen, V.-M., Tvorogov, D., Kisko, K., Prota, A. E., Jeltsch, M., Anisimov, A., Ballmer-Hofer, K. (2013). Structural and mechanistic insights into VEGF receptor 3 ligand binding and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 110*(32), 12960-12965.

Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W.-J., Goeddel, D. V., & Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science, 246*(4935), 1306-1309.

Leung, P. S., Srai, S. K., Mascarenhas, M., Churchill, L. J., & Debnam, E. S. (2005). Increased duodenal iron uptake and transfer in a rat model of chronic hypoxia is accompanied by reduced hepcidin expression. *Gut, 54*(10), 1391-1395.

Li, Li, G.-F., Liu, L., Li, H., Jiang, X., Li, X.-L., Liu, Q. (2015). Optimization of paeonol-loaded microparticle formulation by response surface methodology. *Journal of microencapsulation, 32*(7), 677-686.

Li, H.-Y., Yuan, Y., Fu, Y.-H., Wang, Y., & Gao, X.-Y. (2020). Hypoxia-inducible factor-1α: A promising therapeutic target for vasculopathy in diabetic retinopathy. *Pharmacological research, 159*, 104924.

Li, S. H., Shin, D. H., Chun, Y.-S., Lee, M. K., Kim, M.-S., & Park, J.-W. (2008). A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1α. *Molecular cancer therapeutics, 7*(12), 3729-3738.

Li, Y., Yan, C., Fan, J., Hou, Z., & Han, Y. (2021). MiR-221-3p targets Hif-1α to inhibit angiogenesis in heart failure. *Laboratory investigation, 101*(1), 104-115.

Li, Y., & Zheng, Y. (2017). Hypoxia promotes invasion of retinoblastoma cells in vitro by upregulating HIF-1α/MMP9 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci, 21*(23), 5361-5369.

Lim, L. S., Mitchell, P., Seddon, J. M., Holz, F. G., & Wong, T. Y. (2012). Age-related macular degeneration. *The Lancet, 379*(9827), 1728-1738.

Lin, C., Lin, H.-Y., Chen, J.-H., Tseng, W.-P., Ko, P.-Y., Liu, Y.-S., . . . Lu, D.-Y. (2015). Effects of paeonol on anti-neuroinflammatory responses in microglial cells. *International journal of molecular sciences, 16*(4), 8844-8860.

Ling, S., Birnbaum, Y., Nanhwan, M. K., Thomas, B., Bajaj, M., & Ye, Y. (2013). MicroRNA-dependent cross-talk between VEGF and HIF1α in the diabetic retina. *Cellular signalling, 25*(12), 2840-2847.

Liu, C.-H., Huang, S., Britton, W. R., & Chen, J. (2020). MicroRNAs in vascular eye diseases. *International journal of molecular sciences, 21*(2), 649.

Liu, C.-H., Wang, Z., Sun, Y., SanGiovanni, J. P., & Chen, J. (2016). Retinal expression of small non-coding RNAs in a murine model of proliferative retinopathy. *Scientific reports, 6*(1), 1-13.

Liu, M.-H., Lin, A.-H., Ko, H.-K., Perng, D.-W., Lee, T.-S., & Kou, Y. R. (2017). Prevention of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice by paeonol. *Frontiers in physiology, 8*, 193.

Liu, M.-H., Lin, A.-H., Lee, H.-F., Ko, H.-K., Lee, T.-S., & Kou, Y. R. (2014). Paeonol attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting ROS-sensitive inflammatory signaling. *Mediators of inflammation, 2014*.

Liu, M., Zhong, S., Kong, R., Shao, H., Wang, C., Piao, H., Zhao, Y. (2017). Paeonol alleviates interleukin-1β-induced inflammatory responses in chondrocytes during osteoarthritis. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 95*, 914-921.

Liu, Y., Song, A., Wu, H., Sun, Y., & Dai, M. (2021). Paeonol inhibits apoptosis of vascular smooth muscle cells via up-regulation of autophagy by activating class III PI3K/Beclin-1 signaling pathway. *Life Sciences, 264*, 118714.

Liu, Y., Wang, Y., Chen, Y., Fang, X., Wen, T., Xiao, M., Zhang, X. (2019). Discovery and validation of circulating Hsa-miR-210-3p as a potential biomarker for primary open-angle glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science, 60*(8), 2925-2934.

López-Barneo, J., Pardal, R., & Ortega-Sáenz, P. (2001). Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annual review of physiology, 63*(1), 259-287.

López-Malo, D., Villarón-Casares, C. A., Alarcón-Jiménez, J., Miranda, M., Díaz-Llopis, M., Romero, F. J., & Villar, V. M. (2020). Curcumin as a therapeutic option in retinal diseases. *Antioxidants, 9*(1), 48.

Lukiw, W. J., Surjyadipta, B., Dua, P., & Alexandrov, P. N. (2012). Common micro RNAs (miRNAs) target complement factor H (CFH) regulation in Alzheimer's disease (AD) and in age-related macular degeneration (AMD). *International journal of biochemistry and molecular biology, 3*(1), 105.

Luttun, A., Tjwa, M., & Carmeliet, P. (2002). Placental Growth Factor (PlGF) and Its Receptor Flt-1 (VEGFR-1) Novel Therapeutic Targets for Angiogenic Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences, 979*(1), 80-93.

Lv, J., Zhu, S., Chen, H., Xu, Y., Su, Q., Yu, G., & Ma, W. (2021). Paeonol inhibits human lung cancer cell viability and metastasis in vitro via miR-126-5p/ZEB2 axis. *Drug Development Research*.

Lyu, J., Chen, Y., Yang, W., Guo, T., Xu, X., Xi, Y., Ge, W. (2021). The conserved microRNA miR-210 regulates lipid metabolism and photoreceptor maintenance in the Drosophila retina. *Cell Death & Differentiation, 28*(2), 764-779.

Ma, L., Chuang, C.-C., Weng, W., Zhao, L., Zheng, Y., Zhang, J., & Zuo, L. (2016). Paeonol protects rat heart by improving regional blood perfusion during no-reflow. *Frontiers in physiology, 7*, 298.

Madanecki, P., Kapoor, N., Bebok, Z., Ochocka, R., Collawn, J., & Bartoszewski, R. (2013). Regulation of angiogenesis by hypoxia: the role of microRNA. *Cellular and molecular biology letters, 18*(1), 47-57.

Mahesh, G., & Biswas, R. (2019). MicroRNA-155: a master regulator of inflammation. *Journal of Interferon & Cytokine Research, 39*(6), 321-330.

Matrisian, L. M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays, 14*(7), 455-463.

Matrisian, L. M., & Hogan, B. L. (1990). 8 Growth Factor-Regulated Proteases and Extracellular Matrix Remodeling during Mammalian Development. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 24, pp. 219-259): Elsevier.

Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G.-W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., . . . Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature, 399*(6733), 271-275.

McCawley, L. J., & Matrisian, L. M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current opinion in cell biology, 13*(5), 534-540.

McNeill, L. A., Flashman, E., Buck, M. R., Hewitson, K. S., Clifton, I. J., Jeschke, G., Schofield, C. J. (2005). Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 has a high affinity for ferrous iron and 2-oxoglutarate. *Molecular BioSystems, 1*(4), 321-324.

McNEILL, L. A., Hewitson, K. S., Claridge, T. D., Seibel, J. F., Horsfall, L. E., & Schofield, C. J. (2002). Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the β-carbon of asparagine-803. *Biochemical Journal, 367*(3), 571-575.

Mentzer, S. J., & Konerding, M. A. (2014). Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis, 17*(3), 499-509.

Mitchell, P., Liew, G., Gopinath, B., & Wong, T. Y. (2018). Age-related macular degeneration. *The Lancet, 392*(10153), 1147-1159.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods, 65*(1-2), 55-63.

Mthembu, N. N., Mbita, Z., Hull, R., & Dlamini, Z. (2017). Abnormalities in alternative splicing of angiogenesis-related genes and their role in HIV-related cancers. *HIV/AIDS (Auckland, NZ), 9*, 77.

Murphy, G., Cockett, M. I., Stephens, P., Smith, B., & Docherty, A. (1987). Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochemical Journal, 248*(1), 265-268.

Murphy, G., Stanton, H., Cowell, S., Butler, G., Knäuper, V., Atkinson, S., & Gavrilovic, J. (1999). Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *Apmis, 107*(1-6), 38-44.

Nagase, H. (1995). [27] Human stromelysins 1 and 2. In *Methods in enzymology* (Vol. 248, pp. 449-470): Elsevier.

Nagase, H. (2013). Matrix Metalloproteinase 3/Stromelysin 1. In *Handbook of proteolytic enzymes* (pp. 763-774): Elsevier.

Nagase, H., Enghild, J. J., Suzuki, K., & Salvesen, G. (1990). Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl) mercuric acetate. *Biochemistry, 29*(24), 5783-5789.

Narayanan, S., Angelstig, S. E., Xu, C., Grünler, J., Zhao, A., Zhu, W., Ivan, M. (2020). HypoxamiR-210 accelerates wound healing in diabetic mice by improving cellular metabolism. *Communications biology, 3*(1), 1-11.

Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Kaplan, J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science, 306*(5704), 2090-2093.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., & Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal, 13*(1), 9-22.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products, 79*(3), 629-661.

Nguyen, M., Arkell, J., & Jackson, C. J. (1998). Active and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-free gelatinase B accumulates within human microvascular endothelial vesicles. *Journal of Biological Chemistry, 273*(9), 5400-5404.

Niu, Y., Liu, Z., Nian, X., Xu, X., & Zhang, Y. (2019). miR-210 controls the evening phase of circadian locomotor rhythms through repression of Fasciclin 2. *PLoS genetics, 15*(7), e1007655.

Nizamutdinova, I. T., Jin, Y. C., Kim, J. S., Yean, M. H., Kang, S. S., Kim, Y. S., Chang, K. C. (2008). Paeonol and paeoniflorin, the main active principles of Paeonia albiflora, protect the heart from myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Planta medica, 74*(01), 14-18.

Norton, K.-A., & Popel, A. S. (2016). Effects of endothelial cell proliferation and migration rates in a computational model of sprouting angiogenesis. *Scientific reports, 6*, 36992.

Novotná, J., & Herget, J. (2002). Possible role of matrix metalloproteinases in reconstruction of peripheral pulmonary arteries induced by hypoxia. *Physiological research, 51*(4), 323-334.

Ntellas, P., Mavroeidis, L., Gkoura, S., Gazouli, I., Amylidi, A.-L., Papadaki, A., . . . Kolettas, E. (2020). Old player-new tricks: Non angiogenic effects of the VEGF/VEGFR pathway in cancer. *Cancers, 12*(11), 3145.

Ogata, Y., Enghild, J., & Nagase, H. (1992). Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *Journal of Biological Chemistry, 267*(6), 3581-3584.

Oğuz Soydinç, H., Çamlıca, H., Duranyıldız, D., Sağlam, K. E., Taş, F., Yasasever, V., & Dalay, N. (2006). Matriks metalloproteinazlar ve akciğer kanseri. *Türk Onkoloji Dergisi, 21*(2), 53-56.

Olson, M. W., Bernardo, M. M., Pietila, M., Gervasi, D. C., Toth, M., Kotra, L. P., Fridman, R. (2000). Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9 differential rates for activation by stromelysin 1. *Journal of Biological Chemistry, 275*(4), 2661-2668.

Pandey, A., Shao, H., Marks, R. M., Polverini, P. J., & Dixit, V. M. (1995). Role of B61, the ligand for the Eck receptor tyrosine kinase, in TNF-alpha-induced angiogenesis. *Science, 268*(5210), 567-569.

Pang, C., Wu, Z., Xu, X., Yang, W., Wang, X., & Qi, Y. (2021). Paeonol alleviates migration and invasion of endometrial stromal cells by reducing HIF-1α-regulated autophagy in endometriosis. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition), 26*(9), 485-495.

Patel, J. (2015). Age Related macula degeneration. 17 Haziran 2020 tarihinde https://www.templemanopticianslaindon.co.uk/blog/age-related-macula-degeneration adresinden erişildi.

Patnaik, S., Rai, M., Jalali, S., Agarwal, K., Badakere, A., Puppala, L., Kekunnaya, R. (2021). An interplay of microglia and matrix metalloproteinase MMP9 under hypoxic stress regulates the opticin expression in retina. *Scientific reports, 11*(1), 1-12.

Perdew, G. H. (1988). Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *Journal of Biological Chemistry, 263*(27), 13802-13805.

Philp, N. J., Wang, D., Yoon, H., & Hjelmeland, L. M. (2003). Polarized expression of monocarboxylate transporters in human retinal pigment epithelium and ARPE-19 cells. *Investigative ophthalmology & visual science, 44*(4), 1716-1721.

Pilakka-Kanthikeel, S., Raymond, A., Atluri, V. S. R., Sagar, V., Saxena, S. K., Diaz, P., . . . Nair, M. (2015). Sterile alpha motif and histidine/aspartic acid domain-containing protein 1 (SAMHD1)-facilitated HIV restriction in astrocytes is regulated by miRNA-181a. *Journal of neuroinflammation, 12*(1), 1-12.

Ping, M., Xiao, W., Mo, L., Xiao, X., Song, S., Tang, W., & Yang, X. (2014). Paeonol attenuates advanced oxidation protein product-induced oxidative stress injury in THP-1 macrophages. *Pharmacology, 93*(5-6), 286-295.

Plastino, F., Pesce, N. A., & André, H. (2021). MicroRNAs and the HIF/VEGF axis in ocular neovascular diseases. *Acta ophthalmologica*.

Pocock, R. (2011). Invited review: decoding the microRNA response to hypoxia. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 461*(3), 307-315.

Poland, A., Glover, E., & Kende, A. S. (1976). Stereospecific, high affinity binding of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry, 251*(16), 4936-4946.

Poliseno, L., Tuccoli, A., Mariani, L., Evangelista, M., Citti, L., Woods, K., . . . Rainaldi, G. (2006). MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood, 108*(9), 3068-3071.

Posthumus, M. D., Limburg, P. C., Westra, J., van Leeuwen, M. A., & van Rijswijk, M. H. (2000). Serum matrix metalloproteinase 3 in early rheumatoid arthritis is correlated with disease activity and radiological progression. *J Rheumatol, 27*(12), 2761-2768.

Potente, M., & Mäkinen, T. (2017). Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 18*(8), 477.

Qin, Q., Furong, W., & Baosheng, L. (2014). Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 33*(1), 1-10.

Quinn, P. M., Mulder, A. A., Henrique Alves, C., Desrosiers, M., de Vries, S. I., Klooster, J., . . . Wijnholds, J. (2019). Loss of CRB2 in Müller glial cells modifies a CRB1-associated retinitis pigmentosa phenotype into a Leber congenital amaurosis phenotype. *Human Molecular Genetics, 28*(1), 105-123.

Rahimi, N. (2012). The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Molecular cancer therapeutics, 11*(3), 538-548.

Ramírez-Bergeron, D. L., & Simon, M. C. (2001). Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system. *Stem Cells, 19*(4), 279-286.

Redmond, T. M., Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Chen, N., . . . Pfeifer, K. (1998). Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nature genetics, 20*(4), 344-351.

Rey, S., & Semenza, G. L. (2010). Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovascular research, 86*(2), 236-242.

Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., & Hankinson, O. (1992). Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science, 256*(5060), 1193-1195.

Ribatti, D. (2007). The history of angiogenesis inhibitors. *Leukemia, 21*(8), 1606-1609.

Ribatti, D. (2014). The discovery of angiogenic growth factors: the contribution of Italian scientists. *Vascular cell, 6*(1), 8.

Ribatti, D., & Crivellato, E. (2012). "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Developmental biology, 372*(2), 157-165.

Rippe, C., Blimline, M., Magerko, K. A., Lawson, B. R., LaRocca, T. J., Donato, A. J., & Seals, D. R. (2012). MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, eNOS and inflammation. *Experimental gerontology, 47*(1), 45-51.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature, 386*(6626), 671-674.

Ritchie, W., Rajasekhar, M., Flamant, S., & Rasko, J. E. (2009). Conserved expression patterns predict microRNA targets. *PLoS computational biology, 5*(9).

Rivera, J. C., Holm, M., Austeng, D., Morken, T. S., Zhou, T. E., Beaudry-Richard, A., . . . Chemtob, S. (2017). Retinopathy of prematurity: inflammation, choroidal degeneration, and novel promising therapeutic strategies. *Journal of neuroinflammation, 14*(1), 1-14.

Rodrigues, G. B., Abe, R. Y., Zangalli, C., Sodre, S. L., Donini, F. A., Costa, D. C., . . . Diniz-Filho, A. (2016). Neovascular glaucoma: a review. *International journal of retina and vitreous, 2*(1), 26.

Rouwkema, J., & Khademhosseini, A. (2016). Vascularization and angiogenesis in tissue engineering: beyond creating static networks. *Trends in biotechnology, 34*(9), 733-745.

Russ, P., Gaylord, G., & Haselton, F. (2001). Retinal vascular permeability determined by dual-tracer fluorescence angiography. *Annals of biomedical engineering, 29*(8), 638-647.

Sang, Q. X. A. (1998). Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell research, 8*(3), 171-177.

Schults, M. A., Timmermans, L., Godschalk, R. W., Theys, J., Wouters, B. G., van Schooten, F. J., & Chiu, R. K. (2010). Diminished carcinogen detoxification is a novel mechanism for hypoxia-inducible factor 1-mediated genetic instability. *Journal of Biological Chemistry, 285*(19), 14558-14564.

Schwingshackl, A., Duszyk, M., Brown, N., & Moqbel, R. (1999). Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF-α. *Journal of allergy and clinical immunology, 104*(5), 983-990.

Selles-Navarro, I., Villegas-Perez, M. P., Salvador-Silva, M., Ruiz-Gomez, J. M., & Vidal-Sanz, M. (1996). Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Investigative ophthalmology & visual science, 37*(10), 2002-2014.

Semenza, G. L. (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of applied physiology*.

Semenza, G. L. (2001). Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends in molecular medicine, 7*(8), 345-350.

Semenza, G. L. (2011). Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *New england journal of medicine, 365*(6), 537-547.

Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell, 148*(3), 399-408.

Semenza, G. L., Agani, F., Feldser, D., Lyer, N., Kotch, L., Laughner, E., & Yu, A. (2002). Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiologi of common human diseases. In *Oxygen Sensing* (pp. 123-130): Springer.

Semenza, G. L., Nejfelt, M. K., Chi, S. M., & Antonarakis, S. E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3'to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 88*(13), 5680-5684.

Semenza, G. L., & Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology, 12*(12), 5447-5454. doi:10.1128/mcb.12.12.5447

Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., & Dvorak, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science, 219*(4587), 983-985.

Sethna, S., & Finnemann, S. C. (2014). Dietary Antioxidants, αvβ5 Integrin, and Ocular Protection: Long-Term Consequences of Arrhythmic Retinal Pigment Epithelium Phagocytosis. In *Handbook of Nutrition, Diet and the Eye* (pp. 567-576): Elsevier.

Shahneh, F. Z., Baradaran, B., Zamani, F., & Aghebati-Maleki, L. (2013). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapies. *Human antibodies, 22*(1-2), 15-19.

Shazly, T. A., & Latina, M. A. (2009). *Neovascular glaucoma: etiology, diagnosis and prognosis.* Paper presented at the Seminars in ophthalmology.

Shen, G., Li, X., Jia, Y.-f., Piazza, G. A., & Xi, Y. (2013). Hypoxia-regulated microRNAs in human cancer. *Acta Pharmacologica Sinica, 34*(3), 336-341.

Sheth, J. J. (1999). Diabetes, microalbuminuria and hypertension. *Clinical and experimental hypertension, 21*(1-2), 61-68.

Shibuya, M. (2001). Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell structure and function, 26*(1), 25-35.

Shiels, I., Zhang, S., Ambler, J., & Taylor, S. (1998). Vascular leakage stimulates phenotype alteration in ocular cells, contributing to the pathology of proliferative vitreoretinopathy. *Medical hypotheses, 50*(2), 113-117.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., & Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature, 359*(6398), 843-845.

Simmen, S., Maane, M., Rogler, S., Baebler, K., Lang, S., Cosin-Roger, J., . . . Wenger, R. H. (2021). Hypoxia Reduces the Transcription of Fibrotic Markers in the Intestinal Mucosa. *Inflammatory Intestinal Diseases, 6*(2), 87-100.

Simons, M., Gordon, E., & Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 17*(10), 611-625.

Smani, T., Gómez, L. J., Regodon, S., Woodard, G. E., Siegfried, G., Khatib, A.-M., & Rosado, J. A. (2018). TRP channels in angiogenesis and other endothelial functions. *Frontiers in physiology, 9*, 1731.

Smith, L. E. (2003). *Pathogenesis of retinopathy of prematurity.* Paper presented at the Seminars in neonatology.

Song, J., Ouyang, Y., Che, J., Li, X., Zhao, Y., Yang, K., . . . Yuan, W. (2017). Potential value of miR-221/222 as diagnostic, prognostic, and therapeutic biomarkers for diseases. *Frontiers in immunology, 8*, 56.

Song, Z., & Li, G. (2010). Role of specific microRNAs in regulation of vascular smooth muscle cell differentiation and the response to injury. *Journal of cardiovascular translational research, 3*(3), 246-250.

Stitt, A. W., Bhaduri, T., McMullen, C. T., Gardiner, T. A., & Archer, D. B. (2000). Advanced glycation end products induce blood–retinal barrier dysfunction in normoglycemic rats. *Molecular Cell Biology Research Communications, 3*(6), 380-388.

Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews, 85*(3), 845-881.

Suárez, Y., Fernández-Hernando, C., Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circulation research, 100*(8), 1164-1173.

Sulaiman, R. S., Basavarajappa, H. D., & Corson, T. W. (2014). Natural product inhibitors of ocular angiogenesis. *Experimental eye research, 129*, 161-171.

Sun, Z., Du, J., Hwang, E., & Yi, T. H. (2018). Paeonol extracted from Paeonia suffruticosa Andr. ameliorated UVB-induced skin photoaging via DLD/Nrf2/ARE and MAPK/AP-1 pathway. *Phytotherapy Research, 32*(9), 1741-1749.

Takeda, N., Maemura, K., Imai, Y., Harada, T., Kawanami, D., Nojiri, T., . . . Nagai, R. (2004). Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circulation research, 95*(2), 146-153.

Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., & Harris, A. L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1α and HIF-2α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *The American journal of pathology, 157*(2), 411-421.

Tam, W. (2001). Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene, 274*(1-2), 157-167.

Tam, W., Ben-Yehuda, D., & Hayward, W. S. (1997). bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Molecular and Cellular Biology, 17*(3), 1490-1502.

Tan, S., Ye, J., Qian, C., Ji, C., & Liu, C. (2007). Paeonol inhibits the proliferation of human colorectal carcinoma cells and synergic with chemotherapeutic agents. *Saudi medical journal, 28*(4), 642-643.

Terawaki, K., Noguchi, M., Yuzurihara, M., Omiya, Y., Ikarashi, Y., & Kase, Y. (2015). Keishibukuryogan, a traditional Japanese medicine, inhibits platelet aggregation in Guinea Pig whole blood. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015*.

Tonini, T., Rossi, F., & Claudio, P. P. (2003). Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene, 22*(42), 6549-6556.

Tozzi, C. A., Thakker-Varia, S., Yu, S. Y., Bannett, R. F., Peng, B. W., Poiani, G. J., . . . Riley, D. J. (1998). Mast cell collagenase correlates with regression of pulmonary vascular remodeling in the rat. *American journal of respiratory cell and molecular biology, 18*(4), 497-510.

Turto, H., Lindy, S., Uitto, V.-J., Wegelius, O., & Uitto, J. (1977). Human leukocyte collagenase: characterization of enzyme kinetics by a new method. *Analytical biochemistry, 83*(2), 557-569.

Ucuzian, A. A., Gassman, A. A., East, A. T., & Greisler, H. P. (2010). Molecular mediators of angiogenesis. *Journal of Burn Care & Research, 31*(1), 158-175.

Van Hove, I., Lemmens, K., Van de Velde, S., Verslegers, M., & Moons, L. (2012). Matrix metalloproteinase-3 in the central nervous system: a look on the bright side. *Journal of neurochemistry, 123*(2), 203-216.

Vanderkooi, J., Erecinska, M., & Silver, I. (1991). Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. *American Journal of Physiology-Cell Physiology, 260*(6), C1131-C1150.

Vincenti, M. P. (2001). The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. In *Matrix Metalloproteinase Protocols* (pp. 121-148): Springer.

Vohra, R., Dalgaard, L. M., Vibaek, J., Langbøl, M. A., Bergersen, L. H., Olsen, N. V., Kolko, M. (2019). Potential metabolic markers in glaucoma and their regulation in response to hypoxia. *Acta ophthalmologica, 97*(6), 567-576.

Wang, A. L., Knight, D. K., Thanh-thao, T. V., & Mehta, M. C. (2019). Retinitis pigmentosa: review of current treatment. *International ophthalmology clinics, 59*(1), 263-280.

Wang, D., Du, Y., Xu, H., Pan, H., & Wang, R. (2019). Paeonol protects mitochondrial injury and prevents pulmonary vascular remodeling in hypoxia. *Respiratory physiology & neurobiology, 268*, 103252.

Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(12), 5510-5514. doi:10.1073/pnas.92.12.5510

Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1993). Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction.

Wang, S., & Olson, E. N. (2009). AngiomiRs—key regulators of angiogenesis. *Current opinion in genetics & development, 19*(3), 205-211.

Wangsa-Wirawan, N. D., & Linsenmeier, R. A. (2003). Retinal oxygen: fundamental and clinical aspects. *Archives of ophthalmology, 121*(4), 547-557.

Watts, E. R., & Walmsley, S. R. (2019). Inflammation and hypoxia: HIF and PHD isoform selectivity. *Trends in molecular medicine, 25*(1), 33-46.

Wiedman, M., & Tabin, G. C. (1999). High-altitude retinopathy and altitude illness. *Ophthalmology, 106*(10), 1924-1927.

Wilczynska, A., & Bushell, M. (2015). The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death & Differentiation, 22*(1), 22-33.

Wilhelm, S., Collier, I., Marmer, B., Eisen, A., Grant, G., & Goldberg, G. (1989). SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *Journal of Biological Chemistry, 264*(29), 17213-17221.

Willam, C., Nicholls, L. G., Ratcliffe, P. J., Pugh, C. W., & Maxwell, P. H. (2004). The prolyl hydroxylase enzymes that act as oxygen sensors regulating destruction of hypoxia-inducible factor alpha.

Williams, A. (2008). Functional aspects of animal microRNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences, 65*(4), 545-562.

Wimmers, S., Karl, M. O., & Strauss, O. (2007). Ion channels in the RPE. *Progress in retinal and eye research, 26*(3), 263-301.

Xia, T., Akers, K., Eisen, A. Z., & Seltzer, J. L. (1996). Comparison of cleavage site specificity of gelatinases A and B using collagenous peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1293*(2), 259-266.

Xie, Li, L., Sun, Y., Wang, Y., Gao, S., Tian, Y., . . . Zhang, L. (2019). An available strategy for nasal brain transport of nanocomposite based on PAMAM dendrimers via in situ gel. *Nanomaterials, 9*(2), 147.

Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E., Golub, T. R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., . . . Kellis, M. (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3′ UTRs by comparison of several mammals. *Nature, 434*(7031), 338-345.

Xu, Y., An, X., Guo, X., Habtetsion, T. G., Wang, Y., Xu, X., . . . Zhang, C. (2014). Endothelial PFKFB3 plays a critical role in angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 34*(6), 1231-1239.

Yan, L., Lee, S., Lazzaro, D. R., Aranda, J., Grant, M. B., & Chaqour, B. (2015). Single and compound knock-outs of MicroRNA (miRNA)-155 and its angiogenic gene target CCN1 in mice alter vascular and neovascular growth in the retina via resident microglia. *Journal of Biological Chemistry, 290*(38), 23264-23281.

Yang, D., Wang, J., Xiao, M., Zhou, T., & Shi, X. (2016). Role of Mir-155 in controlling HIF-1α level and promoting endothelial cell maturation. *Scientific reports, 6*(1), 1-10.

Yang, J.-S., & Lai, E. C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular cell, 43*(6), 892-903.

Yang, X., Shi, L., Yi, C., Yang, Y., Chang, L., & Song, D. (2017). MiR-210-3p inhibits the tumor growth and metastasis of bladder cancer via targeting fibroblast growth factor receptor-like 1. *American journal of cancer research, 7*(8), 1738.

Yao, P., Maitre, B., Delacourt, C., Buhler, J., Harf, A., & Lafuma, C. (1997). Divergent regulation of 92-kDa gelatinase and TIMP-1 by HBECs in response to IL-1β and TNF-α. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 273*(4), L866-L874.

Ye, F., Chen, M., Wang, J., Zhao, Y., Cheng, J., Zhao, J., . . . Zou, Z. (2019). Downregulation of miR-210 promotes sulfur mustard-induced skin wound healing. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE, 12*(5), 5279-5287.

Yoon, C., Kim, J., Park, G., Kim, S., Kim, D., Hur, D. Y., . . . Kim, Y. S. (2016). Delivery of miR-155 to retinal pigment epithelial cells mediated by Burkitt's lymphoma exosomes. *Tumor Biology, 37*(1), 313-321.

Yoshida, Y., Tsunoda, T., Takashima, Y., Fujimoto, T., Doi, K., Sasazuki, T., . . . Shirasawa, S. (2010). ZFAT is essential for endothelial cell assembly and the branch point formation of capillary-like structures in an angiogenesis model. *Cellular & molecular biology letters, 15*(4), 541.

Yu, A.-M., Tian, Y., Tu, M.-J., Ho, P. Y., & Jilek, J. L. (2016). MicroRNA pharmacoepigenetics: posttranscriptional regulation mechanisms behind variable drug disposition and strategy to develop more effective therapy. *Drug Metabolism and Disposition, 44*(3), 308-319.

Yuan, Z., Du, W., He, X., Zhang, D., & He, W. (2020). Tribulus terrestris Ameliorates Oxidative Stress-Induced ARPE-19 Cell Injury through the PI3K/Akt-Nrf2 Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020*.

Yue, J. (2011). miRNA and vascular cell movement. *Advanced drug delivery reviews, 63*(8), 616-622.

Zhang, Shang, J., Huo, T.-m., Zhang, B., Chen, G., Zeng, Z.-y., & Li, S.-k. (2017). Local application of paeonol prevents early restenosis: a study with a rabbit vein graft model. *journal of surgical research, 212*, 278-287.

Zhang, D., Wu, J., Wu, J., & Zhang, S. (2021). Paeonol Induces Protective Autophagy in Retinal Photoreceptor Cells. *Frontiers in Pharmacology, 12*.

Zhang, H. R. (1994). Scanning electron-microscopic study of corrosion casts on retinal and choroidal angioarchitecture in man and animals. *Progress in retinal and eye research, 13*(1), 243-270.

Zhang, J., Zhao, J., Bai, Y., Huang, L., Yu, W., & Li, X. (2015). Effects of p75 neurotrophin receptor on regulating hypoxia-induced angiogenic factors in retinal pigment epithelial cells. *Molecular and cellular biochemistry, 398*(1), 123-134.

Zhang, L., Li, D.-c., & Liu, L.-f. (2019). Paeonol: pharmacological effects and mechanisms of action. *International Immunopharmacology, 72*, 413-421.

Zhang, L., Ma, C., Gu, R., Zhang, M., Wang, X., Yang, L., . . . Zhu, D. (2018). Paeonol regulates hypoxia-induced proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells via EKR 1/2 signalling. *European journal of pharmacology, 834*, 257-265.

Zhang, Q., Shi, H., Zhang, J., Jiang, C., & Zhou, C. (2021). The paeonol target gene autophagy-related 5 has a potential therapeutic value in psoriasis treatment. *PeerJ, 9*.

Zhang, Z., Sun, H., Dai, H., Walsh, R., Imakura, M., Schelter, J., . . . Diaz, R. L. (2009). MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT. *Cell cycle, 8*(17), 2756-2768.

Zhang., Zhang, Y., Han, H., Yang, J., Xu, B., Wang, B., & Zhang, T. (2017). Formulation optimization of gastro-retention tablets of paeonol and efficacy in treatment of experimental gastric ulcer. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, c16-00993.

Zhao, C., Chen, J. Y., Peng, W. M., Yuan, B., Bi, Q., & Xu, Y. J. (2020). Exosomes from adipose‐derived stem cells promote chondrogenesis and suppress inflammation by upregulating miR‐145 and miR‐221. *Molecular medicine reports, 21*(4), 1881-1889.

Zhou, J., Chen, F., Yan, A., & Xia, X. (2019). Role of mammalian target of rapamycin in regulating HIF-1α and vascular endothelial growth factor signals in glaucoma. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1-7.

Zhu, J., Nguyen, D., Ouyang, H., Zhang, X.-H., Chen, X.-M., & Zhang, K. (2013). Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of extracellular matrix induced by CTGF or TGF-β in ARPE-19. *International journal of ophthalmology*, *6*(1), 8.

Zhuang, Z., Xiao-qin, H. H., Tian, S.-y., Lu, Z.-j., Zhang, T.-z., & Bai, Y.-l. (2015). Down-regulation of microRNA-155 attenuates retinal neovascularization via the PI3K/Akt pathway. *Molecular vision, 21*, 1173.

ÖZGEÇMİŞ

07.07.1994 yılında İstanbul ilinin Kadıköy ilçesinde doğdum. 2012 yılında Edirne Anadolu Teknik Lise, Teknik Lise ve Endüstri Meslek Lisesi, Biyomedikal Cihaz Teknolojileri alanı, Yaşam Destek Cihazları dalından okul birinciliği ile biyomedikal teknikeri olarak mezun oldum. Aynı yıl Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği bölümünü kazandım. 2012-2013 eğitim öğretim yılında Erciyes Üniversitesi Yabancı Diller Yüksekokulu'nda İngilizce hazırlık okudum. 2015 yılında Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Sağlık Kurumları İşletmeciliği bölümünün ön lisans programından mezun oldum. 2017'de biyomedikal mühendisi olarak mezun oldum. 2018-2019 bahar döneminde Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda görevli Dr. Öğr. Üyesi Gamze GÖGER'in yürütücüsü olduğu 218S812 numaralı, "***Tripleurospermum callosum* (Boiss. & Heldr.) E. Hossain bitki ekstrelerinin in vivo *Caenorhabditis elegans* modelinde antimikrobiyal etkilerinin araştırılması**" isimli TÜBİTAK projesinde 27.02.2020-27.02.2021 tarihleri arasında TÜBİTAK bursiyeri olarak çalıştım. Yüksek lisans eğitimim esnasında, aşağıda detayları yer alan çalışmalar ile iki uluslararası kongreye katıldım;

Beşirik, N. Ş., Göger, G. (2021). Antimicrobial evaluation of the Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) leaf essential oil combination with standard antimicrobial activity. 6th International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences, 30 Nisan - 1 Mayıs 2021, online İngilizce sözlü sunum.

Besirik, N. S., Goger, G. (2021). Antimicrobial evaluation of the Juniper Berry (*Juniperus communis* L.) essential oil combination with standard antimicrobial activity. 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), online İngilizce sözlü sunum.