T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MİR-99A-3P ve MİR-877'NİN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Hülya ARKAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. İlhan ONARAN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Programı

Haziran, 2022

Aileme ve merhume babaannem Huriye Arkan’a ithaf ediyorum.

BÜTÇE DESTEKLERİ

MİR-99A-3P ve MİR-877'NİN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 31648.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca engin bilgi, hoşgörü ve desteklerini esirgemeyen Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Doktora eğitimim boyunca bilgisinden faydalandığım, bazı dönemler kendisini bıktırmama rağmen maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bu süreçte karşılığını veremeyecek kadar üzerimde çok fazla emeği olan değerli danışman hocam Prof. Dr. İlhan ONARAN'a,

Hücre ve moleküler genetik deneylerim esnasında bilgi birikiminden faydalandığım, laboratuvarlarını bize açan ve maddi desteklerini esirgemeyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Fahri AKBAŞ'a,

FTIR spektroskopisi analizi için laboratuvarını bize açan ve bu konudaki engin bilgilerini bizimle paylaşan Altınbaş Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD öğretim üyesi Ayça DOĞAN MOLLAOĞLU'na,

Karamsarlığıma rağmen yanımda hissettiğim, en çok tez dönemimde maddi ve manevi desteğini hissettiğim CTF Biyofizik AD'den Doç. Dr. Nurten BAHTİYAR'a,

Doktora eğitimine beraber başladığım, kendisi zor durumda bile olsa her daim yardımını esirgemediğine şahit olduğum ve samimiyetine güvendiğim değerli arkadaşım Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Dr. Öğr. Üyesi Güven YENMİŞ'e,

Lisansüstü eğitimi sırasında meydana gelen aksaklıklarda beni motive ettikleri için Dr. Öğr. Üyesi Irmak ŞAH'a, Dr. Öğr. Üyesi Tuğba SOYDAŞ'a, Dr. Alişa Bahar BEYDOĞAN'a, Dr. Ayla KERİMOVA'ya, MSc Narmina MALİKOVA'ya, MSc Ezgi TERZİ'ye, MSc Selin ÜNAL KÖSE'ye, MSc Mehmet Can ÇAKIN'a ve MSc Betül YÜCETÜRK'e,

Doktora eğitimim boyunca güzel anılar biriktirmeme sebep olan, ufak bir bilimsel bilgiyi bile devlet sırrıymış gibi saklamayan ve paylaşan, samimiyetine güvendiğim öğretim elemanlarına ve çiledaş laboratuvar arkadaşlarıma,

Tıbbi Biyoloji AD personellerinden Yakup AKAY, Remzi ŞENEL ve Uğur HEPCAN başta olmak üzere samimiyetle yaklaşan ve yardımcı olan tüm Temel Tıp Bilimleri personeline,

Manevi desteklerini hissettiğim akrabalarıma, arkadaşlarıma ve yakınlarıma ve her daim yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme, yeğenim Zeynep'e

ve en kıymetlim, yakınım, has dostum, biricik Çinni'me

Teşekkür etmeyi borç bilirim.

Haziran 2022 Hülya ARKAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **ix**
TABLO LİSTESİ ..... **x**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xi**
ÖZET ..... **xii**
ABSTRACT ..... **xiv**
1 GİRİŞ **1**
2 KAVRAMSAL ÇERÇEVE **3**
2.1 DERİ 3
2.2 YARA ve YARANIN YAPISI 3
2.2.1 Yaraların Sınıflandırılması 4
2.3 YARA İYİLEŞMESİNİN BİYOLOJİSİ 5
2.3.1 İyileşmede ilk adım: İnflamasyon 8
2.3.2 Epitelizasyon 9
2.3.3 Granülasyon dokusunun oluşması 10
2.3.4 Neovaskülarizasyon (Yara Sonrası Damar Oluşumu) 11
2.3.5 Yara Kasılması ve Hücre Dışı Matrisin Yeniden Düzenlenmesi 12
2.4 YARA İYİLEŞMESİNİN GENETİĞİ 13
2.4.1 miRNA ve Yara İyileşmesi 16
3 YÖNTEM **18**
3.1 HÜCRE KÜLTÜRÜ 18
3.2 DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI 18
3.3 3T3 HÜCRELERİNİN MİRNA ile TRANSFEKSİYONU 19
3.4 HÜCRELERDEKİ GEN İFADE DÜZEYLERİNİN ANALİZİ 19
3.4.1 Hücrelerden Total RNA Saflaştırılması 20
3.4.2 RNA'lardan cDNA sentezi 20

3.4.3 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi 21
3.5 KRİSTAL VİYOLE ile HÜCRE CANLILIĞI TESTİ 23
3.6 İN VİTRO YARA İYİLEŞMESİ ANALİZİ 24
3.7 FTIR SPEKTROSKOPİSİ 24
3.8 İSTATİSTİKSEL ANALİZ 25
4 BULGULAR 26
4.1 MİMİK veya İNHİBİTÖR MİKRORNA ile FİBROBLAST TRANSFEKSİYONU SONRASI HEDEFLENEN MRNA'LARIN GEN İFADE DÜZEYLERİ 26
4.1.1 Mapk1 Gen İfade Düzeyi 26
4.1.2 Mmp9 Gen İfade Düzeyi 27
4.1.3 Tagln Gen İfade Düzeyi 28
4.1.4 Tnf Gen İfade Düzeyi 30
4.2 MİKRORNA MİMİĞİ veya İNHİBİTÖRÜ TRANSFEKSİYONUN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ 31
4.3 MİKRORNA MİMİK veya İNHİBİTÖRLERİNİN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ 32
4.4 FTIR SPEKTROSKOPİSİ ANALİZİ SONUÇLARI 36
5 TARTIŞMA 42
6 SONUÇ VE ÖNERİLER 50
KAYNAKLAR 52
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 63

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Yara iyileşmesinin basamaklarına genel bakış.....7
Şekil 2.2: Fibroblast hücreleri 10
Şekil 2.3: miRNA biyogenezi.....15
Şekil 2.4: Farklı miRNA davranışları.....16
Şekil 4.1: Mapk1 genine ait ifade düzeyinin grafik gösterimi 27
Şekil 4.2: Mmp9 genine ait ifade düzeyinin grafik gösterimi. 28
Şekil 4.3: Tagln genine ait ifade düzeyinin grafik gösterimi 29
Şekil 4.4: Tnf genine ait ifade düzeyinin grafik gösterimi 31
Şekil 4.5: Transfeksiyonun hücre canlılığı üzerine etkisi.....32
Şekil 4.6: Mimik grubuna ait yara iyileşmesi analizi görüntüsü 33
Şekil 4.7: İnhibitör gruplarına ait yara iyileşmesi analizi görüntüsü.....34
Şekil 4.8: İn vitro Yara iyileşmesi analiz sonuçlarının grafik gösterimi. 35
Şekil 4.9: Amid A normalizasyonuna göre C-H bölgesi (3000-2800 cm-1).....36
Şekil 4.10: Amid I normalizasyonuna göre parmak izi bölgesi (1800-1000 cm-1). 37
Şekil 4.11: İnhibitör gruplarına ait FTIR bant alan oranlarının grafiksel gösterimi.....41

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Yara iyileşmesinde etkinlik gösteren sitokinler, büyüme faktörleri ve etkinlik gösterdikleri hücre tipleri.....6

Tablo 3.1: miRNA'ya poli A kuyruğu eklenmesi için hazırlanan karışım miktarları.....21

Tablo 3.2: cDNA sentezi için kullanılan bileşenlerin miktarı.....21

Tablo 3.3: PZR analizinde kullanılan primerler.....22

Tablo 3.4: PZR için kullanılan bileşenlerin miktarı.....22

Tablo 3.5: miRNA PZR'si için uygulanan koşullar.....22

Tablo 3.6: U6 PZR'si için uygulanan koşullar.....23

Tablo 3.7: mRNA PZR'si için uygulanan koşullar.....23

Tablo 4.1: Mapk1 mRNA gen ifade düzeyine ait verilerin değerlendirilmesi.....26

Tablo 4.2: Mmp9 mRNA gen ifade düzeyine ait verilerin değerlendirilmesi.....28

Tablo 4.3: Tagln mRNA gen ifade düzeyine ait verilerin değerlendirilmesi.....29

Tablo 4.4: Tnf mRNA gen ifade düzeyine ait verilerin değerlendirilmesi.....30

Tablo 4.5: Hücre canlılık testinin değerlendirilmesi.....32

Tablo 4.6: İn vitro yara iyileşmesi analizi sonuçları.....35

Tablo 4.7: FTIR spektrumunun genel bant atamaları.....37

Tablo 4.8: Bant alan oranlarının hesaplanmasında kullanılan spektral bölgeler.....38

Tablo 4.9: FTIR spektrumundan elde edilen bant alan oranları.....38

Tablo 4.10: İnhibitör gruplarına ait FTIR bant alanlarının analizi.....39

Tablo 4.11: İnhibitör gruplarına ait FTIR bant alan oranlarının analiz sonuçları.....40

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

Δ : Delta
µ : Mikro
U : Ünite

Kısaltmalar **Açıklama**

miRNA : MikroRNA
ECM : Hücre dışı matris
MAPK : Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz
MMP : Matris Metalloproteaz
TAGLN : Transgelin
TNF : Tümör Nekroz Faktör
miR : miRNA
TGF : Dönüştürücü Büyüme Faktörü
EGF : Epidermal Büyüme Faktörü
FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü
PDGF : Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
IGF : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL : İnterlökin
CSF : Koloni Uyarıcı Faktör
Pol II : RNA Polimeraz II
Pri-miRNA : Birincil MikroRNA
Pre-miRNA : Öncül MikroRNA
RISC : RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi
EGR : Erken Dönem Büyüme Faktörü
OPN : Osteopontin
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
FTIR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi

ÖZET

DOKTORA TEZİ

MİR-99A-3P ve MİR-877'NİN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Hülya ARKAN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Programı

Danışman : Prof. Dr. İlhan ONARAN

Yara iyileşmesi dahil birçok biyolojik süreçte etkili olduğu belirtilen çeşitli miRNA'lar tanımlanmış olsa da bu miRNA'lara dair çalışmalar klinikte kullanımları için henüz yeterli değildir. Bu tez çalışmasında, daha önceki mikrodizin ve biyoinformatik çalışmalarımız sonucunda yara iyileşmesinde etkili olabileceğini gösterdiğimiz miR-99a-3p ve mir-877'nin, hedef genlerin ifade düzeylerine, hücre fizyolojisine ve hücrenin salgısal moleküllerine etkileri araştırıldı. Bu bağlamda 3T3 fibroblast hücreleri miR-99a-3p, miR-877-5p, miR-877-3p veya bunların kombine formunun mimik veya inhibitörleri ile transfekte edildi. Bu miRNA'ların potansiyel hedef genleri olan *Mapk1*, *Mmp9*, *Tagln* ve *Tnf* gen ifade düzeylerine qPZR analizi ile bakıldı. Ayrıca, bu miRNA'ların hücre fizyolojisine etkilerini gözlemlemek için hücre canlılığı ve in vitro yara iyileşmesi testleri yapıldı. FTIR spektroskopisi ile de fibroblastlar tarafından kültür besiyerlerine salınmış olan moleküller değerlendirildi. qPZR analizi sonucunda miR-877-5p mimiği *Mapk1*; kombine miRNA mimiği ve miR-99a-3p inhibitörü *Tagln*; miR-877-5p inhibitörü *Tnf*; kombine miRNA inhibitörü ise *Mmp9*, *Tagln* ve *Tnf* ifade seviyelerinde 1,5 ile 12,38 kat arasında anlamlı değişikliklere neden oldu ($p<0,05$).

Gruplar arasında yara iyileşme hızı karşılaştırıldığında sadece kombine inhibitör grubunda anlamlı artış olduğu görüldü ($p=0,0286$). Bu bulgular temel alınarak miRNA inhibitörleri uygulanmış gruplarda FTIR analizinin uygulanmasına karar verildi. Kontrole kıyasla 2956 cm^{-1} bandı haricinde lipid, protein ve nükleik asit bant bölgelerinde anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0,05$). Bantlar, alan ve oranlarına göre analiz edildiğinde, en fazla anlamlı değişim miRNA inhibitörleri kombine uygulandığında görüldü. Artan lipid, protein, fosfolipid, kolesterol, nükleik asit ve kollajen miktarları hücre dışına salınan ekzozomlar ve kollajen gibi yapı ve moleküllerin artışı olarak değerlendirildi. Hücreler miRNA'ların kombine inhibitörleri ile transfekte edildikten sonra *Mmp9*, *Tagln* ve *Tnf* ifadesinin azalmasıyla beraber, kollajen miktarının ve ekzozomların arttığı ve hücre göçünün azaldığı bulundu. Bu bulgular miRNA'ların tek tek değerlendirilmesinin yanı sıra, kombine etkilerinin değerlendirilmesinin de önemli olduğunu göstermiştir. Elde edilen bu sonuçların yara iyileşmesinin hızlandırılması için yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine ipuçları verebileceğini düşünmekteyiz.

Haziran 2022 , 82 sayfa.

Anahtar kelimeler: mikroRNA, yara iyileşmesi, transfeksiyon, FTIR

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

IN VITRO EVALUATION of THE EFFECTS of MIR-99A-3P and MIR-877 on WOUND HEALING

Hülya ARKAN

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Programme of Medical Biology

Supervisor : Prof. Dr. İlhan ONARAN

Although various miRNAs have been identified, which are stated to be effective in many biological processes, including wound healing, studies on these miRNAs are not yet sufficient for their clinical use. In this thesis, the effects of miR-99a-3p and mir-877, which we have shown to be effective in wound healing as a result of our previous microarray and bioinformatics studies, on the expression levels of target genes, cell physiology and secretory molecules of the cell were investigated. In this context, 3T3 fibroblast cells were transfected with miR-99a-3p, miR-877-5p, miR-877-3p or their combined form mimics or inhibitors. The gene expression levels of *Mapk1*, *Mmp9*, *Tagln* and *Tnf*, which are the potential target genes of these miRNAs, were examined by qPCR analysis. In addition, cell viability and in vitro wound healing tests were performed to observe the effects of these miRNAs on cell physiology. The molecules released into culture media by fibroblasts were evaluated with FTIR spectroscopy. As a result of the PCR analysis, miR-877-5p mimic, combined miRNA mimic and miR-99a-3p inhibitor, miR-877-5p inhibitor, and combined miRNA inhibitör caused to the 1.5 to 12.38 fold significant changes in the expression levels of *Mapk1*, *Tagln*,

Tnf, and *Mmp9*, *Tagln* and *Tnf*, respectively ($p<0.05$). When the wound healing rate was compared between the groups, it was observed that there was a significant increase only in the combined inhibitor group ($p=0.0286$). Based on these results, it was decided to apply FTIR analysis to groups that were treated with inhibitory miRNA. Significant differences were found in the lipid, protein and nucleic acid band regions except for the 2956 cm^{-1} band compared to the control ($p<0.05$). When the bands were analyzed according to their area and ratio, the most significant change was seen when miRNA inhibitors were combined. Increased amounts of lipid, protein, phospholipid, cholesterol, nucleic acid and collagen were evaluated as the increase in structure and molecules such as exosomes and collagen released out of the cell. It was found that after the cells were transfected with combined miRNA inhibitors, the expressions of *Mmp9*, *Tagln* and *Tnf*, and the cell migration decreased, and the amounts of collagen and exosomes increased. This findings showed that besides evaluating the individual miRNAs, it was also important to evaluate their combined effects. We think that these obtained results may give clues to the development of new treatment protocols to accelerate wound healing.

June 2022, 82 pages.

Keywords: MicroRNA, wound healing, transfection, FTIR

1 GİRİŞ

Derinin birincil işlevi, sayısız çevresel saldırıya karşı koruyucu bir fiziksel bariyer görevi görmesidir ve homeostazı sürdürmek için deri, kritik öneme sahiptir. Deri bütünlüğündeki herhangi bir bozulma; sıvı kaybı, elektrolit dengesizliği ve enfeksiyon gibi bir dizi patolojik duruma karşı hastayı savunmasız hale getirme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, etkili ve tam yara iyileşmesi, hastanın genel sağlığı için kritik öneme sahiptir (Singer ve diğ., 1999; Baum ve Arpey, 2005).

Son yıllardaki çalışmalarda yara iyileşmesi de olmak üzere birçok biyolojik süreçte görev alan ve gen ifadelerinde epigenetik değişiklikler yapan kodlanmayan RNA'lar tanımlanmıştır. Bu kodlanmayan RNA'lardan çok çalışılanlardan biri de mikroRNA'lardır. Yaklaşık 22 baz uzunluğuna sahip olan miRNA'lar, mRNA'ların çoğunlukla 3' ucundaki kodlanmayan bölgesine bağlanıp hedeflediği mRNA'nın yıkımına veya mRNA çevriminin baskılanmasına yol açar (Bartel, 2004; Bavan ve diğ., 2011). miRNA'nın ifadesindeki hatalar veya miRNA hedef bölgelerindeki değişiklikler çeşitli hastalık süreçleri ve patolojik durumlar ile ilişkilendirilmiştir (Sand ve diğ., 2009; Wojciechowska ve diğ., 2017; Ali Syeda ve diğ., 2020). Her ne kadar yara iyileşmesinde etkili olduğu belirtilen birçok miRNA'lar tanımlanmış olsa da klinikte kullanımı için hala yetersizdir.

Önceki çalışmalarımızda *Lucilia sericata* larva salgısının yaralarda etkili bir şekilde iyileşmeye sebep olduğu ve yara iyileşmesi esnasında görevli olan çok sayıda genin ifadesini değiştirdiği gözlemlenmiştir. Çalışmalarımızda mikrodizin analizi sonrası biyoinformatik yaklaşımlar kullanılarak etkin yara iyileşmesinde rol oynayan ve biyobelirteç olarak kullanılabilecek olan miR-99a-3p ve mir-877'nin yukarı yönlü düzenlendiği gösterilmiştir. Daha ileri analizlerle potansiyel hedef genleri olarak *Mapk1*, *Mmp9*, *Tagln* ve *Tnf* tanımlanmıştır. (Polat ve diğ., 2014; Coskunpinar ve diğ., 2015). Biyoinformatik olarak elde edilen verilerin biyolojik sonuçlarının gözlenmesi, mekanizmaların açıklanması için önemli bir süreçtir. Dolayısıyla yara iyileşmesini hızlandırıcı etkisini tanımladığımız miRNA'ların ve hedef mRNA'larının yara iyileşmesindeki etkinliğinin daha ileri analizlerle gösterilmesi gerekmektedir. Bu sebeple, 3T3 fibroblast hücre soyları kullanılarak belirlediğimiz miR-99a-3p ve mir-877'nin hücre fizyolojisine etkileri, hedef genlerinin ifade düzeylerine ve hücre

dışına salınan moleküllere nasıl etki ettiğinin in vitroda gösterilmesi amaçlanmıştır. Son yıllarda miRNA'lar aracılığıyla çeşitli patolojilerin ve hastalıkların iyileştirilmesine yönelik çabaların olduğu dikkate alınırsa, iki miRNA'nın yara iyileşmesindeki olası rollerinin ortaya çıkartılması, yara iyileşmesi mekanizmasının daha iyi anlaşılabilir olacağını ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için yeni bir fikir vereceğini düşünmekteyiz.

2 KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1 DERİ

Cildin birincil işlevi, çevreye karşı koruyucu bir bariyer olarak hizmet etmektir. Yaralanma veya hastalık nedeniyle cildin büyük kısımlarının bütünlüğünün kaybı, ciddi sağlık sorunlarına yol açabilir. Yetişkin cilt iki doku tabakasından oluşur: keratine edilmiş tabakalı epidermis dokusu ve destek-beslenme sağlayan, kalın, kollajen açısından zengin dermal bağ dokusu tabakası. Kıllar ve bezler gibi uzantılar epidermisten türetilir ve bunlarla bağlantılıdır. Cilt, dış dünyaya karşı koruyucu bir bariyer görevi gördüğünden, içindeki herhangi bir kırılma hızla ve verimli bir şekilde onarılmalıdır. Cildi oluşturan tabakalardaki yarık ya da kırıklar "yara" olarak adlandırılır.

Günlük patolojide, yaralar, zorlu bir klinik sorun olmaya devam etmekte; erken ve geç komplikasyonlar, sık sık hastalık ve ölümün nedeni olmaktadır (Natarajan ve diğ., 2000; Alonso ve diğ., 1996). Bilim insanları, özellikle yara yükünü azaltmak amacıyla, akut ve uzun süreli yara yönetimi için yeni terapötik yaklaşımlara vurgu yaparak iyileşme ve yara bakımı fizyolojisini anlamaya odaklanmıştır (Robson ve diğ., 2001; Szycher ve Lee, 1992).

2.2 YARA ve YARANIN YAPISI

Yara, normal anatomik yapı ve fonksiyondaki hasar veya bozulma olarak tanımlanmaktadır. Yaralar; ilgili organ içinde harici veya dahili olarak başlayan patolojik süreçlerden kaynaklanabilir, kazara veya kasıtlı bir etiyolojiye sahip olabilir veya bir hastalık sürecinin sonucu olarak ortaya çıkabilirler. Sebep ve şekli ne olursa olsun yara, dokuya zarar verir ve içindeki yerel ortamı bozar. Fizyolojik bir yanıt; kanama, pıhtılaşma ile damar kasılması, kompleman aktivasyonu ve enfeksiyonel bir yanıt ile sonuçlanır (Bischoff, 1999; Robson, 1997; Lazurus ve diğ., 1994). Normal yara iyileşmesi; kanama, pıhtılaşma, başlangıç yaralanmasına akut inflamatuvar yanıtın başlatılması, rejenerasyon, göç ve bağ dokusunun ve parankim hücrelerinin çoğalması, hücre dışı matris (ECM) proteinleri, yeni parankim ve bağ dokusunun ve kollajen birikiminin yeniden şekillenmesi gibi bir dizi koordineli olayı içeren dinamik ve karmaşık bir işlemdir. (Rivera ve diğ., 2007; Labler ve diğ., 2006).

2.2.1 Yaraların Sınıflandırılması

Yaralar çeşitli kriterlere göre sınıflandırılabilir. Zaman, yaralanma yönetimi ve yara onarımında önemli bir faktördür. Böylece, yaralar klinik olarak iyileşme süresine göre akut ve kronik olarak kategorize edilebilir (Velnar ve diğ., 2009).

2.2.1.1 Akut Yaralar

Kendilerini onaran ve hem fonksiyonel hem de anatomik yenilenmenin sonucu olan zamanında ve düzenli bir iyileşme yolunu takip ederek normal olarak ilerleyen yaralar akut yaralar olarak sınıflandırılır. İyileşme süresi genellikle 5 ila 10 gün veya 30 gün içinde değişir. Akut yaralar, travmatik doku kaybı veya cerrahi prosedürün bir sonucu olarak elde edilebilir (Robson ve diğ., 2001; Robson, 1997). Travmatik yaralar bu gruba dahildir. Sadece yumuşak dokuyu içerebilirler veya kemik kırıkları ile ilişkili olabilirler. Bu kombine yaralanmalar, en kapsamlı ve yaygın olarak kullanılan AO Vakfı sınıflandırma sistemi ile sınıflandırılmıştır (https://surgeryreference.aofoundation.org). Bu sınıflandırma sistemine cilt, kas, tendon ve nörovasküler yaralanmaların değerlendirilmesi ile kapalı ve açık kırıklar dahildir

2.2.1.2 Kronik Yaralar

Kronik yaralar; iyileşmenin normal aşamalarında ilerleyemeyen, düzenli ve zamanında onarılamayan yaralardır (Robson ve diğ., 2001; Szycher ve Lee, 1992). İyileşme süreci eksiktir ve çeşitli faktörlerin etkinliği görülmektedir. Bu durum da hemostaz, inflamasyon, proliferasyon veya yeniden şekillendirme gibi bir veya daha fazla aşamayı uzatır. Bu faktörler enfeksiyon, doku hipoksisi, nekroz ve artmış inflamatuvar sitokin seviyeleri olarak gözlenmektedir (Vanwijck, 2001).

Yarada sürekli bir inflamasyon durumuyla birlikte iyileşmeyen bir durumu sürdüren bir dizi doku tepkisi oluşturur. İyileşme, daha sonra koordine edilmemiş bir şekilde ilerlediğinden dolayı fonksiyonel ve anatomik sonuçlar zayıftır ve bu yaralar sıklıkla yeniden ortaya çıkarlar. Kronik yaralar; basınç, arteriyel ve venöz yetmezlik, yanıklar ve vaskülit gibi çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir (Degreef, 1998; Komarcevic, 2000).

2.2.1.3 Karmaşık Yaralar

Karmaşık yara özel bir durumdur ve bir enfeksiyon ve doku kusurunun bir kombinasyonu olarak tanımlanır (Bischoff, 1999). Enfeksiyon, yara için sürekli bir tehdit

oluşturur. Kusur, travma veya enfeksiyon sonrası, etiyoloji veya geniş bir doku rezeksiyonu (örn. tümör tedavisinde) nedeniyle gelişebilir. Her yara; neden, boyut, konum ve yönetime bakılmaksızın kontamine olur. Açık bir enfeksiyonun gelişip gelişmediği mikroorganizmaların virülansına, sayısına ve tipine, yerel kan kaynağına ve hastanın doğal direncine bağlıdır. Enfeksiyonun tipik özellikleri, iyi betimlenmiş tipik semptomlardır: kızarıklık, ısı, ağrı, ödem ve kayıp veya etkilenen kısımda sınırlı fonksiyon. Yara enfeksiyonlarının sıklığı tip veya cerrahi tekniğe ve yaranın konumuna bağlıdır (Degreef, 1998; Attinger ve diğ., 2006).

Yara sınıflandırması sırasında dikkate alınan diğer kriterler etiyoloji, kontaminasyon derecesi, morfolojik özellikler ve organlarla iletişimdir (Komarcevic, 2000). Etiyoloji; yaraları tetikleyici faktöre göre çürükler, sıyrıklar, kopmalar, yırtıklar, kesikler, bıçak yaraları, ezilme yaraları, kurşun yaraları ve yanıklar olarak sınıflandırır (Velnar ve diğ., 2009).

Yaralar kontaminasyon derecesine göre üç gruba ayrılır: (i) aseptik yaralar (kemik ve eklem ameliyatları), (ii) kontamine yaralar (karın ve akciğer ameliyatları) ve (iii) septik yaralar (apseler, bağırsak ameliyatları vb.) (Vanwijck, 2001).

2.3 YARA İYİLEŞMESİNİN BİYOLOJİSİ

Yaraların tedavisinin birincil hedefleri yaranın hızlı kapanması ve fonksiyonel ve estetik açıdan tatmin edici bir yara izidir. Hücresel ve moleküler biyolojideki son gelişmeler, yara onarımı ve doku rejenerasyonu ile ilgili biyolojik süreçler hakkındaki anlayışımızı büyük ölçüde genişletmiş ve yara bakımında gelişmelere yol açmıştır.

İyileşme süreci, degranülasyona uğrayan plateletlerden ve yaralanmış kan damarlarından özel aracıların salınmasıyla yaralanmadan hemen sonra başlatılır. Bir fibrin ve fibronektin ağı içindeki plateletlerden oluşan bir pıhtı, patojenlere karşı bir bariyer ve hücreler için bir matris sağlamak üzere oluşturulur (Singer ve Clark, 1999).

Hemostazdan sonra, kutanöz onarım geniş ölçüde birbirini takip eden ancak örtüşen üç faza ayrılır: inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme (Midwood ve diğ., 2004) (Şekil 2.1). İnflamatuvar faz; pıhtı, kalıntı ve yara iyileşmesine yönelik diğer engelleri ortadan kaldırmak için nötrofillerin ve monositlerin yaraya göçü ve istilası ile karakterize edilir (Miller ve diğ., 2005). Bu lökositler ayrıca diğer hücrelerin aktivitesini koordine etmek ve

yeni ECM üretimini ve organizasyonunu düzenlemek için çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri salgılarlar (Tablo 2.1) (Singer ve Clark, 1999).

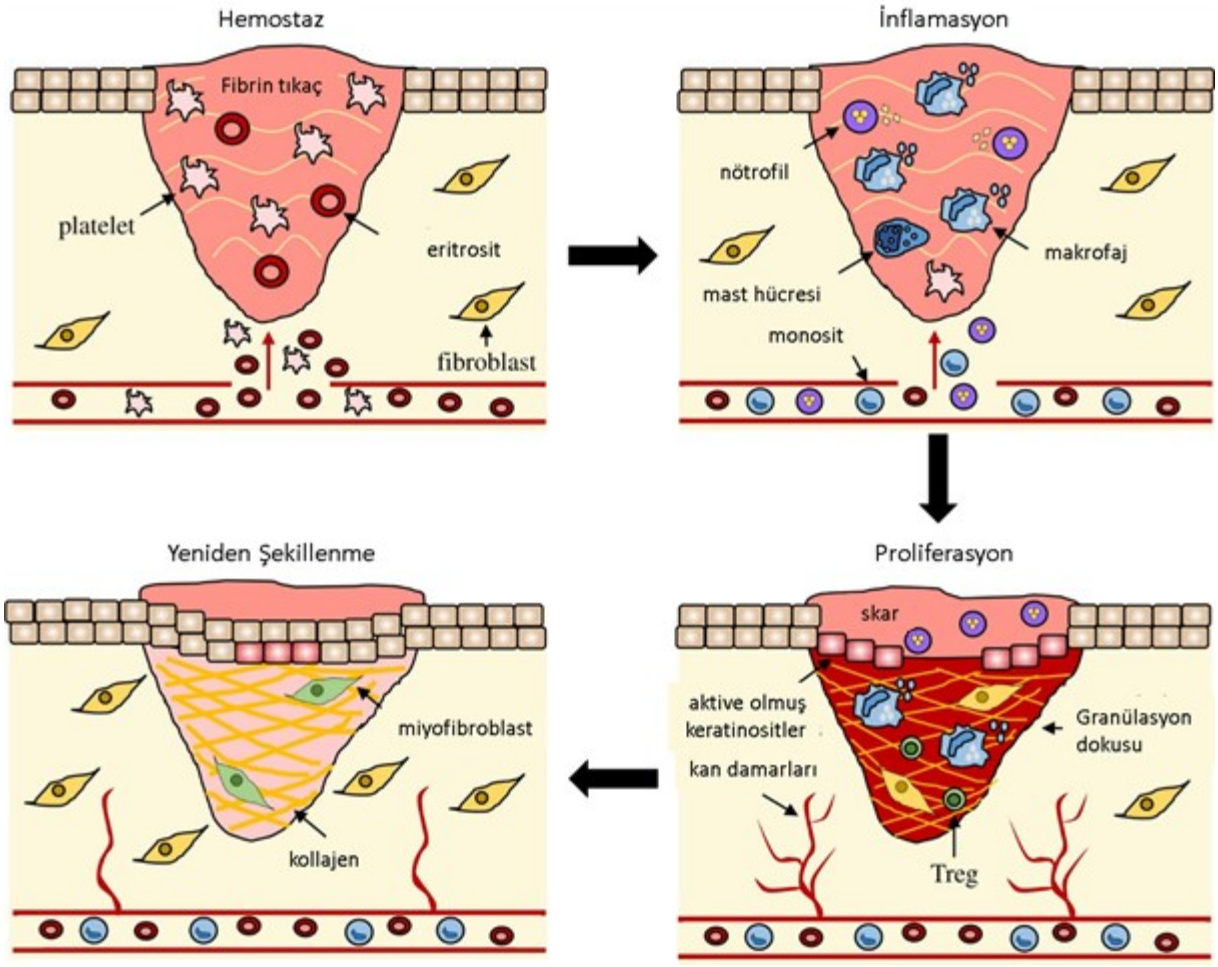
Tablo 2.1: Yara iyileşmesinde etkinlik gösteren sitokinler, büyüme faktörleri ve etkinlik gösterdikleri hücre tipleri

Sitokin	Ana Kaynak
Epidermal Büyüme Faktörü Ailesi	
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	Platelet
Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Alfa (TGF-α)	Makrofaj, Epitel Hücre
Heparin-bağlayan Epidermal Büyüme Faktörü	Makrofaj
Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) Ailesi	
Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü	Makrofaj, Epitel Hücre
Asidik Fibroblast Büyüme Faktörü	Makrofaj, Epitel Hücre
Keratinosit Büyüme Faktörü	Fibroblast
Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta Ailesi	
Dönüştürücü Büyüme Faktörü – Beta 1 ve Beta 2 (TGF-β1, TGF-β2)	Platelet, Makrofaj
Dönüştürücü Büyüme Faktörü – Beta 3 (TGF-β)	Makrofaj
Diğer	
Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	Platelet, Makrofaj, Epidermal hücreler
Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	Makrofaj, Epidermal hücreler
Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF-α)	Nötrofil
İnterlökin 1 (IL-1)	Nötrofil
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 (IGF-1)	Fibroblast, Epidermal hücreler
Koloni Uyarıcı Faktör I (CSF)	Çok çeşitli hücre tiplerinde

Proliferatif faz, fibroblastların göçünü ve çoğalmasını içerir. Bu fibroblast hücreleri, büyük ölçüde fibronektin, hyaluronik asit ve kollajen tip I ve III'ten oluşan ECM'nin üretilmesinden doğrudan sorumludurlar (Singer ve Clark, 1999). Miyofibroblastların, kollajenden zengin bağ dokusunun üretimi ve yara kontraksiyonu gibi görevleri de bulunmaktadır (Desmouliere ve diğ., 2005). Bu aşamada, iyileşen dokuya oksijen ve besinlerin verilmesi esastır. Bu süreç, endotelyal hücre göçü ve kapiller oluşumu gerektiren anjiyogenez ile gerçekleştirilir. Keratinositler, yaralanmadan saatler sonra başlayan ve yara

kapanana kadar devam eden yara yüzeyinin yeniden epitelizasyonundan sorumludur (Singer ve Clark, 1999). Yara granülasyon dokusu, ECM üretimi ve ayrıca anjiyogenezin desteklenmesi için gerekli bileşenleri içerir ve bu nedenle, yaranın nasıl iyileştiğinin önemli bir belirleyicisidir (Miller ve diğ., 2005).

Son yeniden şekillenme aşaması, kollajenin organize yıkımını ve birikmesini içeren, devam eden dinamik bir süreçtir (Broughton ve diğ., 2006). Yara iyileşmesinin tüm aşamalarında birçok hücre kendi rollerini tamamladıktan sonra apoptoza uğrar (Greenhalgh, 1998). Sürecin karmaşıklığı, iskemi ve enfeksiyon gibi yerel olarak etkileyen değişken faktörlerin yanı sıra yaş, beslenme durumu ve diyabetes mellitus gibi birçok sistemik faktör tarafından güçlendirilir (Harvey, 1995). Normal yara iyileşmesinin nihai sonucu, önemli fonksiyonel ve estetik bozuklukları olan skar dokusunun oluşmasıdır. Ayrıca bazı durumlarda düzensiz veya yetersiz onarım süreçleri hipertrofik skarlara, keloid skarlara veya kronik iyileşmeyen yaralara neden olur.



Şekil 2.1: Yara iyileşmesinin basamaklarına genel bakış (Wilkinson ve Hardman (2020)'den uyarlanmıştır)

2.3.1 İyileşmede ilk adım: İnflamasyon

Doku hasarı, kan damarlarının bozulmasına ve kan bileşenlerinin ekstravazasyonuna neden olur. Kan pıhtısı, hemostazı yeniden kurar ve hücre göçü için geçici bir ECM sağlar. Plateletler, sadece hemostatik tıkaç oluşumunu kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda makrofajları ve fibroblastları çeken ve aktive eden platelet aracılı büyüme faktörü (PDGF) gibi çeşitli yara iyileşmesi aracıları salgılar. Yaralanmada kanama yoksa plateletler, yara iyileşmesi için gerekli değildir. Çok sayıda vazoaktif aracılar ve kemotaktik faktörler, pıhtılaşma ve aktive edilmiş tamamlayıcı yollar ve hasarlı veya aktive edilmiş parankimal hücreler tarafından üretilir. Bu maddeler, inflamatuvar lökositlerin yaralanma bölgesine taşınmasına aracılık ederler (Heldin ve Westermark, 1995).

Yara bölgesine sızan nötrofiller, yaralı bölgeyi yabancı partiküllerden ve bakterilerden temizler ve daha sonra makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Monositler de, ECM protein parçaları, dönüştürücü büyüme faktörü-β (TGF-β) ve monosit kemoatraktan protein 1 gibi özel kemoatraktanlara yanıt olarak, yara bölgesine sızarlar ve granülasyon dokusunun oluşumunu başlatan ve PDGF ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) salınımı yapan aktif makrofajlar haline gelirler. PDGF ve VEGF'leri serbest bırakan aktive makrofajlar haline gelirler. Makrofajlar, integrin reseptörleri aracılığıyla ECM'nin özel proteinlerine bağlanarak mikroorganizmaların fagositozunu ve ECM fragmanlarını uyaran bir eylemi gerçekleştirmiş de olurlar (Brown, 1995).

ECM'yi yapışma, monositleri inflamatuvar veya onarıcı makrofajlara dönüşümü için de uyarır. Yapışma, monositlerin ve makrofajların hayatta kalması için gerekli bir sitokin olan koloni uyarıcı faktör-1 (CSF-1)'i ifade etmek üzere monositleri ve makrofajları; güçlü bir inflamatuvar sitokin olan TNF-α'yı ve fibroblastlar için güçlü bir kemoatraktan ve mitojen olan PDGF'yi indükler (Rappolee ve diğ., 1988). Monositler ve makrofajlar tarafından ifade edilen diğer önemli sitokinler, TGF-α, interlökin-1 (IL-1), TGF-β ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1)'dir (Singer ve Clark, 1999). Monosit ve makrofajdan türetilen büyüme faktörleri, yaralarda yeni doku oluşumunun başlatılması ve yayılması için neredeyse kesinlikle gereklidir, çünkü makrofajdan yoksun hayvanlarda yara onarımı kusurludur (Leibovich ve Ross, 1975). Bu nedenle, makrofajların inflamasyon ve yara iyileşmesi arasındaki geçişte çok önemli bir rolü olduğu görülmektedir (Riches, 1996).

2.3.2 Epitelizasyon

Yaraların yeniden epitelizasyonu, yaralanmadan sonraki saatler içinde başlar. Kıl folikülleri gibi deri eklerinden gelen epidermal hücreler, pıhtılaşmış kanı ve hasarlı stromayı yara alanından hızla uzaklaştırır. Aynı zamanda hücreler, hücreler arasındaki çoğu etkileşimin çözülmesi, hücre hareketine izin veren periferik sitoplazmik aktin filamentlerinin oluşumu ve hücre içi tonofilamentlerin geri çekilmesini içeren belirgin fenotipik değişikliklere uğrarlar (Gabbiani ve diğ., 1978; Goliger ve Paul, 1995).

Ayrıca, epidermal ve dermal hücreler, epidermal hücrelerin yanal hareketine izin veren epidermis ve bazal membran arasındaki hemidesmozom bağlantılarının çözünmesi nedeniyle artık birbirine yapışmaz. Epidermal hücreler üzerindeki integrin reseptörlerinin ifadesi, bu hücrelerin, yaranın kenarında stromal tip I kollajen ile serpiştirilmiş ve yara boşluğundaki fibrin pıhtısı ile iç içe geçmiş çeşitli ECM proteinleri ile etkileşime girmesine izin verir (Clark ve diğ., 1996; Larjava ve diğ., 1993; Clark, 1990). Göç eden epidermal hücreler, kurumuş yarayı canlı dokudan ayırarak yaraya nüfuz ederler. Bu ayırma yolu, göç eden epidermal hücrelerin hücre zarlarında ifade ettiği integrin dizisi tarafından belirleniyor gibi görünmektedir.

Epidermal hücrelerin kollajenöz dermis ve fibrin yara kalıntısı arasında göç etmesi durumunda gerekli olan ECM'nin bozunması epidermal hücreler tarafından kollajenaz üretimine ve epidermal hücreler tarafından üretilen plazminojen aktivatörü tarafından aktif hale getirilen plazmine aktivasyonuna bağlıdır (Bugge ve diğ., 1996; Pilcher ve diğ., 1997). Plazminojen aktivatörü ayrıca kollajenazı (matris metalloproteinaz-1 (MMP-1)) aktive eder, dolayısıyla kollajen ve ECM proteinlerinin bozulmasını kolaylaştırır (Mignatti ve diğ., 1996).

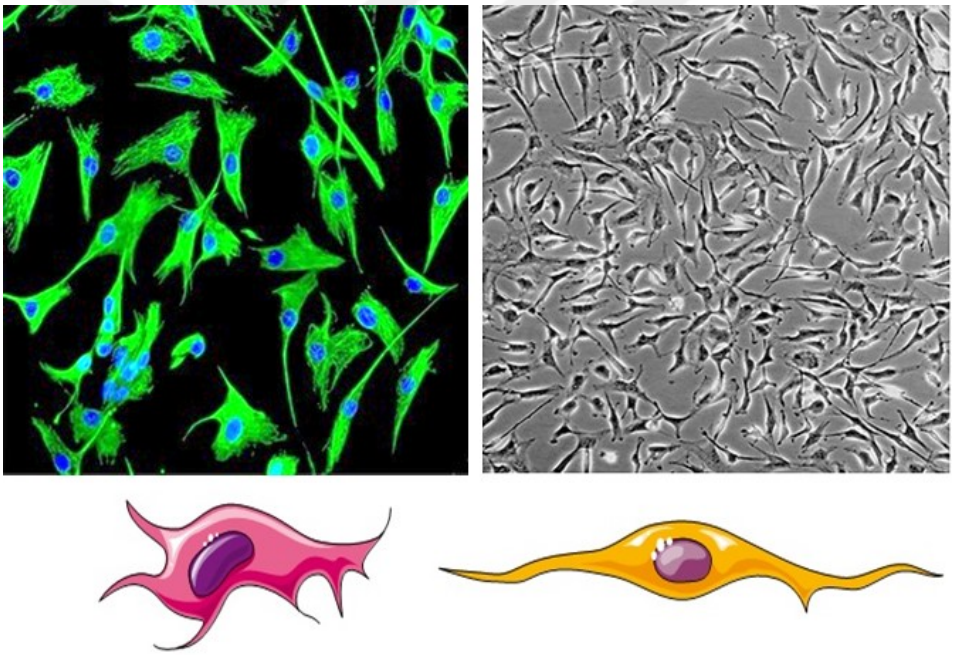
Yaralanmadan 1-2 gün sonra, yara kenarındaki epidermal hücreler aktif olarak göç eden hücrelerin arkasında çoğalmaya başlar. Yeni epitel hücrelerinin yapımı (reepitelizasyon) sırasında, epidermal hücrelerin göçü ve proliferasyonu için uyaranlar çok net olmamakla birlikte, yaranın kenarında komşu hücrelerin olmaması ("serbest kenar" etkisi) epidermal hücrelerin hem göçünü hem de çoğalmasını teşvik edebilmektedir. Büyüme faktörlerinin yerel salınımı ve büyüme faktörü reseptörlerinin artan ifadesi de bu süreçleri uyarabilir (Abraham ve diğ., 1996). Yeniden epitelizasyon meydana geldikçe bazal membran proteinleri, yaranın kenarından içeriye doğru çok düzenli bir sırayla, fermuar benzeri bir tarzda yeniden ortaya

çıkarlar. Epidermal hücreler, bir kez daha yeniden kurulan bazal membrana ve alttaki dermise sıkıca bağlanarak normal fenotiplerine dönerler (Clark ve diğ., 1982).

2.3.3 Granülasyon dokusunun oluşması

Genellikle granülasyon dokusu olarak adlandırılan yeni stroma, yaralanmadan yaklaşık dört gün sonra yara boşluğunu istila etmeye başlar. Çok sayıda yeni kılcal damar, yeni stromaya granüler bir görünüm kazandırır. Makrofajlar, fibroblastlar ve kan damarları aynı anda yara boşluğuna hareket eder (Hunt ve diğ., 1980).

Makrofajlar, fibroplaziyi ve anjiyogenezi uyarmak için gerekli olan sürekli bir büyüme faktörü kaynağı sağlar. Fibroblastlar (Şekil 2.2), hücre büyümesini desteklemek için gerekli olan yeni ECM'yi üretirken kan damarları da, hücre metabolizmasını sürdürmek için gerekli oksijen ve besinleri taşır.



Şekil 2.2: Fibroblast hücreleri. Floresan mikroskobu altında (sol üst) ve ışık mikroskobunda çekilmiş (sağ üst) fibroblast hücreleri (biorender.com ile oluşturulmuştur)

Özellikle PDGF ve TGF-β1 gibi büyüme faktörleri, ECM molekülleri ile uyum içinde, yara çevresindeki doku fibroblastlarını, uygun integrin reseptörlerini ifade etmek ve yaraya göç etmek için uyarırlar (Singer ve Clark, 1999).

Geçici matris olarak adlandırılan yeni oluşturulmuş ECM yapısal molekülleri, hücre göçü için bir iskele veya kanal sağlayarak granülasyon dokusunun oluşumuna katkıda

bulunurlar. Bu moleküller arasında fibrin, fibronektin ve hyaluronik asit bulunur (Toole ve diğ., 1991; Greilling ve diğ., 1997). Aslında, fibronektin ve fibroblastlar üzerinde fibronektin, fibrin veya her ikisini bağlayan uygun integrin reseptörlerinin görünümü, granülasyon dokusunun oluşumunda hız sınırlayıcı adım gibi görünmektedir (McClain ve diğ., 1996; Xu ve diğ., 1996). Fibroblastlar, ECM'nin sentezinden, birikmesinden ve yeniden şekillenmesinden sorumludur. ECM ise tersine; fibroblastların sentezleme, biriktirme, yeniden modelleme ve genellikle ECM ile etkileşime girme yeteneği üzerinde olumlu veya olumsuz bir etkiye sahip olabilir (Xu ve diğ., 1996; Clark ve diğ., 1995).

Çapraz bağlı fibrinden oluşan bir kan pıhtısına veya sıkı dokunmuş ECM'ye hücre hareketi, hücre göçü için bir yol açabilen aktif bir proteolitik sistem gerektirebilir. Serumdan türetilen plazmine ek olarak çeşitli fibroblast türevli enzimler, plazminojen aktivatörü, kollajenazlar, jelatinaz A ve stromelisin dahil olmak üzere bu görev için potansiyel adaylardır (Mignatti ve diğ., 1996; Vaalamo ve diğ., 1997). Yaralara göç ettikten sonra, fibroblastlar ECM'nin sentezini başlatır. Geçici ECM, belki de TGF-β1'in etkisinin bir sonucu olarak kademeli bir şekilde kollajenli bir matris ile değiştirilir (Clark ve diğ., 1995; Welch ve diğ., 1990). Yarada bol miktarda kollajen matrisi biriktiğinde, fibroblastlar kollajen üretmeyi durdurur ve fibroblasttan zengin granülasyon dokusunun yerini nispeten hücresiz bir yara alır. Yaradaki hücreler, bilinmeyen sinyaller tarafından tetiklenen apoptoza uğrarlar. Bu süreçlerin aksaması; keloid oluşumuyla, morfea ve skleroderma gibi fibrotik bozukluklarla kendini gösterir.

2.3.4 Neovaskülarizasyon (Yara Sonrası Damar Oluşumu)

Yeni oluşan granülasyon dokusunu sürdürmek için yeni kan damarlarının oluşumu gereklidir. Anjiyogenez, yara yatağındaki ECM'nin yanı sıra endotel hücrelerinin göçü ve mitojenik uyarısına dayanan karmaşık bir süreçtir (Madri ve diğ., 1996).

Anjiyogenezin uyarılması, başlangıçta asidik veya bazik fibroblast büyüme faktörleri (FGF)'ne bağlanmış olsa da sonrasında VEGF, TGF-β, anjiyogenin, anjiyotropin, anjiyopoietin-1 ve trombospondin dahil olmak üzere birçok başka molekülün de anjiyojenik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Iruela-Arispe ve diğ., 1997; Folkman ve diğ., 1996; Risau ve diğ., 1997). Düşük oksijen gerilimi ve yüksek laktik asit de anjiyogenezi uyarabilir. Yukarıda bahsedilen moleküllerin birçoğunun, makrofajlar ve endotelyal hücreler tarafından bazik FGF ve VEGF'nin üretimini uyararak anjiyogenezi indüklediği görülmektedir. Yaranın

aktive edilmiş epidermal hücreleri, büyük miktarlarda VEGF salgılar. Bazik FGF, yara onarımının ilk üç günü boyunca anjiyogenez için zemin hazırlayabilirken VEGF, 4. ila 7. günlerde granülasyon dokusu oluşumu sırasında anjiyogenez için kritik öneme sahiptir (Nissen ve diğ., 1998; Brown ve diğ., 1992; Detmar ve diğ., 1997).

Anjiyogeneze yol açan olaylar dizisi için şu varsayımın doğru olması muhtemeldir: Yaralanma doku yıkımına ve hipoksiye neden olur. Asidik ve bazik FGF gibi anjiyogenez faktörleri, hücre bozulmasından sonra makrofajlardan hemen salınır ve epidermal hücreler tarafından VEGF'nin üretimi hipoksi ile uyarılır. Bağ dokusuna salınan proteolitik enzimler, ECM proteinlerini bozar. Bu proteinlerin parçaları, periferik kan monositlerinin aktive makrofajlar haline geldikleri ve anjiyogenez faktörlerini serbest bıraktıkları yaralanma bölgesine hareketini teşvik ederler. Bazik FGF gibi belirli makrofaj anjiyogenez faktörleri endotel hücrelerini plazminojen aktivatörü ve prokollajenaz salması için uyarır. Plazminojen aktivatörü plazminojeni plazmine ve prokollajenazı aktif kollajenaza dönüştürür. Uyum içindeki bu iki proteaz, bazal membranları sindirir. Bazal membranın parçalanması, anjiyogenez faktörleri tarafından uyarılan endotel hücrelerinin hasarlı bölgeye göç etmesine ve yeni kan damarları oluşturmasına izin verir.

Yara yeni granülasyon dokusu ile dolduğunda, anjiyogenez apoptozun bir sonucu olarak durur ve yeni kan damarlarının çoğu parçalanır (Ilan ve diğ., 1998). Bu programlanmış hücre ölümü, muhtemelen trombospondin-1 ve -2 gibi çeşitli matris molekülleri ve anjiyostatin, endostatin ve anjiyopoietin-2 gibi antianjiyogenez faktörleri tarafından düzenlenir (Folkman ve diğ., 1997; Guo ve diğ., 1997).

2.3.5 Yara Kasılması ve Hücre Dışı Matrisin Yeniden Düzenlenmesi

Yara kasılması, hücrelerin ECM'nin ve sitokinlerin karmaşık ve mükemmel bir şekilde düzenlenmiş etkileşimini içerir. İyileşmenin ikinci haftasında fibroblastlar, hücrelerin plazma membranının sitoplazmik yüzü boyunca yerleştirilmiş büyük aktin içeren mikrofilament demetleri ve hücre-hücre ve hücre-matris bağlantıları ile karakterize edilen bir miyofibroblast fenotipi alır (Welch ve diğ., 1990; Desmoulière ve diğ., 1996). Miyofibroblastların görünümü, bağ dokusu sıkışmasının başlamasına ve yaranın kasılmasına karşılık gelmektedir. Kasılma muhtemelen; TGF-1, TGF-2 ve PDGF'nin uyarımını, fibroblastların integrin reseptörleri aracılığıyla kollajen matriksine bağlanmasını ve bireysel kollajen demetleri arasındaki çapraz bağları gerektirmektedir.

Granülasyon dokusundan yara izine geçiş sırasında kollajen yeniden şekillenmesi, kollajenin düşük oranda devam eden sentezine ve katabolizmasına bağlıdır. Yaradaki kolajenin parçalanması makrofajlar, epidermal hücreler ve endotel hücreleri ile fibroblastlar tarafından salgılanan, MMP'ler olarak adlandırılan birkaç proteolitik enzim tarafından kontrol edilir. Yara onarımının çeşitli aşamaları MMP'lerin ve metalloproteinazların doku inhibitörlerinin farklı kombinasyonlarına dayanır (Mignatti ve diğ., 1996; Madlener ve diğ., 1998).

Yaralar, ilk üç hafta içinde son güçlerinin sadece %20'sini kazanır, bu süre zarfında fibriller kollajen nispeten hızlı bir şekilde birikmiş ve yaranın kasılması ile yeniden şekillenmiştir. Bundan sonra, yaraların gerilme gücü kazanma hızı yavaştır, çok daha yavaş bir kolajen birikim oranını ve daha da önemlisi, daha büyük kollajen demetlerinin oluşumu ve moleküller arası çapraz bağların sayısında bir artışla kollajenin yeniden şekillenmesi gözlenir. Bununla birlikte, yaralar asla zarar görmemiş cilt ile aynı güce (cildin kırıldıktan sonraki gerilimine) ulaşamaz. Maksimum güçte bile, bir yara izi normal cildin sadece %70'i kadar güçlü olabilmektedir (Levenson ve diğ., 1965; Bailey ve diğ., 1975).

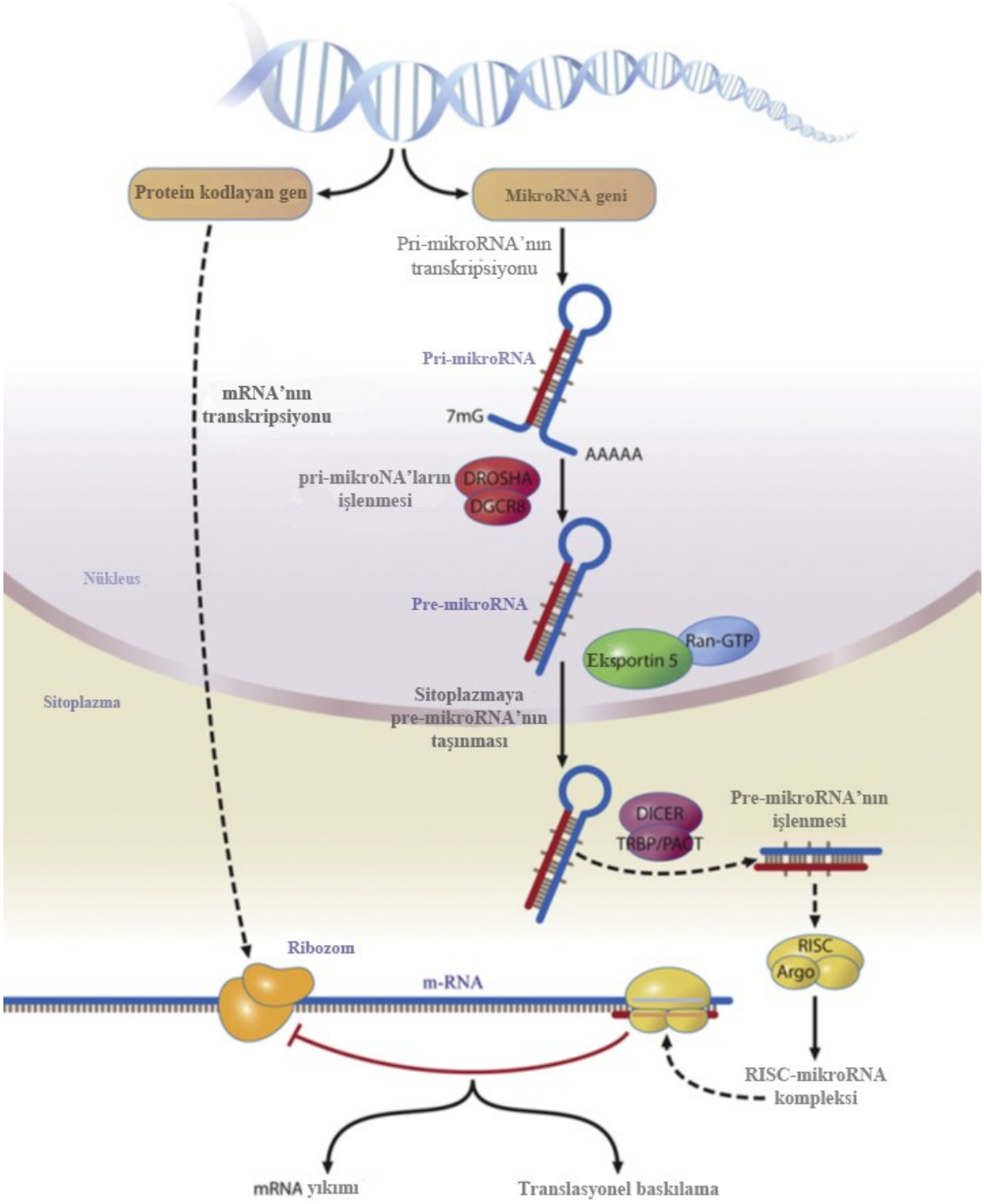
2.4 YARA İYİLEŞMESİNİN GENETİĞİ

Yakın zamanda kodlanmayan RNA'ların hemen hemen her gen regülasyonunda etkinliklerinin varlığı bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. Bunlardan en çarpıcı olanı mikroRNA (miRNA)'lardır.

MiRNA'lar, çok çeşitli hücresel süreçlerin temel düzenleyicileri olan, yaklaşık olarak 22 nükleotid uzunluğundaki kodlanmayan RNA molekülleridir. Özellikle memelilerde, ya mRNA bozulmasını teşvik ederek ya da mRNA translasyonunu inhibe ederek gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Bartel ve diğ., 2004). miRNA'nın ifadesi için üç farklı transkripsiyonel düzenleyici mekanizma tanımlanmıştır. İntronik miRNA'lar, gen transkript öncülerinde kodlanır ve kodlanmış gen transkriptleriyle aynı promotörü paylaşır. Biyogenezleri için tip II RNA polimerazları (Pol-II) ve splayzomal bileşenleri gerektirirler. İntergenik miRNA'lar kodlamayan bölgelerde bulunur ve tanımlanamayan promotörler tarafından kopyalanır (Lin ve diğ., 2006). Üçüncü grup, farklı miRNA'lara yol açan farklı saç tokaları ile birden fazla saç tokası içeren birincil transkriptlerden türetilen polisistronik miRNA'lar olarak adlandırılır (Ambros ve diğ., 2003). MiRNA'ların biyogenezi karmaşıktır

ve birkaç adım içerir. Protein kodlayan genlere benzer şekilde miRNA'lar, memeli hücrelerinde Pol II tarafından kopyalanır. Birincil miRNA transkripti (pri-miRNA) genellikle birkaç kilobaz uzunluğundadır, 3' ucunda poliadenillenmiş ve 5' ucunda 7-metilguanozin başlığı ile kapatılmıştır (Lee ve diğ., 2002). Daha sonra intranükleer RNaz III enzimi Drosha, birden fazla miRNA saç tokası içerebilen pri-miRNA'yı birkaç öncü miRNA'ya (pre-miRNA'lar) ayırır (Lee ve diğ., 2003). Hem Drosha hem de onun kofaktörü DGCR8/Pasha, daha sonra pri-miRNA'yı, pri-miRNA saç tokalarının tabanında bulunan ssRNA/dsRNA bağlantısında kesen mikroişlemci kompleksini oluşturur. Kesiğin uzunluğu yaklaşık bir dsRNA sarmal dönüşüdür ve küçük bir 3' çıkıntı bırakır (Han ve diğ., 2004). Ortaya çıkan Öncül miRNA (pre-miRNA)'lar 70-90 nt uzunluğundadır ve karakteristik saç tokası ikincil yapılara sahiptir. Pre-miRNA ayrıca, kofaktörü Ran-guanin trifosfataz varlığında eksportin 5 ile bağlanan 3' ucunda 2 nt'lik bir çıkıntı içerir (Bohnsack ve diğ., 2004).

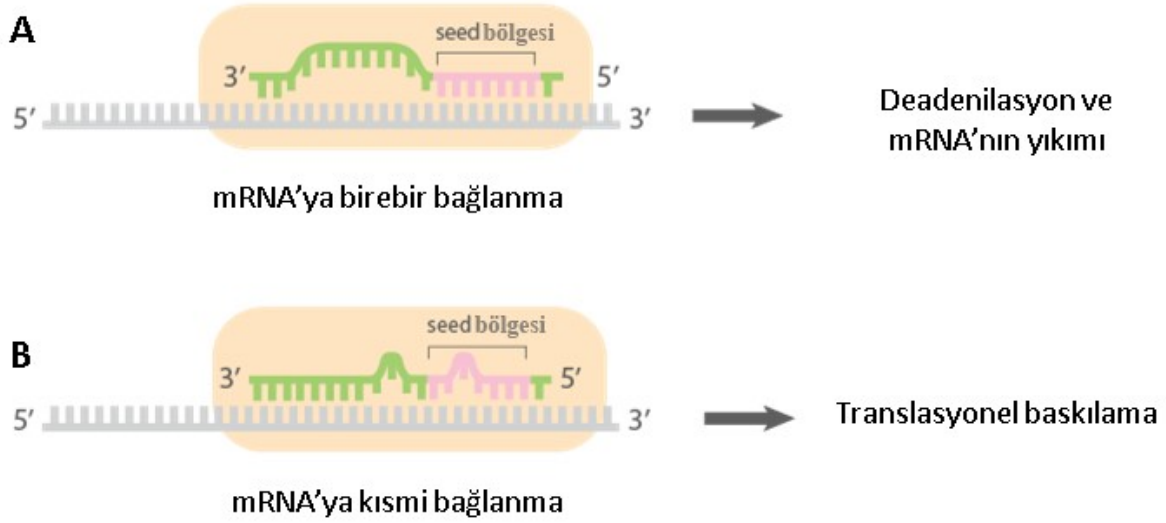
Eksportin 5, nükleositoplazmik taşıma faktörlerinin karyoferin ailesine aittir ve pre-miRNA‘yı sitoplazmaya taşır (Yi ve diğ., 2003). Pre-miRNA sitoplazmaya aktarıldıktan sonra, Dicer adlı ikinci bir RNaz III enzimi, pre-miRNA'yı birkaç kofaktörün (TAR RNA-Bağlayan Protein ve PACT) yardımıyla işler. Dicer, pre-miRNA'yı 3' ucundan önceden belirlenmiş bir mesafede keser ve 3' ucunda 2 nükleotit çıkıntısı bulunan 21 ila 27 nükleotit uzunluğunda kısa fragmanlarla sonuçlanır (Lee ve diğ., 2006). Dicer ile işleme, olgun bir miRNA ipliği ve bozunan bir karşıt zincir ile sonuçlanır. MiRNA artık RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) dahil edilmeye hazırdır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: miRNA biyogenezi (Sand ve diğ. (2009)'den uyarlanmıştır)

Olgun miRNA'nın 3' ucu, bir Argonat proteini yardımıyla RISC'e yüklendikten hemen sonra gen ifadesini modüle etme yeteneğine sahip olur (Song ve diğ., 2003). Entegre miRNA, RISC'i baz çifti eşleşmesi yoluyla özel mRNA hedefine yönlendirir ve RISC translasyonu bozmak için hedef mRNA'ya bağlanır.

MiRNA ve hedef mRNA arasındaki eşleşme derecesine bağlı olarak, RISC aracılı gen düzenlemesinin iki farklı mekanizması meydana gelir. Eşleşme %100' e yakın seyrediyorsa RISC hedef mRNA'yı parçalar (Dalmay ve diğ., 2008), böylece translasyonunu önler. Kısmi eşleşme durumunda ise translasyon, mRNA'nın 5' başlığının çıkarılması ve/veya 3' deadenilasyon ile baskılanır (Reinhart ve diğ., 2000) (Şekil 2.4). İnsanlarda, şimdiye kadar tanımlanan 700 civarında farklı miRNA'nın genomdaki tüm genlerin yaklaşık %30'unu kontrol ettiği tahmin edilmektedir (Griffiths-Jones ve diğ., 2008).



Şekil 2.4: Farklı miRNA davranışları. Hedef bölgeyle bire bir eşleşme durumunda hedef mRNA hızlıca yıkılır (A). Hedef bölgeyle eşleşme kısmi şekilde gerçekleştiğinde önce translasyon durdurulur, daha sonra serbest kalan mRNA yıkılır (B) (abmgood.com sitesinden uyarlanmıştır).

Deri, insan vücudundaki en büyük organı temsil ettiğinden, morfogenezinin yüksek düzeyde koordineli ve kesintisiz miRNA metabolizması gerektirdiği bilinmektedir. Öyle ki, normal cilt gelişimi için epidermis ve saç foliküllerinde birkaç miRNA'nın yüksek ifadesinin gerekli olduğunu önceki bir çalışmadan biliyoruz. Bu çalışmaya göre, bir fare embriyonik deri modeli kullanılarak progenitör hücreler, miRNA biyogenezinde yer alan çok önemli bir enzim olan nakavt edilmiş Dicer için hedeflendiğinde Dicer nakavt farelerdeki deri epitelinin olgun miRNA'lar üretemediği ve embriyonik saç köklerinin normal olan dermise doğru yayılmak yerine epidermise doğru yayıldığı gösterilmiştir (Yi ve diğ., 2006).

2.4.1 miRNA ve Yara İyileşmesi

MiRNA'ların yara iyileşmesindeki rolleri net olarak tanımlanmamıştır ve günümüzde mevcut olan bazı yayınlanmış verilere dayanmaktadır. Bununla birlikte, yara iyileşmesinin

farklı yönlerine değinen apoptoz veya anjiyogenez gibi miRNA tutulumunun birkaç noktası vardır. Bu yüzden miRNAlar gelecekte, yara iyileşmesi araştırmaları için potansiyel olarak bir ilgi alanı olacaktır. Yara iyileşmesinin vazokonstriksiyon-damar yapımı ve inflamasyon aşamalarında plateletler, PDGF, platelet faktör IV ve TGF-β dahil olmak üzere çeşitli sitokinler salgılar. miR-140'ın zebra balığı *Pdgf*-α üzerinde modüle edici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Eberhart ve diğ., 2008). İnsan *PDGF* yollarının miRNA düzenlemesi üzerine çalışmalar henüz rapor edilmemiş olsa da, mevcut çabalara dayanarak bunların yara iyileşmesine katılımı beklenebilir. Benzer şekilde, miR-24 transkripsiyonunun, yara iyileşmesi sırasında fibroblastik mitozun bir modülatörü olan TGF-β1 tarafından baskılandığı gösterilmiştir (Sun ve diğ., 2008). Proliferatif fazda, polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar yara bölgesine göç eder ve FGF, TGF-β ve TGF-α, TNF, PDGF, plazma ile aktive olan C3a ve C5a ve IL-1 gibi çeşitli kemotaktik faktörleri serbest bırakırlar.

TNF-α, miR-146a hedefleri tarafından düzenlenir ve *TNF*-α'nın transkripsiyon sonrası baskısı doğrudan miR-125b tarafından hedeflenmektedir (Taganov ve diğ., 2006; Tili ve diğ., 2007). Fibroplazi; matris birikimi, anjiyogenez ve yeniden epitelizasyon, yeniden şekillenme aşamasında meydana gelir. Bu süreçte, fibroblastlar kollajen ve proteoglikan üretmeye başlarlar. Yara iyileşmesi sırasında önemli bir süreç olan anjiyogenez ile birlikte granülasyon dokusu oluşumu da başlatılır. Dicer, hem in vivo hem de in vitro anjiyogenez sırasında çok önemli bir rol oynadığından miRNA'ların anjiyogenezdeki rolü çok sayıda çalışmanın da konusu olmuştur (Kuehbacher ve diğ., 2008). Bununla birlikte, miR-221 ve miR-222'nin aşırı ekspresyonunun, birçok endotel hücre fonksiyonu için gerekli olan endotelyal nitrik oksit sentazın ifadesini dolaylı olarak azalttığı bulunmuştur (Suarez ve diğ., 2007). Özetlemek gerekirse miRNA'lar, yara iyileşmesini etkileyen birçok faktörün düzenlenmesinde rol oynuyor gibi görünmektedir ve potansiyel olarak yeni terapötik yaklaşımlar için umut uyandırmaktadır.

3 YÖNTEM

3.1 HÜCRE KÜLTÜRÜ

Çalışmada kullanılan NIH/3T3 fare fibroblast hücre hattı Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'den temin edildi. NIH/3T3 fare embriyonik fibroblast hücre hattı %10'luk fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM F-12 besiyerinde 37ºC'de, %95 nem ve %5 CO_2'li inkübatörde kültür ortamında çoğaltıldı.

Kültür kabı yaklaşık %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman pasajlanarak büyümesi sağlandı ve deneylerde kullanıldı. Hücreleri pasajlamak için kaptan besiyer uzaklaştırılıp 37ºC'deki dPBS ile yıkandı. % 0,25'lik Tripsin/EDTA solüsyon eklenip inkübatörde 5 dk bekletildi ve hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı ters mikroskop ile kontrol edildi. Hücreler yüzeyden kalktıktan sonra enzim aktivitesini durdurmak için 3 katı kadar serumlu besiyer eklendi. Hücreler falkona aktarılıp 5 dk 200xg'de santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırılıp hücreler sayıldıktan sonra uygun hücre sayısı hesaplanıp falkona besiyer eklendi.

PZR, FTIR spektroskopisi ve yara iyileşmesi analizi için 24 kuyucuklu hücre kabına kuyucuk başına yaklaşık 50.000 hücre ve hücre canlılığı analizi için ise 96 kuyucuklu kültür kabına kuyucuk başına yaklaşık 10.000 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi. Hücreler %70-90 konflüent olana kadar bir CO_2 inkübatöründe 37˚C'de inkübe edildi.

3.2 DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Belirlemiş olduğumuz iki miRNA olan miR-99a-3p ve mir-877'nin 3T3 fibroblastları üzerindeki etkisini görmek için hücreler mimik veya inhibitörler ile transfekte edildi. MiRNA'lardan biri olgun miRNA, diğeri de öncül miRNA olduğu için aynı formdaki miRNA'ları kullanmak adına mir-877'nin olgun formu olan miR-877-5p ve miR-877-3p deneylerde kullanıldı. Negatif kontrol, miR-99a-3p, miR-877-5p, miR-877-3p ve bu üç miRNA'nın üçlü etkisini görmek için ise üç genin bir arada bulunduğu kombine miRNA mimik veya inhibitör grubu oluşturuldu. PZR çalışması ve FTIR spektroskopisi için her

grupta 5 örnek yer alırken yara iyileşmesi analizinde her grupta 4 örnek ve hücre canlılığı analizinde ise her grupta 3 örnek yer aldı.

3.3 3T3 HÜCRELERİNİN MİRNA ile TRANSFEKSİYONU

Hücreler belli bir yoğunluğa ulaşınca transfeksiyon deneylerine başlandı.

Her bir kuyucuk başına, steril mikro santrifüj tüplerinde aşağıdaki solüsyonlar hazırlandı:

Solüsyon A: 50 nmol/L RNAi oligosu (ABM) 25 µl serumsuz, antibiyotiksiz OPTIMEM besiyerinde seyreltildi.

Solüsyon B: Kullanmadan önce RNAifectinTM reaktifi (ABM) iyice karıştırıldı, daha sonra 25 µl serumsuz, antibiyotiksiz OPTİMEM besiyerinde 2,725 µl reaktifi seyreltildi.

Solüsyon A ve B 5 dakika boyunca oda sıcaklığında ayrı olarak inkübe edildi. Daha sonra A ve B çözeltileri birleştirildi, homojen dağılım sağlamak için iyice karıştırıldı ve RNA-lipozom komplekslerinin oluşmasını sağlamak için 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra RNAifectinTM - RNA kompleksine 0,4 ml serumsuz, antibiyotik içermeyen OPTIMEM besiyeri eklendi ve çözelti yavaşça karıştırıldı. Büyüme besiyeri hücrelerden uzaklaştırıldı. 24 kuyucuklu hücre kabındaki her bir kuyucuğa 0,45 ml ve 96 kuyucuklu hücre kabındaki her bir kuyucuğa ise 0,1 RNAifectinTM - RNA çözeltisi eklendi. 37˚C'de inkübe edildi.

5-8 saat sonra, transfeksiyon çözeltisi kültür ortamından uzaklaştırıldı. Serum ve antibiyotik içeren uygun büyüme besiyeri, 24 kuyucuklu kaplar için 0,5 ml ve 96 kuyucuklu kaplar için ise 0,1 ml her bir kuyucuğa eklendi. Hücreler 37˚C'de toplam 48 saat inkübe edildikten sonra deneylerde kullanıma hazır hale getirildi.

3.4 HÜCRELERDEKİ GEN İFADE DÜZEYLERİNİN ANALİZİ

Transfeksiyonun başarılı olup olmadığının test edilmesi için transfeksiyon sonrasında elde edilen hücrelerden RNA saflaştırıldıktan sonra miR-99a-3p, miR-877-5p, miR-877-3p ve housekeeping gen olan *U6*'nın gen ifade düzeylerine bakıldı. miRNA ifade seviyesindeki değişimler görüldükten sonra çalışmalara başlandı. miRNA'ların, hedefi olarak belirlediğimiz

genler üzerindeki etkilerine bakmak için saflaştırılmış olan bu RNA'lardan hedef olarak belirlediğimiz *Mapk1*, *Mmp9*, *Tagln*, *Tnf* ve housekeeping gen olan *Gapdh*'nin gen ifade düzeylerine bakıldı.

3.4.1 Hücrelerden Total RNA Saflaştırılması

RNA saflaştırılması için EZ-10 Spin Column Total RNA Minipreps Super Kit (Bio Basic Inc. Canada) kullanıldı. Transfeksiyondan 48 saat sonra kültür ortamındaki besiyer toplanıp nükleazsız steril 1,5 mLlik mikrotüplere konuldu ve FTIR spektroskopisi için deney gününe kadar -80˚C'de saklandı. Petride kalan tek tabakalı hücrelerin üzerine 350 µl RLT solüsyonu eklendi. Hücreler parçalandıktan sonra toplanıp 1,5 mLlik nükleazsız steril mikrotüplere konuldu. Oluşan lizat karışımının üzerine 350 µl %70lik etanol eklendi ve pipetlenerek iyice karıştırıldı. 2 mLlik toplama tüpünün içine EZ-10 döndürme kolonu yerleştirildi. Kolona etanollü karışım eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

Toplama tüpündeki sıvı atık atıldı. EZ-10 döndürme kolonuna 500 µl RW solüsyonu eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santfifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atık tekrardan atıldı. EZ-10 döndürme kolonuna 500 µl RPE solüsyonu eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santfifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atık tekrardan atıldı ve RPE solüsyonunu uzaklaştırmak için bir kere daha santrifüj edildi.

EZ-10 döndürme kolonu nükleazsız steril 1,5 mLlik mikrotüpe yerleştirildi. Kolonun merkezine 40 µl saf su eklendi, 50˚C'de 2 dakika inkübe edildi. 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Mikrotüpte toplanan total RNA'nın saflık ve konsantrasyon ölçümleri ELISA okuyucu Thermo Scientific Multiskan GO ile yapıldıktan hemen sonra RNA örnekleri deney gününe kadar -80˚C'de saklandı.

3.4.2 RNA'lardan cDNA sentezi

Bu aşama miRNA cDNA Synthesis Kit, with Poly(A) Polymerase Tailing (ABM) Kiti kullanılarak iki basamakta gerçekleştirildi. Ilk basamakta, total RNA içeriğinde yer alan miRNA'lara poli A kuyruğu eklendi.

RNA ve tüm reaktifler buz üzerinde çözüldü. Reaksiyon karışımı buz üzerinde bir tüpte Tablo 3.1'de verilen miktarlara göre hazırlandı.

Tablo 3.1: miRNA'ya poli A kuyruğu eklenmesi için hazırlanan karışım miktarları

Bileşenler	Miktar
RNA Kalıbı (400 ng)	1-5 µl
5X Poli(A) Polimeraz Reaksiyon Tamponu	2 µl
ATP (10 mM)	1,5 µl
25 mM $MnCl_2$	1 µl
Poli(A) Polimeraz (1 U/µl)	0,5 µl
RNaz içermeyen H_2O	10 µl'ye kadar

Reaksiyon karışımı tüpe konulduktan sonra 37˚C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyon karışımına 2 µl miRNA Oligo (dT) Adaptörü (10 µM) eklendi. Poli (A) kuyruğu takılı RNA'ya adaptörün bağlanması için 65˚C'de 5 dakika inkübe edildi. Sonrasında hızlıca buz üzerinde soğutuldu.

İkinci basamakta ise aynı kit ile hem poli A kuyruğu eklenmiş miRNA'ların hem de mRNA'ların cDNA'ya dönüşümü için aynı kit kullanılarak deneylere devam edildi. Karışıma Tablo 3.2'te yer alan bileşenler eklendi.

Tablo 3.2: cDNA sentezi için kullanılan bileşenlerin miktarı

Bileşenler	Miktar
dNTP (10 mM)	1 µl
5X RT Tamponu	4 µl
OneScript® RTaz (200 U/µl)	1 µl
RNaz içermeyen H_2O	2 µl
Toplam Hacim	20 µl

Karışımlar eklendikten sonra 42˚C'de 25 dakika inkübe edildi, ardından 70˚C'de 10 dakika ısıtılarak reaksiyon hemen durduruldu ve buz üzerinde soğutuldu. Yeni sentezlenmiş miRNA ve mRNA'ların cDNA'ları deney gününe kadar -20˚C'de saklandı.

3.4.3 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

qPZR analizinde BrightGreen 2X qPCR MasterMix–No Dye (ABM, Richmond, BC, Canada) kullanılmıştır. Housekeeping ve hedef genler için Tablo 3.3'te yer alan primer setleri (Bio Basic Inc. Canada) tasarlandı ve miRNA primerleri ise hazır olarak alındı.

Tablo 3.3: PZR analizinde kullanılan primerler

Gen	İleri primer	Geri primer	Sıcaklık
miRNA	Hazır set	Universal Primer	63˚C
U6[1]	CGCTTCGGCAGCACATATAC	Universal Primer*	60˚C
Mapk1	GGTTGTTCCCAAATGCTGACT	CAACTTCAATCCTCTTGTGAGGG	57˚C
Mmp9	GCAGAGGCATACTTGTACCG	TGATGTTATGATGGTCCCACTTG	57˚C
Tagln	GTGTGATTCTGAGCAAATTGGTG	ACTGCTGCCATATCCTTACCTT	57,5˚C
Tnf	CCTGTAGCCCACGTCGTAG	GGGAGTAGACAAGGTACAACCC	59,2˚C
Gapdh[2]	TGGCCTTCCGTGTTCCTAC	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA	57˚C

[1]miRNA için kullanılan housekeeping gen, [2]mRNA için kullanılan housekeeping gen, *miRNA primerleri için kullanılan Universal primer ile daha iyi sonuç alındığı için universal primer ile deneylere devam edildi.

Master karışım, cDNA, primerler ve nükleazsız su buz üzerinde çözüldü (Tablo 3.4).

Tablo 3.4: PZR için kullanılan bileşenlerin miktarı

Bileşenler	Miktar
BrightGreen 2X qPCR MasterMix	10 µl
İleri Primer (10 µM)	0,6 µl
Geri Primer (10 µM)	0,6 µl
Template DNA (1:5)	2 µl
Nükleazsız H_2O	7,8 µl

miRNA'lar için Tablo 3.5, *U6* için Tablo 3.6 ve mRNA'lar için ise Tablo 3.7'de yer alan koşullar kullanılarak BioRad CFX96 qPCR cihazında PZR gerçekleştirildi. Her bir örnek 2 tekrarlı çalışıldı. Çoğaltılan gen ürünün doğruluğunu denetlemek için reaksiyon sonunda erime eğrisi analizi yapıldı. Sıcaklık 65ºC'den 95ºC'ye 5 snde 0,5ºC yükseltilerek erime eğrisi elde edildi.

Tablo 3.5: miRNA PZR'si için uygulanan koşullar

	Sıcaklık	Zaman	
Ön denatürasyon	95ºC	10 dk	
Denatürasyon	95ºC	10 sn	
Primer bağlanması	63ºC	15 sn	40 döngü
Zincir uzaması	60ºC	15 sn	

Tablo 3.6: U6 PZR'si için uygulanan koşullar

	Sıcaklık	Zaman	
Ön denatürasyon	95ºC	10 dk	
Denatürasyon	95ºC	15 sn	
Primer bağlanması	60ºC	15 sn	40 döngü
Zincir uzaması	60ºC	30 sn	

Tablo 3.7: mRNA PZR'si için uygulanan koşullar

	Sıcaklık	Zaman	
Ön denatürasyon	95ºC	10 dk	
Denatürasyon	95ºC	15 sn	
Primer bağlanması	*	15 sn	40 döngü
Zincir uzaması	60ºC	45 sn	

*Tablo 3.4'teki sıcaklık değerleri kullanıldı.

Analiz bittikten sonra göreceli kantitasyon analizi yapıldı. Ilk önce her bir örneğe ait olan 2 Ct değerinin ortalaması alındı. Hedeflenen genlerin Ct değerlerinden housekeeping genlerin Ct değerleri çıkarıldı ve **Δ**Ct değerleri elde edildi. Kat değişiminin hesaplanabilmesi için her gruba ait olan **Δ**CT'lerin ortalaması alındı ve kontrol grubunun ortalama **Δ**CT'si miRNA ile transfekte olan grubun ortalama **Δ**CT'sinden çıkartılarak **ΔΔ**CT elde edildi. Daha sonra kontrole göre kat değişimini ifade etmek için her grup için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplandı.

3.5 KRİSTAL VİYOLE ile HÜCRE CANLILIĞI TESTİ

Kristal viyole boyası, canlı ve adherent hücrelere bağlandığından hücre canlılığını göstermektedir. miRNA transfeksiyonunun hücre canlılığı üzerine etkisini görmek için kristal viyole hücre canlılığı testi yapıldı. Bu deneyde, hücre içermeyen 3 kuyucuğa körleme yapmak için sadece besiyer eklendi. Transfeksiyondan 48 saat sonra kültür besiyerleri uzaklaştırıldı. Çeşme suyunda nazikçe 2 kez kuyucuklar yıkandı. Sıvı toplandıktan sonra kültür kabı ters çevrilip peçete serilmiş zemine vuruldu. 50 µl kristal viyole solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında, kapaklı bir şekilde çalkalayıcıda (20 çalkalama/dk) 20 dk bekletildi. 4 kere çeşme suyunda yıkandı. Arta kalan sıvı toplanıp peçete serilmiş zemine kültür kabı ters bir şekilde nazikçe vuruldu. Kapaksız olarak oda sıcaklığında en az 2 saat kültür kabı bekletildi. Her bir kuyucuğa 200 µl metil alkol eklendi ve kapaklı olarak 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

Ölçümler, 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucu Thermo Scientific Multiskan GO ile yapıldı. Bulunan ölçümler sadece kültür besiyeri bulunan kuyucuklarla körlendi. Kontrol grubuna göre diğer transfekte edilen hücrelerin sonuçları normalleştirildi. Çıkan değerler hücrenin canlılık oranını gösterdi.

3.6 İN VİTRO YARA İYİLEŞMESİ ANALİZİ

Transfeksiyonun hücrelerin göç etmesine etkisini incelemek için kazıma deneyi yapıldı. Transfeksiyondan 48 saat sonra kültür besiyerleri uzaklaştırıldı, 24 saat serumsuz besiyerde 37˚C'de tekrardan inkübe edildi. Bir yara oluşturmak üzere steril 200 mL'lik bir pipet ucu kullanılarak kuyucuklarda dikey eksen boyunca kazıma yapıldı. Hücreler iki kez dPBS ile yıkandı ve sonra %10 FBS ortamında kültürlendi. Ters mikroskop ile oluşturulan yara alanının ilk hali ve 24 saat sonraki hali fotoğraflandı. İyileşme hızı, Image J programı (NIH, ABD) kullanılarak boşluklara ait alanın ölçümleriyle aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$Yara\ kapanma\ yüzdesi = \frac{Yaranın\ ilk\ alanı - Yaranın\ 24\ saat\ sonraki\ alanı}{Yaranın\ ilk\ alanı}\ x\ 100$$

Kontrol grubuna göre miRNA ile transfekte edilen hücrelerin iyileşme hızı normalleştirildi. İyileşme hızı, hücrelerin göçünü temsil etmek için kullanıldı.

3.7 FTIR SPEKTROSKOPİSİ

Transfeksiyon sonrasında hücrelerin salgıladığı moleküllerde hangi moleküllerin ve ne gibi değişikliklerin olduğunu analiz etmek için FTIR spektroskopisi tekniği kullanıldı. Önceki deneylerin sonuçları temel alındığında, inhibitör uygulanmış gruplarda daha fazla değişim görüldüğü için bu deneysel çalışmaya sadece inhibitör grupları dahil edildi. Spektroskopik analiz Perkin Elmer Spectrum FTIR-ATR cihazı ile yapıldı. Kristal üzerine 2 µl örnekten konuldu ve örnekler 2 dk boyunca düşük basınçlı N_2 akışıyla kurutuldu. Örneklerin ölçümü 4000 – 400 cm^{-1} spektrum aralıkta ve 4 cm^{-1} çözünürlükte yapıldı. Örneklerin analizi 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen veriler OPUS programı (Versiyon 5.5) ile analiz edildi.

Analiz programında ilk başta, çalışılan 3 tekrarlı örneklerin ortalaması alındı. Daha sonra tüm örneklerin spektrumunda temel çizgi düzeltmesi yapıldı ve 3295 cm^{-1} dalga boyunda yer alan amid A bandına göre tüm örnekler normalleştirildi. Ilgili pikler belirlenip integral hesabıyla piklerin alanı ölçüldü.

3.8 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel analizi için GraphPad Prism (Versiyon 5) programı kullanıldı. Gen ifade düzeyleri için kontrol grupları ve deney gruplarının **Δ**Ct ortalamaları karşılaştırıldı. Tüm analiz sonuçlarının normal dağılıma uygun olup olmadığı analiz edildi. Normal dağılıma uyan verilerin ikili grup karşılaştırması Student t testi ile çoklu grup karşılaştırması ise tek yönlü ANOVA ve Dunnett'ın çoklu karşılaştırma testi ile yapıldı. Normal dağılıma uymayan ikili grupların karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile çoklu grup karşılaştırılması ise Kruskal Wallis ve Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi ile yapıldı. Veriler ortalama ± standart sapma şekilde gösterildi. İstatistiksel analizlerin sonucu $p<0,05$ ise anlamlı bir fark olduğu kabul edildi.

4 BULGULAR

4.1 MİMİK veya İNHİBİTÖR MİKRORNA ile FİBROBLAST TRANSFEKSİYONU SONRASI HEDEFLENEN MRNA'LARIN GEN İFADE DÜZEYLERİ

3T3 fibroblast hücre hattı miRNA mimik veya inhibitörleri ile transfekte edildikten sonra hedef olarak belirlediğimiz *Mapk1*, *Mmp9*, *Tagln* ve *Tnf* 'lerinin ve housekeeping gen olarak belirlediğimiz *Gapdh'nin* gen ifade seviyelerine bakıldı. Her grup kendi kontrol grubuyla kıyaslanıp kat değişimleri hesaplandı ve istatistiksel analiz yapıldı.

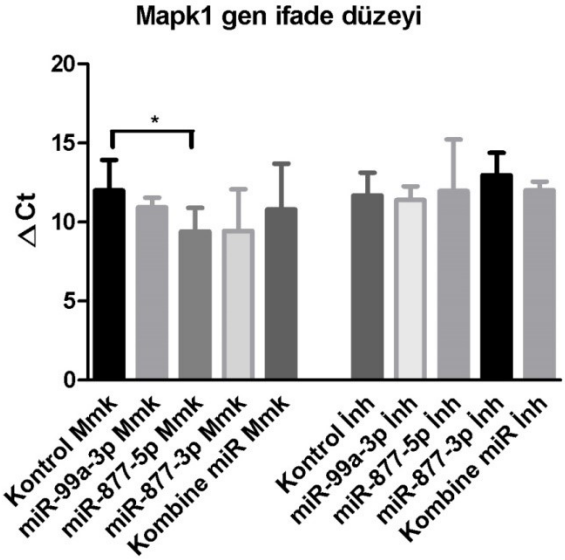
4.1.1 Mapk1 Gen İfade Düzeyi

miRNA mimik veya inhibitörleri ile transfekte edilen fibroblast hücrelerindeki *Mapk1* gen ifade düzeyi Şekil 4.1'de gösterilmiş ve Tablo 4.1'de özetlenmiştir. Kontrol mimik grubuna kıyasla 4 farklı mimik grubunda da *Mapk1* seviyelerinde artma görüldü. Sadece miR-877-5p mimik grubundaki 6 kat artma anlamlı bulundu (p=0,0454). Kontrol inhibitör grubuyla kıyaslanınca miR-99a-3p mimik grubunda *Mapk1*'in ifadesinde artma görülürken diğer mimik gruplarında ise azalma görüldü. 4 gruptaki bu değişimler istatistiksel olarak anlamsız bulundu (p>0,05).

Tablo 4.1: Mapk1 mRNA gen ifade düzeyine ait verilerin değerlendirilmesi

Gruplar	Ort ΔCt±SS	Kat değişimi	p değeri
Kontrol Mimik	11,99±1,93		
miR-99a-3p Mimik	10,93±0,61	2,09	0,2731[a]
miR-877-5p Mimik	9,41±1,49	6,00	**0,0454[a]**
miR-877-3p Mimik	9,43±2,64	5,89	0,1185[a]
Kombine miRNA Mimik	10,79±2,9	2,30	0,4641[a]
Kontrol İnhibitör	11,67±1,47		
miR-99a-3p İnhibitör	11,39±0,86	1,21	0,7260[a]
miR-877-5p İnhibitör	11,96±3,26	-1,22	0,8592[a]
miR-877-3p İnhibitör	12,96±1,42	-2,44	0,1957[a]
Kombine miRNA İnhibitör	12,01±0,55	-1,26	0,6425[a]

[a]Kontrol grubuyla kıyaslanıp Student t testi yapıldı. Ort, ortalama; SS, standart sapma. p<0,05 olan değerler kalın punto ile yazıldı.



Şekil 4.1: Mapk1 genine ait ifade düzeyinin grafik gösterimi Bar yüksekliği ile mRNA gen ifade düzeyi ters orantılıdır. Veriler ortalama ve standart sapma şeklinde gösterilmiştir. *p≤0,05. Mmk, mimik; inh, inhibitör.

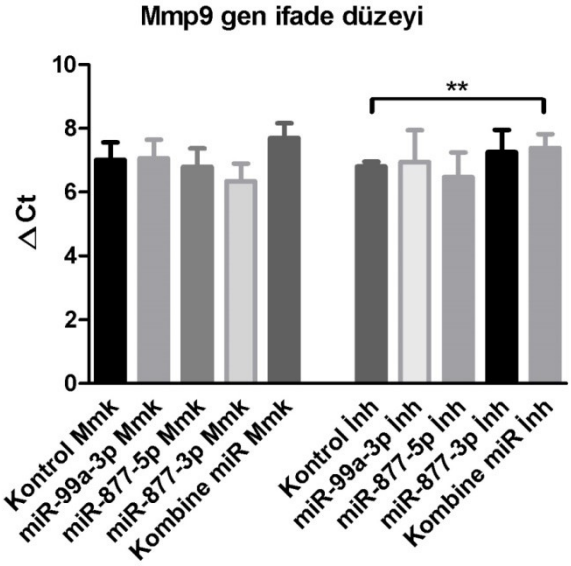
4.1.2 Mmp9 Gen İfade Düzeyi

miRNA mimik veya inhibitörleri ile transfekte edilen fibroblast hücrelerindeki *Mmp9* gen ifade düzeyi Şekil 4.2'de gösterilmiş ve Tablo 4.2'de özetlenmiştir. Kontrol mimik grubuna kıyasla miR-877-5p ve miR-877-3p gruplarında *Mmp9*'un mRNA seviyelerinde artma, miR-99a-3p ve kombine miRNA gruplarında ise azalma görüldü. Tüm mimik gruplarındaki bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0,05). İnhibitör uygulanmış gruplara baktığımızda, kontrol grubuna göre miR-877-5p'in gen ifadesindeki artma, miR-99a-3p ve miR-877-3p'nin gen ifadesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değilken (p>0,05) kombine miRNA uygulanmış grupta ise 1,5 kat anlamlı azalma bulundu (p=0,0079).

Tablo 4.2: Mmp9 mRNA gen ifade düzeyine ait verilerin değerlendirilmesi

Gruplar	Ort ΔCt±SS	Kat değişimi	p değeri
Kontrol Mimik	7,01±0,55		
miR-99a-3p Mimik	7,06±0,58	-1,03	0,8945[a]
miR-877-5p Mimik	6,8±0,57	1,16	0,5665[a]
miR-877-3p Mimik	6,35±0,55	1,59	0,0930[a]
Kombine miRNA Mimik	7,7±0,47	-1,61	0,0670[a]
Kontrol İnhibitör	6,8±0,15		
miR-99a-3p İnhibitör	6,94±1,0	-1,10	0,6905[b]
miR-877-5p İnhibitör	6,47±0,78	1,26	0,5476[b]
miR-877-3p İnhibitör	7,25±0,7	-1,36	0,1508[b]
Kombine miRNA İnhibitör	7,39±0,43	-1,50	**0,0079[b]**

[a]Kontrol grubuyla kıyaslanıp Student testi yapıldı. [b]Kontrol grubuyla kıyaslanıp Mann Whitney U testi yapıldı. Ort, ortalama; SS, standart sapma. p<0,05 olan değerler kalın punto ile yazıldı.



Şekil 4.2: Mmp9 genine ait ifade düzeyinin grafik gösterimi. Bar yüksekliği ile mRNA gen ifade düzeyi ters orantılıdır. Veriler ortalama ve standart sapma şeklinde gösterilmiştir. **p≤0,01. Mmk, mimik; inh, inhibitör.

4.1.3 Tagln Gen İfade Düzeyi

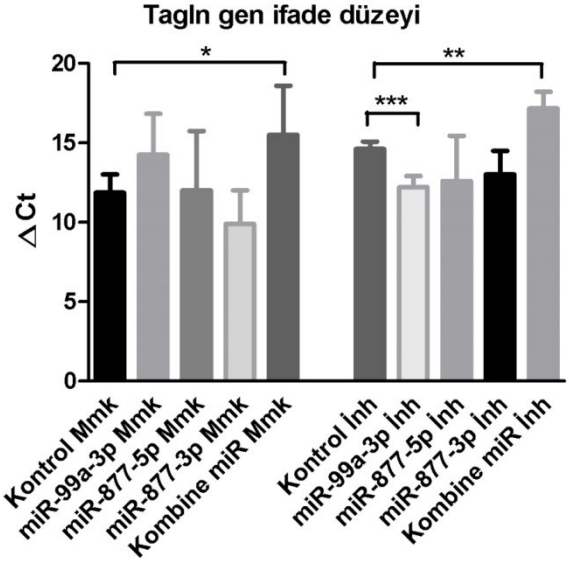
miRNA mimik veya inhibitörleri ile transfekte edilen fibroblast hücrelerindeki *Tagln* gen ifade düzeyi Şekil 4.3'te gösterilmiş ve Tablo 4.3'te özetlenmiştir. Kontrol mimik grubuna kıyasla miR-877-3p grubunda *Tagln*'nin seviyesinde artma, miR-99a-3p ve miR-877-5p gruplarında ise ifade seviyesinde azalma görüldü (p>0,05). Kombine miRNA uygulanmış grupta ise kontrol grubuna kıyasla 12,38 kat istatistiksel olarak azalma bulundu

(p=0,0392). İnhibitör uygulanmış gruplara baktığımızda ise, kontrol grubuna göre miR-99a-3p grubuna ait gen ifadesindeki 5,25 kat artış anlamlı iken kombine miRNA uygulanmış gruptaki gen ifadesindeki 5,88 kat azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,001). miR-877-5p ve miR-877-3p mimiği uygulanmış gruplarda ise görülen artma istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,05).

Tablo 4.3: Tagln mRNA gen ifade düzeyine ait verilerin değerlendirilmesi

Gruplar	Ort ΔCt±SS	Kat değişimi	p değeri
Kontrol Mimik	11,86±1,15		
miR-99a-3p Mimik	14,24±2,59	-5,18	0,0981[a]
miR-877-5p Mimik	12,01±0,91	-1,10	0,9374[a]
miR-877-3p Mimik	9,88±2,13	3,94	0,1048[a]
Kombine miR Mimik	15,49±3,09	-12,38	**0,0392[a]**
Kontrol İnhibitör	14,61±0,46		
miR-99a-3p İnhibitör	12,22±0,69	5,25	**0,0002[a]**
miR-877-5p İnhibitör	12,59±2,84	4,04	0,1562[a]
miR-877-3p İnhibitör	13±1,5	3,04	0,0510[a]
Kombine miR İnhibitör	17,17±1,04	-5,88	**0,0010[a]**

[a]Kontrol grubuyla kıyaslanıp Student testi yapıldı. Ort, ortalama; SS, standart sapma. p<0,05 olan değerler kalın punto ile yazıldı.



Şekil 4.3: Tagln genine ait ifade düzeyinin grafik gösterimi. Bar yüksekliği ile mRNA gen ifade düzeyi ters orantılıdır. Veriler ortalama ve standart sapma şeklinde gösterilmiştir. *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001. Mmk, mimik; inh, inhibitör.

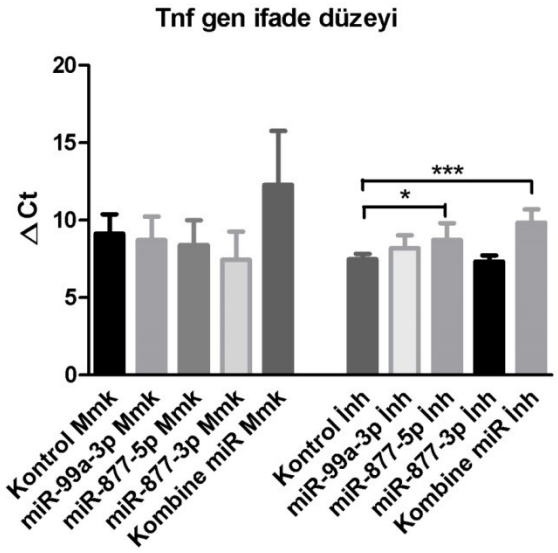
4.1.4 Tnf Gen İfade Düzeyi

miRNA mimik veya inhibitörleri ile transfekte edilen fibroblast hücrelerindeki *Tnf* gen ifade düzeyi Şekil 4.4'te gösterilmiş ve Tablo 4.4'te özetlenmiştir. Kontrol mimik grubuyla kıyaslandığında miR-877-3p, miR-877-5p ve miR-877-3p gruplarındaki *Tnf* ifade seviyesinde artma ve kombine miRNA gurubunda ise azalma görüldü fakat bu değişimler anlamlı değildi (p>0,05). İnhibitör uygulanmış gruplar değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre miR-99a-3p grubundaki gen ifadesindeki azalmada ve miR-877-3p grubundaki artmada anlamlılık bulunmadı (p>0,05). Kombine miRNA grubundaki gen ifadesinde 5,18 kat, miR-877-5p grubunda ise 2,39 kat istatistiksel olarak azalma bulundu (sırasıyla p=0,0004; p=0,0374).

Tablo 4.4: Tnf mRNA gen ifade düzeyine ait verilerin değerlendirilmesi

Gruplar	Ort ΔCt±SS	Kat değişimi	p değeri
Kontrol Mimik	9,12±1,24		
miR-99a-3p Mimik	8,7±1,52	1,34	0,6447[a]
miR-877-5p Mimik	8,38±1,61	1,67	0,4393[a]
miR-877-3p Mimik	7,45±1,81	3,20	0,2222[b]
Kombine miR Mimik	12,27±3,49	-8,86	0,0941[a]
Kontrol İnhibitör	7,47±0,36		
miR-99a-3p İnhibitör	8,18±0,85	-1,64	0,1215[a]
miR-877-5p İnhibitör	8,73±1,07	-2,39	**0,0374[a]**
miR-877-3p İnhibitör	7,32±0,4	1,11	0,5459[a]
Kombine miR İnhibitör	9,85±0,85	-5,18	**0,0004[a]**

[a]Kontrol grubuyla kıyaslanıp Student testi yapıldı. [b]Kontrol grubuyla kıyaslanıp Mann Whitney U testi yapıldı. Ort, ortalama; SS, standart sapma. p<0,05 olan değerler kalın punto ile yazıldı.



Şekil 4.4: Tnf genine ait ifade düzeyinin grafik gösterimi. Bar yüksekliği ile mRNA gen ifade düzeyi ters orantılıdır. Veriler ortalama ve standart sapma şeklinde gösterilmiştir. *p≤0,05; ***p≤0,001. Mmk, mimik; inh, inhibitör.

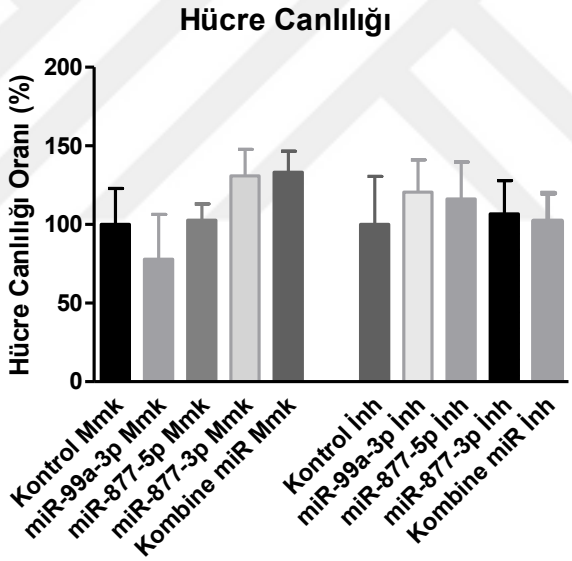
4.2 MİKRORNA MİMİĞİ veya İNHİBİTÖRÜ TRANSFEKSİYONUN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

3T3 fibroblast hücreleri kontrol miRNA, miR-99a-3p, miR-877-5p, miR-877-3p veya 3 miRNA kombine olarak mimikleri veya inhibitörleri ile transfekte edildikten sonra hücre canlılığına bakıldı. Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı farklılık bulunmadı (p>0,05) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Hücre canlılık testinin değerlendirilmesi

Gruplar	Ort±SS	p değeri
Kontrol Mimik	100±22,91	
miR-99a-3p Mimik	77,94±28,46	0,3747[1]
miR-877-5p Mimik	102,74±10,37	0,8594[1]
miR-877-3p Mimik	130,94±16,88	0,1328[1]
Kombine miR Mimik	133,24±13,38	0,0958[1]
Kontrol İnhibitör	100±30,55	
miR-99a-3p İnhibitör	120,5±20,66	0,3901[2]
miR-877-5p İnhibitör	116,3±23,5	0,5044[2]
miR-877-3p İnhibitör	106,79±21,17	0,7675[2]
Kombine miR İnhibitör	102,22±17,71	0,9185[2]

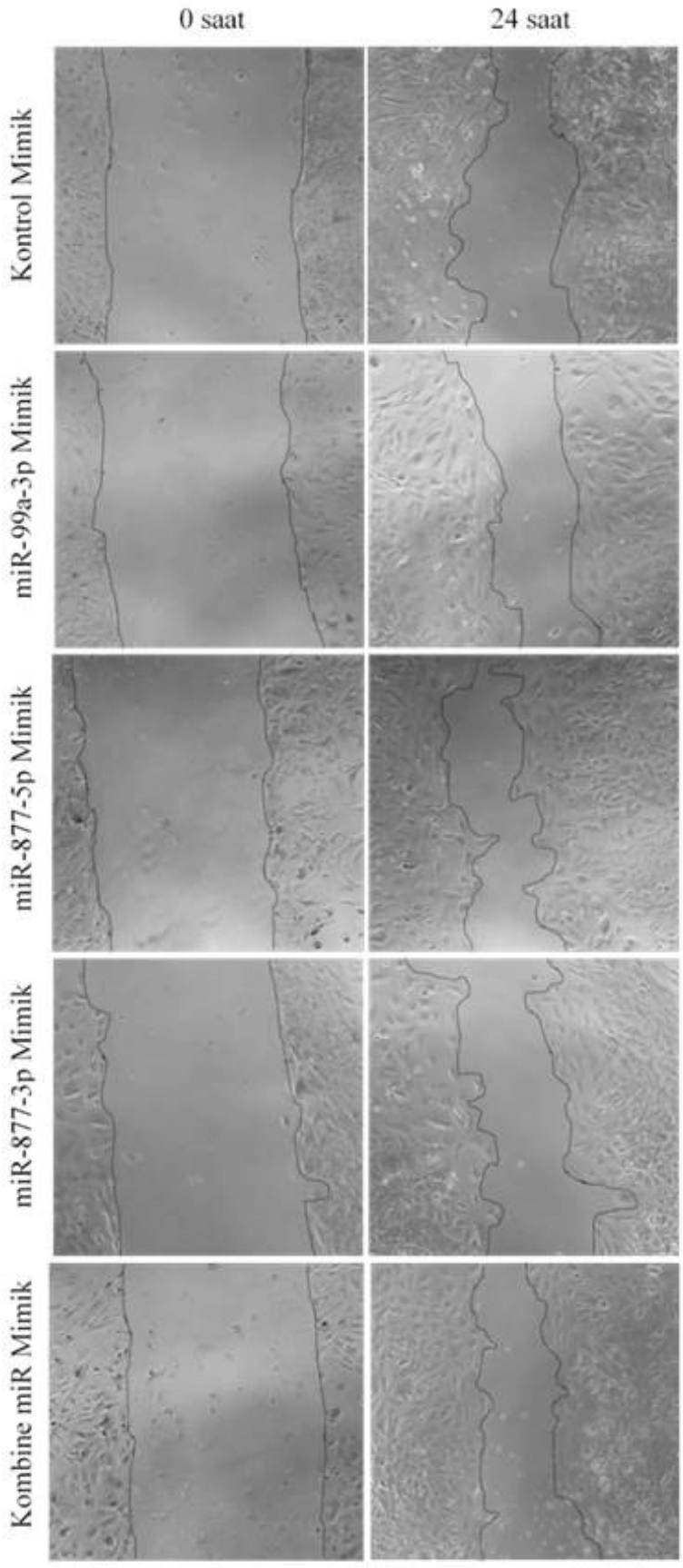
[1]Kontrol mimik grubuyla ve [2]Kontrol inhibitör grubuyla kıyaslama yapılıp Student t testi ile istatistiksel analiz yapılmıştır. Ort, ortalama; SS, standart sapma.



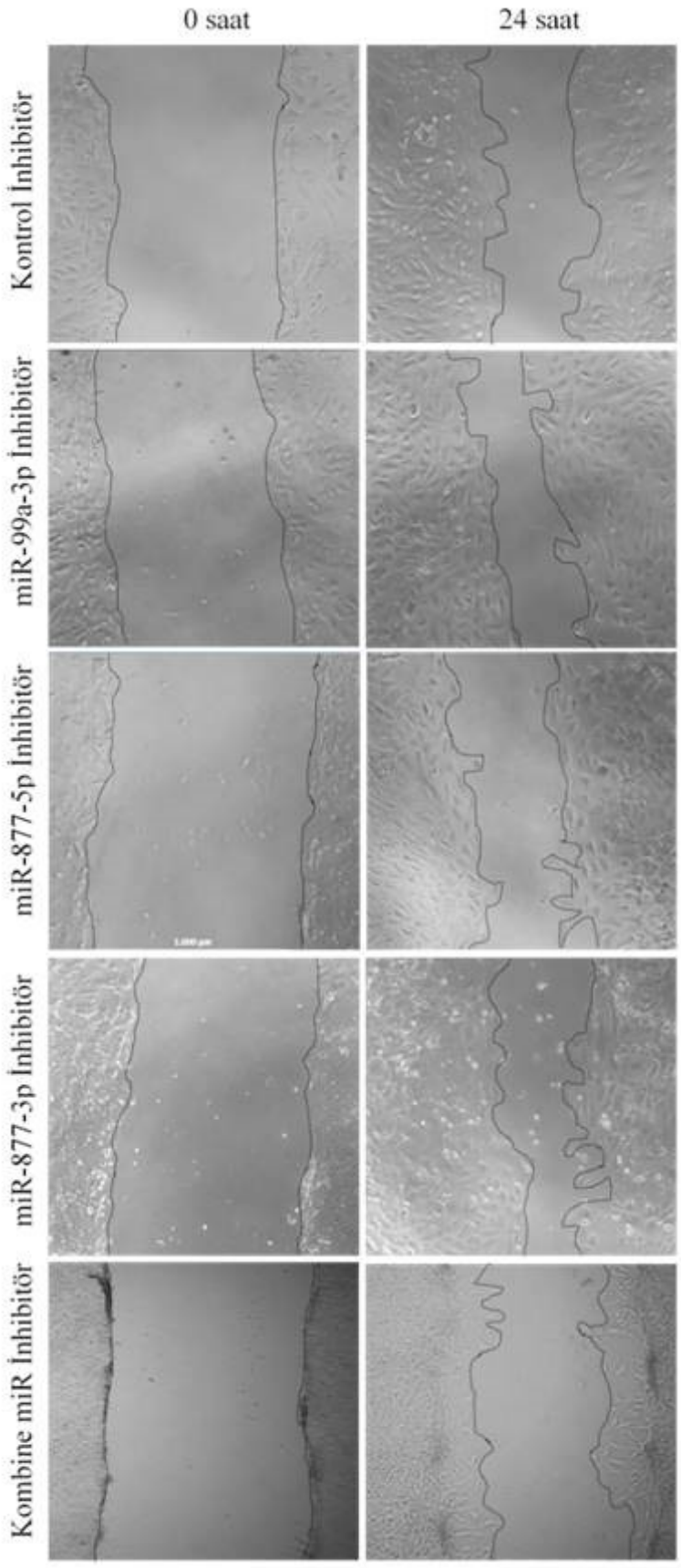
Şekil 4.5: Transfeksiyonun hücre canlılığı üzerine etkisi. Veriler ortalama ve standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Mmk, mimik; inh, inhibitör.

4.3 MİKRORNA MİMİK veya İNHİBİTÖRLERİNİN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

3T3 fibroblast hücre hattı kontrol miRNA, miR-99a-3p, miR-877-5p, miR-877-3p veya 3 miRNA'yı içeren kombine miRNA mimikleri veya inhibitörü ile transfekte edildikten sonra yara oluşturuldu. 0 ve 24 saat sonrasında hücreler mikroskop altında görüntülendi (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Image J kullanılarak yaranın kapanma oranı hesaplandı (Tablo 4.6 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.6: Mimik grubuna ait yara iyileşmesi analizi görüntüsü

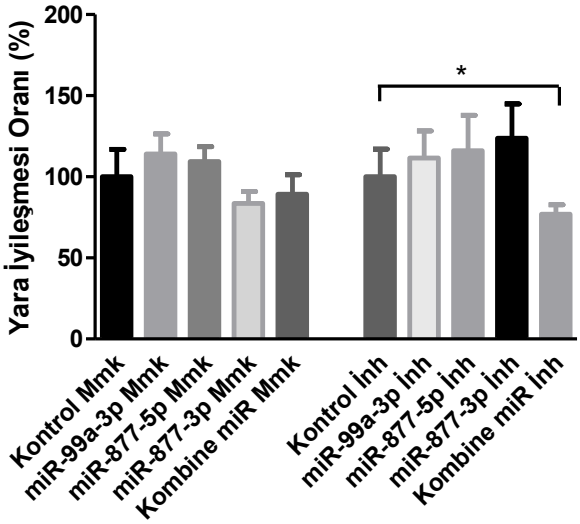


Şekil 4.7: İnhibitör gruplarına ait yara iyileşmesi analizi görüntüsü

Tablo 4.6: İn vitro yara iyileşmesi analizi sonuçları

Gruplar	Ort±SS	p değeri
Kontrol Mimik	100±16,88	
miR-99a-3p Mimik	114,13±12,21	0,2238[a]
miR-877-5p Mimik	109,46±9,19	0,4857[b]
miR-877-3p Mimik	83,53±7,44	0,1244[a]
Kombine miRNA Mimik	89,2±12,02	0,4857[b]
Kontrol İnhibitör	100±17,06	
miR-99a-3p İnhibitör	111,58±16,67	0,3691[a]
miR-877-5p İnhibitör	116,15±21,78	0,2873[a]
miR-877-5p İnhibitör	123,7±21,15	0,1318[a]
Kombine miRNA İnhibitör	76,93±5,85	**0,0286[b]**

[a]Kontrol grubuyla kıyaslanıp Student t testi yapıldı. [b]Kontrol grubuyla kıyaslanıp Mann Whitney U testi yapıldı. Ort, ortalama; SS, standart sapma. p<0,05 olan değerler kalın punto ile yazıldı.



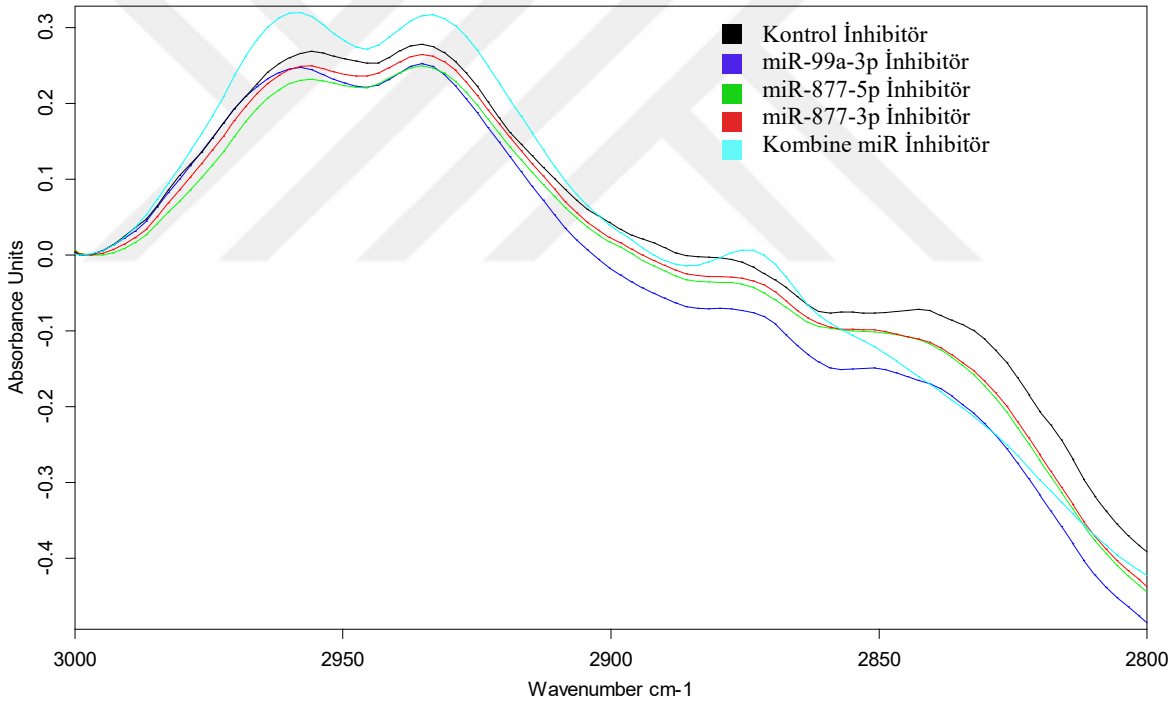
Şekil 4.8: İn vitro Yara iyileşmesi analiz sonuçlarının grafik gösterimi. Veriler ortalama ve standart sapma şeklinde gösterilmiştir. Mmk, mimik; inh, inhibitor; *p≤0,05.

Mimik ile transfekte olan gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında miR-99a-3p ve miR-877-5p gruplarında yara kapanma hızı daha fazla iken miR-877-3p ve kombine miRNA gruplarında kapanma hızı daha az bulundu. Değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi

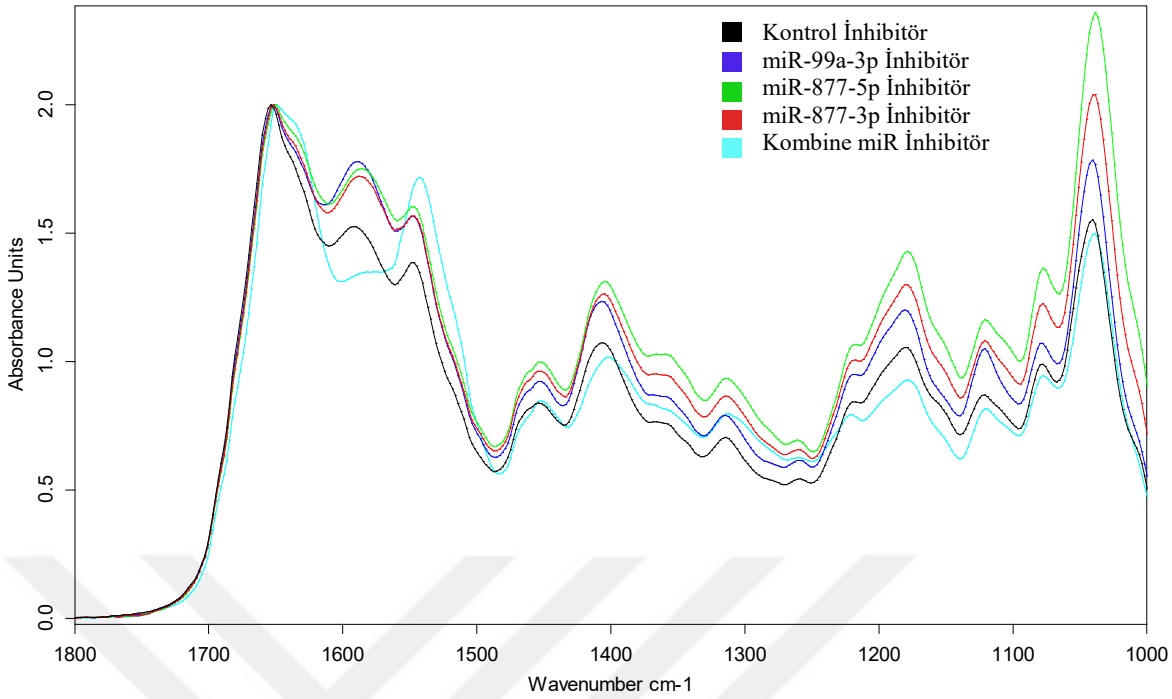
(p>0,05). İnhibitör ile transfekte olan gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında miR-99a-3p, miR-877-5p ve miR-877-3p gruplarında yara kapanma hızında artış görüldü fakat bu artışlar anlamlı değildi (p>0,05). Kombine miRNA uygulanmış grupta ise kontrole kıyasla yara kapanma hızında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görüldü (p=0,0286).

4.4 FTIR SPEKTROSKOPİSİ ANALİZİ SONUÇLARI

Yapılan PZR ve yara iyileşmesi sonucunda anlamlı değişimlerden dolayı inhibitör gruplarına ait örneklerde FTIR analizinin yapılmasına karar verildi. FTIR spektroskopisi kullanılarak Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilen C-H bölgesi ve parmak izi bölgesine ait bantlar elde edildi. Literatüre dayalı olarak bu bantların hangi biyokimyasal moleküllerin olabileceği belirlendi (Tablo 4.7).



Şekil 4.9: Amid A normalizasyonuna göre C-H bölgesi (3000-2800 cm-1). Kontrol grubu siyah, miR-99a-3p lacivert, miR-877-5p açık yeşil, miR-877-3p kırmızı ve kombine miRNA açık mavi renk ile gösterilmiştir.



Şekil 4.10: Amid I normalizasyonuna göre parmak izi bölgesi (1800-1000 cm-1). Kontrol grubu siyah, miR-99a-3p lacivert, miR-877-5p açık yeşil, miR-877-3p kırmızı ve kombine miRNA açık mavi renk ile gösterilmiştir.

Tablo 4.7: FTIR spektrumunun genel bant atamaları

Dalga sayısı	Moleküler titreşimler	Hücresel yapılar
2956 cm^{-1}	CH_3 asimetrik gerilme	Lipid, protein
2935 cm^{-1}	CH_2 asimetrik gerilme, Amid B	Çoğunlukla lipid
1654 cm^{-1}	Protein C=O gerilme	Amid I: protein
1549 cm^{-1}	Protein N-H bükülme, C-N gerilme	Amid II: protein
1454 cm^{-1}	CH_2 makaslama; CH_3 asimetrik makaslama	Lipid; kollajen
1406 cm^{-1}	COO- simetrik gerilme	Yağ asitleri ve aminoasitler
1314 cm^{-1}	CH_3 CH_2 gerilmesi; Amid III:	Kollajen; C–N gerilmesi ve N–H makaslama
1259 cm^{-1}	PO_2- asimetrik gerilme	Fosfolipitler, nükleik asitler (DNA, RNA)
1180 cm^{-1}	CO-O-C asimetrik gerilme, Amid III	Fosfolipitler, trigliserit, kolesterol esterleri
1121 cm^{-1}	Simetrik fosfodiester gerilme	RNA
1078 cm^{-1}	PO_2- simetrik gerilme; C-O gerilme	Nükleik asit, fosfolipid; glikojen, kollajen
1040 cm^{-1}	PO_2- simetrik gerilme; C-O gerilme	RNA, DNA; kollajen

Hücre dışına salınan biyokimyasal moleküllerin konsantrasyonunu ve bu moleküllerdeki değişimleri belirlemek için Tablo 4.8'de listelenen bazı özel bantların alanları

ve Tablo 4.9'de listelenen alan oranları hesaplandı (Bozkurt ve diğ., 2010; Ozek ve diğ., 2010; Doğan ve diğ., 2013; Güler ve diğ., 2018; Virtanen ve diğ., 2020). Belirlediğimiz bu bantların alanları hesaplanıp gruplar arasındaki karşılaştırma tek yönlü ANOVA veya Kruskal Wallis analizi yapıldı.

Tablo 4.8: Bant alan oranlarının hesaplanmasında kullanılan spektral bölgeler

Alan dalga boyu	Bant Alan Bölgesi	Alan Dalga Boyu	Bant Alan Bölgesi
A_{2956}	2986 cm^{-1} – 2946 cm^{-1}	A_{1314}	1328 cm^{-1}– 1288 cm^{-1}
A_{2935}	2943 cm^{-1} – 2907 cm^{-1}	A_{1259}	1240 cm^{-1}– 1212 cm^{-1}
A_{1654}	1703 cm^{-1} – 1619 cm^{-1}	A_{1180}	1211 cm^{-1}– 1144 cm^{-1}
A_{1549}	1559 cm^{-1} – 1506 cm^{-1}	A_{1121}	1137 cm^{-1} – 1097 cm^{-1}
A_{1454}	1478 cm^{-1} – 1436 cm^{-1}	A_{1078}	1092 cm^{-1}– 1068 cm^{-1}
A_{1406}	1429 cm^{-1} – 1375 cm^{-1}	A_{1040}	1063 cm^{-1} – 1021 cm^{-1}

A, alan.

Tablo 4.9: FTIR spektrumundan elde edilen bant alan oranları

Özellik	Bant Alanları
Toplam Lipid Bant Alanı	$A_{2956} + A_{2935} + A_{1454}$
Toplam Protein Bant Alanı	$A_{1549} + A_{1314}$
Toplam Fosfolipid - Nükleik Asit Bant Alanı	$A_{1078} + A_{1040}$
Açil Zincir Uzunluğu	A_{2956} / A_{2935}
Kollajen Bütünlüğü	A_{1549} / A_{1314}
Nükleik Asit / Protein	A_{1078} / A_{1549}

A, alan.

C-H bölgesinde (Şekil 4.9) 2956 cm^{-1} ve 2935 cm^{-1} dalga sayısında yer alan CH_3 ve CH_2 asimetrik gerilme bant alanları gruplar arasında kıyaslandığında anlamlı farklılıklar bulundu (sırasıyla; p=0,0048 ve p<0,0001). CH_3 asimetrik gerilmedeki anlamlılık miR-877-5p ve kombine miRNA grupları arasında iken CH_2 asimetrik gerilmedeki anlamlılık ise kontrol ve kombine miRNA grupları arasındaydı. Kombine miRNA'da sırasıyla 1,67 ve 1,45 kat artış bulundu (Tablo 4.10).

Parmak izi bölgesinde (Şekil 4.10) yer alan bant alanları analiz edildiğinde kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda da anlamlı artışlar bulundu. Kombine miRNA grubunda, 1654 cm^{-1} amid I bant alanında 1,28 kat ve amid II bant alanında ise 3,82 kat çok yüksek anlamlı artış bulundu (p<0,0001). 1454 cm^{-1}'de yer alan CH_2 ve CH_3 asimetrik makaslama bölgesi miR-99a-3p, miR-887-5p, miR-877-3p ve kombine miRNA gruplarında sırasıyla 1,35

kat, 1,5 kat, 1,39 kat ve 1,67 kat çok yüksek anlamlı artış bulundu (p<0,0001). 1406 cm^{-1}'de yer alan COO- simetrik gerilme bant alanı miR-99a-3p, miR-887-5p ve miR-877-3p gruplarında sırasıyla 1,48 kat, 1,41 kat ve 1,37 kat anlamlı artış bulundu (p=0,0022). 1314 cm^{-1} dalga sayısında yer alan amid III bant alanı miR-99a-3p, miR-887-5p, miR-877-3p ve kombine miRNA gruplarında sırasıyla 1,57 kat, 1,97 kat, 1,75 kat ve 2,32 kat istatistiksel olarak çok yüksek anlamlı artış bulundu (p<0,0001). 1259 cm^{-1} PO_2- asimetrik gerilme bant alanı ve 1180 cm^{-1} CO-O-C asimetrik gerilme ve Amid III bant alanı miR-877-5p grubunda 1,75 (p=0,0210) ve 1,77 (p=0,0153) kat anlamlı artış bulundu. 1121 cm^{-1} simetrik fosfodiester gerilme bant alanı miR-99-3p grubunda 1,85 kat anlamlı bir artış gösterdi (p=0,0257). miR-877-5p ve miR-977-3p gruplarında 1078 cm^{-1} dalga sayısında yer alan PO_2- simetrik ve C-O gerilme bandının alanları sırasıyla 1,84 ve 1,61 kat (p=0,0045) ve 1040 cm^{-1} dalga sayısında yer alan PO_2- simetrik ve C-O gerilme bandının alanları ise sırasıyla 1,71 ve 1,52 kat (p=0,0164) istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: İnhibitör gruplarına ait FTIR bant alanlarının analizi

Bant Alanları	Kontrol (Ort±SS)	miR-99a-3p (Ort±SS)	miR-877-5p (Ort±SS)	miR-877-3p (Ort±SS)	Kombine miR (Ort±SS)	p değeri
A_{2956}	2,18±0,3	2,3±0,34	1,86±0,24	2,1±0,19	3,12±0,251	**0,0048**[a,1]
A_{2935}	1,52±0,13	1,6±0,25	1,47±0,17	1,6±0,07	2,21±0,22	**<0,0001**[b,2]
A_{1654}	82,56±2,75	89,93±6,5	82,79±7,39	86,23±3,65	105,86±3,65	**<0,0001**[b,2]
A_{1549}	11,25±1,78	14,95±2,8	14,59±3,49	13,5±2,66	43,02±5,87	**<0,0001**[b,2]
A_{1454}	7,22±1,03	9,76±1,66	10,82±1,09	10,04±1,69	12,08±0,33	**0,0001**[b,2-5]
A_{1406}	15,91±1,97	23,48±3,95	22,46±2,27	21,72±3,49	19,18±0,94	**0,0022**[b,3-5]
A_{1314}	2,92±0,66	4,58±1,18	5,76±1,09	5,12±1,32	6,78±0,26	**<0,0001**[b,2-5]
A_{1259}	2,16±0,34	3,39±0,74	3,78±0,6	3,55±0,69	3,64±0,2	**0,0210**[a,4]
A_{1180}	16,93±3,79	23,36±6,25	29,97±6,14	25,42±7,24	20,84±2,44	**0,0153**[b,4]
A_{1121}	5,84±1,27	10,81±2,48	10,17±2,09	9,5±2,17	9,35±1,00	**0,0257**[a,3]
A_{1078}	4,1±0,79	5,34±1,43	7,55±1,6	6,6±1,66	6,01±0,25	**0,0045**[b,4,5]
A_{1040}	29,35±4,51	42,2±9,72	50,24±8,71	44,47±10,56	38,8±3,06	**0,0164**[a,4,5]

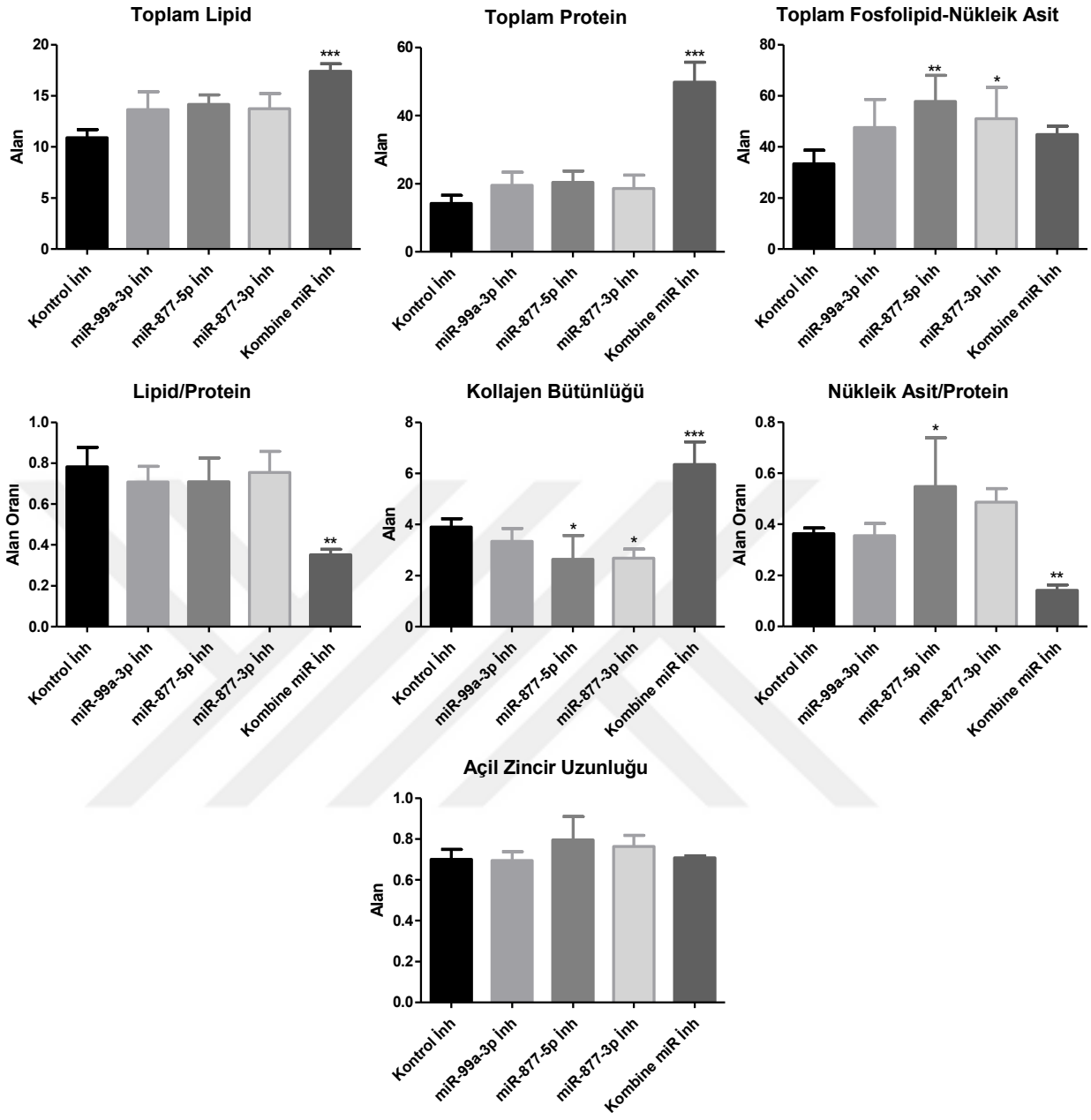
[a]Kruskal Wallis testine ait p değeri, [b]Tek Yönlü ANOVA testine ait p değeri, [1]miR-877-5p ve kombine miRNA grupları arası kıyaslama, [2]kombine miRNA ve kontrol grupları arası kıyaslama, [3]miR-99a-3p ve kontrol grupları arası kıyaslama, [4]miR-877-5p ve kontrol grupları arası kıyaslama, [5]miR-877-3p ve kontrol grupları arası kıyaslama. A, alan; Ort, ortalama; SS, standart sapma. p<0,05 olan değerler kalın punto ile yazıldı.

Her bir bant tek tek gruplar arasında kıyaslandıktan sonra belirlenen bazı bant alan toplamları ve oranları hesaplanıp gruplar arasında kıyaslandı (Tablo 4.11). Gruplar arasındaki toplam lipid ve protein miktarına bakıldığında kontrol grubuna oranla kombine miRNA grubunda lipid miktarında 1,59 kat ($p=0,0017$) ve protein miktarında 3,51 kat ($p<0,0001$) anlamlı bir artış bulundu. Lipid miktarı protein miktarına oranlandığında kombine miRNA grubunda kontrole kıyasla 2,23 kat anlamlı bir azalış bulundu ($p=0,0107$). Toplam fosfolipid-nükleik asit miktarı kontrol grubuyla oranlandığında miR-877-5p ve miR-877-3p gruplarında 1,73 ve 1,53 kat artış bulundu ($p=0,0067$). Açil zincir uzunluğu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Kollajen bütünlüğü açısından bantlar değerlendirildiğinde miR-877-5p ve miR-877-3p gruplarında kontrole kıyasla sırasıyla 1,47 ve 1,46 kat anlamlı azalma görülürken kombine miRNA grubunda ise 1,63 kat istatistiksel olarak anlamlı bir artma görüldü ($p<0,0001$). Nükleik asitler proteinlerle oranlandığında kontrole kıyasla miR-99a-3p grubunda 1,53 kat artma görülürken kombine miRNA grubunda ise 2,58 kat azalma görüldü ($p<0,0001$) (Şekil 4.11).

Tablo 4.11: İnhibitör gruplarına ait FTIR bant alan oranlarının analiz sonuçları

Bant Alanları	**Kontrol (Ort±SS)**	**miR-99a-3p (Ort±SS)**	**miR-877-5p (Ort±SS)**	**miR-877-3p (Ort±SS)**	**Kombine miR (Ort±SS)**	**p değeri**
Toplam Lipid	10,92±0,78	13,65±1,76	14,15±0,94	13,74±1,49	17,41±0,71	**0,0017**[a,1]
Toplam Protein	14,18±2,42	19,54±3,85	20,35±3,39	18,62±3,9	49,8±5,9	**<0,0001**[b,1]
Lipid / Protein	0,78±0,1	0,71±0,08	0,71±0,12	0,75±0,1	0,35±0,03	**0,0107**[a,1]
Açil Zincir Uzunluğu	0,7±0,05	0,7±0,04	0,8±0,11	0,76±0,05	0,71±0,01	0,0719[b]
Toplam Fosfolipid-Nükleik Asit	33,44±5,3	47,55±11,07	57,79±10,21	51,08±12,21	44,8±3,29	**0,0067**[b,3,4]
Kollajen Bütünlüğü	3,9±0,32	3,34±0,5	2,64±0,94	2,68±0,35	6,35±0,89	**<0,0001**[b,1,3,4]
Nükleik Asit /Protein	0,36±0,02	0,35±0,05	0,55±0,19	0,49±0,05	0,14±0,02	**<0,0001**[b,1,3]

[a]Kruskal Wallis testine ait p değeri, [b]Tek Yönlü ANOVA testine ait p değeri, [1]kontrol ve kombine miRNA grupları arası kıyaslama, [2]miR-99a-3p ve kontrol grupları arası kıyaslama, [3]miR-877-5p ve kontrol grupları arası kıyaslama, [4]miR-877-3p ve kontrol grupları arası kıyaslama. Ort, ortalama; SS, standart sapma. $p<0,05$ olan değerler kalın punto yazıldı.



Şekil 4.11: İnhibitör gruplarına ait FTIR bant alan oranlarının grafiksel gösterimi

5 TARTIŞMA

Yara iyileşmesi, birçok hücre ve molekülün koordineli etkileşimlerini içeren ve çok basamaklı olan oldukça karmaşık bir süreçtir (Polat ve diğ., 2014). Büyüme faktörleri, kemokinler, sitokinler gibi moleküller bu koordinasyonda önemli bir yere sahiptir (Barrientos ve diğ., 2008). Bu iyileşme sürecinde uyarılan genlerin ifade edilmesi veya baskılanması yara iyileşmesinde önemli bir yer tutmaktadır (Shilo ve diğ., 2007). Son yıllardaki çalışmalarda yara iyileşmesi de olmak üzere birçok biyolojik süreçte görev alan ve gen ifadelerinde epigenetik değişiklikler yapan kodlanmayan RNA'lar tanımlanmıştır. Bu kodlanmayan RNA'lardan çok çalışılanlardan biri de mikroRNA'lardır. Yaklaşık 22 baz uzunluğuna sahip olan miRNA'lar, mRNA'ların çoğunlukla 3' ucundaki kodlanmayan bölgesine bağlanıp hedeflediği mRNA'nın yıkımına veya mRNA çevriminin baskılanmasına yol açar (Bavan ve diğ., 2011). miRNA'nın ifadesindeki hatalar veya miRNA hedef bölgelerindeki değişiklikler çeşitli hastalık süreçleri ve patolojik durumlar ile ilişkilendirilmiştir (Sand ve diğ., 2009; Wojciechowska ve diğ., 2017; Ali Syeda ve diğ., 2020). Her ne kadar yara iyileşmesinde etkili olduğu belirtilen çeşitli miRNA'lar tanımlanmış olsa da klinikte kullanımı için hala yetersizdir. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüleri Ulusal Tıp Kütüphanesi kayıtlarında bugüne kadar klinik denemeleri devam eden yalnızca 5 çalışma bulunmuştur (www.clinicaltrials.gov, Erişim Tarihi: 28.05.2022).

Etkili yara iyileşmesinde görev alan miRNA'ları tanımlamak bu noktada önemlidir. Bu sebeple önceki çalışmalarımızda yara iyileşmesinde etkili olduğu bilinen ve klinikte kullanımı olan *Lucilia sericata* larva salgılarının, etkili yara iyileşme sürecini hangi genler üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Polat ve diğ., 2014; Coskunpinar ve diğ., 2015). Bunun için mikrodizin analizi yapılmış; biyoinformatik yaklaşımlar kullanılarak etkin yara iyileşmesinde rol oynayan ve biyobelirteç olarak kullanılabilecek olan miR-99a-3p ve mir-877'nin yukarı yönlü düzenlendiği gösterilmiştir. Daha ileri analizlerle potansiyel hedef genleri olarak *Mapk1*, *Mmp9*, *Tagln* ve *Tnf* tanımlanmıştır. Biyoinformatik olarak elde edilen verilerin biyolojik sonuçlarının gözlenmesi, mekanizmaların açıklanması için önemli bir süreçtir. Dolayısıyla yara iyileşmesini hızlandırıcı etkisini tanımladığımız miRNA'ların ve hedefi olarak belirlediğimiz mRNA'ların yara iyileşmesindeki etkinliğinin daha ileri analizlerle

gösterilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, belirlemiş olduğumuz iki miRNA'nın etkisi 3T3 fibroblast hücre soyları kullanılarak hedef genlerinin ifade düzeylerine, hücre göçü ve canlılığına ve ayrıca hücre dışına salgıladığı moleküllere nasıl etki ettiği analiz edildi.

Hücreler mimik ve inhibitör grubu olmak üzere 10 gruba ayrıldı. Hücreler negatif kontrol, miR-99-3p, miR-877-5p, miR-877-3p ve bu üç genin beraber uygulandığı kombine miR mimikleri veya inhibitörleri ile transfekte edildi. Transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği miRNA ifade düzeylerine bakılıp teyit edildi. Çalışmamız iki aşamalı olarak kurgulandı. İlk aşama, miRNA'ların mRNA'ların ifade seviyelerine, hücre canlılığına ve göçüne etkisini araştırmayı içermektedir.

miRNA'ların potansiyel hedefi olarak belirlediğimiz 4 mRNA'nın üzerindeki etkilerini görmek için bu mRNA'ların gen ifade düzeylerine bakıldı. *Mapk1* ifade düzeylerine genel olarak baktığımızda miRNA inhibitörleri uygulanan gruplarda kat değişimi az değişmişken miRNA mimikleri uygulanan gruplarda değişim daha fazlaydı ama kontrole kıyasla sadece miR-887-5p mimiği ile transfekte edilmiş fibroblastlarda 6 kat anlamlı bir yükseliş bulundu (p=0,0454). *Mmp9* ifade düzeyleri genel olarak incelendiğinde tüm değişimler 2 katın altındaydı. Sadece kombine miRNA inhibitörü uygulanmış grupta kontrole oranla 1,5 kat azalma bulundu (p=0,0079). *Tagln* ifade düzeyi miR-99a-3p inhibitörü uygulanan grupta 5,25 kat kontrole oranla daha fazlaydı (p=0,0002). İlginç bir şekilde hem kombine mimiği uygulanan hem de kombine inhibitörü uygulanan grupta kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşüş yaşandı (sırasıyla, p=0,0392; p=0,0010). Bu düşüş mimik uygulanan grupta 12,38 kat iken inhibitör uygulanan grupta 5,88 kat idi. Son olarak *Tnf* ifadelerine bakıldığında hücrelere miR-877-5p inhibitörü uygulanınca *Tnf*'te 2,39 kat azalma meydana geldi (p=0,0374). Kombine miRNA inhibitörleri uygulanınca *Tnf* kontrole kıyasla 5,18 kat azaldı (p=0,0004).

miRNA ifade değişimleri hücre canlılığı dahil birçok yolağı etkileyebilmektedir. miRNA mimikleri veya inhibitörleriyle transfeksiyon sonrasında miRNA'daki değişimin hücre canlılığını etkileyip etkilemediği kristal viyole hücre canlılık testiyle analiz edildi. Kontrole göre gruplardaki sonuçlar normalleştirildi. Sadece miR-99a-3p mimiği uygulanan gruplarda canlılık oranı 77,94'e düşmüş iken diğer gruplarda artış gözlendi fakat bu değişimler istatistiki olarak anlamlı değildi (p>0,05).

Fibroblastlar yara iyileşmesi esnasında yaralara göç ederek granülasyon dokusunun oluşması için görev alır. Yara göçündeki hız iyileşme hızını da belirler. Bu nedenle, miRNA'ların aşırı ifade edilmesi veya susturulmasının hücre göçüne etkisi analiz edildi. Bunun için in vitro yara iyileşmesi analizi yapıldı. Kültür kabında oluşturulan boş alana hücrelerin 24 saatte ne kadar ilerlediği analiz edildi. Sadece inhibitörlerin kombine olarak uygulandığı grupta kontrole kıyasla anlamlı bir düşüş görüldü ($p=0,0286$).

Yu ve diğ. (2010) vasküler düz kas hücrelerinde in vitro olarak erken büyüme yanıtı faktörü-1 (EGR-1)'in osteopontine (OPN) bağlanmasında TGF-β'nın rolünü araştırmışlar. Deneylerin sonucunda TGF-β, EGR-1'in OPN bağlanmasını düzenlerken bunu ERK, JNK ve MAPK yolakları aracılığıyla yaptıklarına ve MAPK yolağının hücre göçünde önemli bir rol oynadığına ulaşılmış. Zhang ve diğ. (2021) adenomitik epitelyal hücrelerinde yaptıkları çalışmada *MAPK1*'i miR-30c-5p ile susturulduğunda hücre göçünün, çoğalmasının ve yayılmasının baskılandığını göstermişlerdir. Benzer şekilde Fei ve Wu (2013) da gastrik kanser insan hücre soyu MGC-803 kullanarak miR-378'in *MAPK1* üzerindeki etkisini araştırdıklarında *MAPK1*'in susturulması hücre büyümesini ve göçünü baskıladığını ve apoptozu tetiklediğini bulmuşlar. Analiz sonuçlarımıza baktığımızda, hücre göçünün baskılandığı kombine miRNA inhibitörü uygulanmış grupta çalışmalara paralel olarak *Mapk1* ifade seviyesinde bir azalmanın olduğu fakat bu azalmanın anlamlı olmadığı bulundu ($p>0,05$). miR-877-5p mimiği uygulanan gruptaki 6 kat anlamlı artışla beraber hücre göçü ve canlılığında da artış bulundu fakat bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Chunhua ve diğ. (2012) çeşitli kolorektal kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmalarda *TAGLN*'nin siRNA'lar ile susturulmasının hücre canlılığını artırdığını, *TAGLN'nın* aşırı ifadesinde ise *MMP-9* ifadesini engellediğini ve hücre göçünde düşüşe neden olduğunu göstermişlerdir. SW480 hücrelerinin MMP-9 cDNA'sı ile transfeksiyonu sonrasında da hücrelerde invazyon ve göçün arttığını bulmuşlar. Araştırmacılar TAGLN'nin, *MMP-9*'un ifadesini azaltarak hücre göçünü azalttığını bildirmiştir. Tsui ve diğ. (2019) mesane karsinoma hücrelerinde yaptıkları in vitro çalışmayla *TAGLN*'nin aşırı ifadesinin hücre çoğalmasını, göçünü ve yayılımını azalttığını göstermişlerdir. Bazı hücre tiplerinde ise tersi durum bulunmuştur. Yu ve diğ. (2008) insan akciğer fibrozisinde *TAGLN* ifadesinde artışın olduğunu göstermiş. Fonksiyonunu açıklamak için siRNA ile A549 fare hücre hattında *Tagln*'yi susturulmuş. Bunun sonucunda ise hücre çoğalması ve göçü için TAGLN'nin gerekli olduğunu ortaya koymuşlardır. Buldukları veriler ile TAGLN mRNA ve protein ifadesinin

TGF-ß/Smad3 sinyal yoluyla düzenlendiği gösterilmiş. Bizim sonuçlarımızda da kombine miR mimiği veya inhibitörü uygulandığında hücre göçü hızı azalmasıyla beraber Tagln ve Mmp9 ifade düzeyinde azalmanın olduğu bulundu. Bu da bizi TAGLN'nin hücre göçüne etkisini, MMP9'u baskılaması üzerinden değil de TGF-β/Smad3 yolağı üzerinden gösterdiğini düşündürdü.

Liu ve diğ. (2009) diyabetik yara salgılarında artmış olan *MMP9* ifade seviyelerinin zayıf yara iyileşmesinin habercisi olduğunu bildirmiştir. Normal yara iyileşmesinde *MMP9* ifadesi karmaşık bir süreç içerir ve protein konsantrasyonu iyileşme evresine göre değişir. İnflamatuvar fazda *MMP9* ifadesinin güçlü yukarı düzenlenmesi, zararlı maddelerin fagositozunu ve keratinosit göçünü teşvik eder. Proliferatif fazda ise ECM'nin ve büyüme faktörlerinin aşırı yıkımına karşı koruma sağlamak amacıyla *MMP9* ifadesi hızla azalır. Bu düzenleyici sürecin dengesizliğinin diyabetik ayak ülserleri gibi kronik yaraların oluşumuna yol açtığına inanılmaktadır (Ling ve diğ., 2013). Çalışmamızda kombine miRNA inhibitörü uygulandığında *Mmp9*'un ifadesindeki azalmaya bağlı olarak fibroblastların göçünde de düşüş görüldü. Mmp9'un azalması kollajen yıkımını azaltmış ve buna bağlı olarak da hücre göçünü yavaşlatmış olabilir.

TNF-a yara iyileşmesinde inflamasyonu tetikleyerek ve makrofajlardan çeşitli büyüme faktörlerinin salınmasına sebep olarak yara iyileşmesinde olumlu etkiler gösterir. TNF-a'nın aşırı miktarda ifadesi, MMP'lerin ifadesini arttırarak hücre göçü ve kollajen birikimini önler ve yara iyileşmesi üzerinde olumsuz etkilere sebep olur (Garlet ve diğ., 2012). Akbaş ve diğ. (2020) çalışmalarında primer rat fibroblast kültürü kullanarak *Lucilia sericata* larva salgılarının in vitro etkilerini incelemişler. Etkin yara iyileşmesinde görevi olduğu bilinen bu larva salgısının anlamlı bir şekilde *Tnf* ifadesini düşürdüğünü göstermişler. Bir başka araştırma grubunda ise L929 rat fibroblast hattında Aktivin-a ve TNF-a'nın etkileri araştırılmış. TNF-a'nın fibroblast aracılı fibrozisi baskıladığını ve aktivin-a varlığında da TNF-a'nın bu etkisinin baskılandığı gösterilmiş. İnsan fibroblast hücrelerinde de ikisinin antagonist etkisinin devam ettiği bulunmuş (Jiang ve diğ., 2020). Bizim bulgularımızda da miR-877-5p inhibitör grubunda *Tnf* ifadesindeki 2,39 kat anlamlı bir azalışla beraber *Mmp9* ifadesinde ve yara göçü hızında anlamlı olmasa da artış bulundu. Kombine miR ihibitörü grubunda ise *Tnf* ifadesi 5,18 kat anlamlı azaldığında *Mmp9* ve hücre göçü hızında da anlamlı azalmalar bulundu. *Tnf* ve *Mmp9* arasındaki ilişkiye baktığımızda, *Tnf*'in *Mmp9* üzerinde

etkili olabilmesi için belli bir seviyenin üstünde ifade edilmesi gerekiyor olabilir. *Tnf* seviyesine bağlı olarak *Mmp9*'daki düşüş de hücre göçünün azalmasına etki etmiş olabilir.

Hücreler miRNA mimik veya inhibitörleri ile transfekte edildikten sonra genlerin ifadesinde ters orantılı değişimler görüleceği düşünülmüştü. Yaptığımız qPZR sonucunda bazı mRNA'ların hem mimik hem de inhibitör grubunda kontrole göre aynı yönde değişim gösterdiği ama kıyaslama yapınca bu değişimde de farklılık olduğu bulundu. Bunun birkaç sebebi olabilir. mRNA ifade seviyelerinde beklenen değişimin gözlemlenmeme sebebi, miRNA'ların hedef genlerine kısmi bağlanmasından dolayı olabilir çünkü mRNA ve miRNA arasındaki eşleşme kısmi olduğunda mRNA'lar yıkılmayıp translasyon baskılanır. Bu da protein seviyesinde değişimin görülmesine sebep olur. Bir ihtimal olarak da mRNA'ların ifadesinde ters yönde değişim bulunabilmesi için daha fazla miRNA'nın ortamda bulunması veya baskılanması gerekebilir. Ayrıca, değişen miRNA ve mRNA ifade seviyeleri başka miRNA ve mRNA'ların ifade seviyesini de değiştirdiğinden dolayı, bu bütün gen etkileşimleri, hem inhibitör hem de mimik gruplarındaki mRNA ifade seviyelerinde aynı yönde değişim göstermiş de olabilir.

Özetlemek gerekirse, fibroblastlarda miR-877-5p ifade seviyesindeki artış *Mapk1* ifadesinde 6 kat anlamlı artışa neden oldu. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, *Mapk1*'deki bu artış hücre göçüne ve canlılık oranına olumlu etki etti. 3 miR'in kombine olarak fibroblastlarda artması *Tagln* ifadesini 12,38 kat, *Tnf* ifadesini 8,86 kat ve *Mmp9* ifadesini de 1,61 kat azaltarak hücre göçü hızında da düşüşe neden olurken 3 miR'in kombine olarak fibroblastlarda baskılanması *Tagln* ifadesini 5,88 kat, *Tnf* ifadesini 5,18 kat ve *Mmp9* ifadesini ise 1,5 kat azaltarak yine aynı şekilde hücre göçü hızında düşüşe neden oldu.. Sadece miR-99a-3p'nin baskılanması *Tagln* ifadesinin 5,25 kat artmasına, *Tnf* ifadesinin 1,64 kat azalmasına, *Mmp9* seviyesinde değişikliğe neden olmamasına ve bunların da hücre göçü hızında anlamlı olmasa da artışına neden oldu. Bu sonuçlardan yola çıkarsak TAGLN'nin ve MMP9'un hücre göçü üzerinde etkilerinin olduğu ve bu göçe etkisinin TAGLN'nin MMP9'u baskılaması üzerinden değil de TGF-β/Smad3 yolağı üzerinden gerçekleştirmiş olabileceği söylenebilir. *Tnf* ve *Mmp9* arasındaki ilişkiye baktığımızda ise TNF'in MMP9'u aktive etmesi için belli bir seviyenin üstünde *Tnf*'nin ifade edilmesi gerekiyor olabilir.

Çalışmamızın ikinci aşaması ise miRNA'lardaki değişime bağlı olarak fibroblast hücrelerinin besiyere salgılamış olduğu molekülleri analiz etmeyi içermektedir. İlk aşamada

yapılan çalışmalarda, miRNA inhibitörü ile yapılan transfeksiyonla daha anlamlı değişimler elde edildi. Bu sebeple, inhibitör uygulanmış gruplardaki molekülleri tespit etmek ve miktarını belirlemek için toplanan kültür besiyerleri FTIR spektroskopisi ile analiz edildi. FTIR spektroskopisi, kimyasal bağlardaki titreşimleri tespit edip biyolojik bileşenlere ait fonksiyonel gruplardaki değişimi ve bileşenlerin miktarını denetleyen hassas bir tekniktir. Besiyerlerimizin ölçümünden elde edilen absorbanslardaki bantların nelere ait olabileceği literatür yardımıyla belirlendikten sonra bantların alan hesapları yapıldı ve yorumlandı (Bozkurt ve diğ., 2010; Ozek ve diğ., 2010; Doğan ve diğ., 2013; Güler ve diğ., 2018; Virtanen ve diğ., 2020).

Lipidlerin bulunduğu bantlar 2956 cm^{-1}, 2935 cm^{-1} ve 1454 cm^{-1}'de yer almakta, bu bantların toplam alanları da toplam lipid miktarını vermektedir. Kontrole kıyaslandığında sadece kombine miR inhibitörü grubunda 2935 cm^{-1}'de yer alan alanda artış meydana gelirken ($p<0,0001$) 1454 cm^{-1}'de yer alan alanda ise kontrole kıyasla tüm inhibitör gruplarında artış meydana geldi ($p<0,0001$). Toplam lipid miktarı açısından kontrolle karşılaştırıldığında ise sadece kombine miR inhibitörü uygulandığında lipid miktarında anlamlı artış meydana geldi ($p=0,0017$). Bir diğer lipid bantları olan 1406 cm^{-1} ve 1180 cm^{-1} bantları yağ asitleri, kolesterol ve trigliseridleri göstermektedir. Bu bantların alanı hesaplandığında kontrole kıyasla artış bulundu. Kontrole kıyasla 1406 cm^{-1} bant alanındaki artış miR-99a-3p, miR-877-5p ve miR-877-3p inhibitör gruplarında anlamlı iken ($p=0,0022$) 1180 cm^{-1} bant alanındaki artış sadece miR-877-5p inhibitör grubunda anlamlı bulundu ($p=0,0153$). Bu lipidlerin kaynağı, fibroblast hücreleri tarafından hücre dışına salınan ekzozomlar olabilir.

Protein bantlarının bulunduğu 1654 cm^{-1}, 1549 cm^{-1} ve 1314 cm^{-1} dalga sayılarında bulunan alanlar, sırasıyla amid I, amid II ve kollajen miktarlarını vermektedir. Sadece kombine miR inhibitörü grubundaki amid I ve amid II miktarındaki artış kontrole göre anlamlı bulundu ($p<0,0001$). Kontrole kıyasla tüm gruplardaki kollajen miktarlarında anlamlı artışlar meydana geldi ($p<0,0001$). En çok artış kombine miR inhibitörü grubundaydı. miRNA'ların baskılanması daha fazla kollajen sentezlenip hücre dışına salınmasına neden olmuş olabilir. Ayrıca *Mmp9* seviyelerine baktığımızda da inhibitör gruplarındaki en fazla ifade azalması kombine miR grubunda bulunmuştu. *Mmp9*'un bu grupta daha çok baskılanması, kollajen yıkımını da azaltmış olabilir. Toplam protein miktarı hesaplandığında ise sadece kombine miR grubundaki artış anlamlı bulundu ($p<0,0001$). Kollajen bütünlüğünü

hesaplamak için amid II bant alanı kollajen bant alanına oranlandı. Bu oranın düşmesi, kollajen kalitesinin arttığını göstermektedir. Kontrole kıyasla miR-877-5p ve miR-877-3p inhibitör gruplarında kollajen kalitesi artarken kombine miR inhibitörü grubunda ise kollajen kalitesinde azalma bulundu ($p<0,0001$). Kollajen artışına rağmen amid II'ye göre bu azalış, ortamda yer alan büyüme faktörleri gibi proteinlerdeki artıştan da kaynaklanıyor olabilir.

Protein miktarına göre lipid miktarı oranlandığında kontrol grubuna göre düşüş bulundu. Anlamlı olan bu düşüş sadece kombine miR inhibitörü grubunda bulundu ($p=0,0107$). PO_2^- simetri bandı 1078 cm^{-1} ve 1040 cm^{-1}'de yer alır. Bu bantlar, lipid çift tabakasında bulunan polar bölgedeki fosfat grupları ve DNA-RNA yapısındaki değişiklikleri göstermektedir. Bu alanlardaki değişimler fosfolipid ve nükleik asit miktarını vermektedir. Ayrıca, bu iki bant alanının toplamı glikojen miktarını da vermektedir. İki bant verilerine bakıldığında miR-877-5p ve miR-877-3p inhibitör gruplarında anlamlı artış bulundu (sırasıyla, $p=0,0045$; $p=0,0164$). PO_2^- simetri bantlarının toplamı da paralel şekilde miR-877-5p ve miR-877-3p inhibitör gruplarında anlamlı artışa neden oldu ($p=0,0067$). 1078 cm^{-1} bandı amid II bandına oranlanarak proteine göre nükleik asitin ne kadar değiştiği bulundu. miR-877-5p inhibitör grubunda anlamlı artma bulunurken kombine miR inhibitörü grubunda ise anlamlı azalma bulundu. Kollajen bütünlüğünde de olduğu gibi bu azalma amid II'deki aşırı artıştan kaynaklanmaktadır. miR-877-5p inhibitör grubundaki fosfolipid ve nükleik asitlerdeki artış ekzozom zarlarından ve ekzozomlarla taşınan miRNA gibi nükleik asitlerin artışından kaynaklanıyor olabilir. RNA'ya ait olan 1121 cm^{-1}'deki bant alanı ise kontrole oranla tüm gruplarda artış gösterdi. Bu artış sadece miR-99a-3p'de anlamlı bulundu ($p=0,0257$).

FTIR spektroskopisindeki sonuçları özetlersek, toplam lipid bantlarında kontrole göre anlamlı artış bulundu ($p=0,0017$). Yağ asitleri, kolesterol ve trigliseridleri gösteren bantlarda da anlamlı artışlar bulundu ($p<0,05$). Bu lipidlerin kaynağı, fibroblast hücreleri tarafından hücre dışına salınan ekzozomlar olabilir. Proteinler açısından değerlendirildiğinde toplam protein miktarı hesaplandı ve artış anlamlı bulundu ($p<0,0001$). Kontrole kıyasla tüm gruplardaki kollajen miktarlarında anlamlı artışlar meydana geldi ($p<0,0001$). miRNA'ların baskılanması daha fazla kollajen sentezlenip hücre dışına salınmasına da neden olmuş olabilir. Ayrıca *Mmp9* seviyelerine baktığımızda da inhibitör gruplarındaki en fazla ifade azalması kombine miR grubunda bulunmuştu. *Mmp9*'un bu grupta daha çok baskılanması, kollajen yıkımını da azaltmış olabilir. Protein bantlarından olan amid II bandı için en çarpıcı sonuç, 3,82 kat artış gösteren kombine miR inhibitörü grubundaydı. Diğer gruplara kıyasla bu

gruptaki aşırı artış bize, artan kollajen miktarının yanı sıra, dış ortama salınan büyüme faktörü veya diğer ECM elemanlarının artan miktarını da düşündürdü. Kollajen bütünlüğünü hesaplamak için amid II bant alanı kollajen bant alanına oranlandı. Bu oranın düşmesi, kollajen kalitesinin arttığını göstermektedir. Kontrole kıyasla miR-877-5p ve miR-877-3p inhibitör gruplarında kollajen kalitesi artarken kombine miR inhibitörü grubunda ise kollajen kalitesinde azalma bulundu ($p<0,0001$). Kollajen artışına rağmen amid II'ye göre bu azalış, amid II'nin aşırı artması kaynaklıydı. Fosfolipid ve nükleik aside ait iki banda baktığımızda anlamlı artışlar bulundu (sırasıyla, $p=0,0045$; $p=0,0164$). Bu bantlarının toplamı da paralel şekilde anlamlı artışa neden oldu ($p=0,0067$). Proteine göre nükleik asitin ne kadar değiştiği hesaplandığında, miR-877-5p ve miR-877-3p inhibitör gruplarında anlamlı artış bulunurken kombine miR inhibitörü grubunda ise anlamlı azalma bulundu ($p<0,0001$). Kollajen bütünlüğünde de olduğu gibi bu azalma amid II'deki aşırı artıştan kaynaklanmaktadır. Fosfolipid ve nükleik asitlerdeki artış ekzozom zarlarından ve ekzozomlarla taşınan miRNA gibi nükleik asitlerin artışından kaynaklanıyor olabilir. Fosfolipid ve nükleik asit bant alanlarındaki artışı destekleyecek şekilde, RNA'ya ait olan bant alanı da kontrole oranla tüm gruplarda artış gösterdi ($p=0,0257$). Genel olarak sonuçları değerlendirdiğimizde, bu miRNA'ların baskılanması hücredeki metabolik aktiviteyi değiştirdiği gösterildi.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak fibroblastlarda miR-877-5p ifade seviyesindeki artış *Mapk1* ifadesinde de artışa sebep olup hücre göçünü ve hücre canlılık oranını arttırdı. miRNA inhibitörlerinin kombine olarak kullanılması fibroblastlarda *Tagln*, *Tnf* ve *Mmp9* ifadelerini azaltarak hücre göçü hızında düşüşe neden olduğu bulundu. miR-99a-3p baskılanması *Tagln* ifadesini artmasına ve Tnf ifadesinin düşmesine neden olarak hücre göçü hızı azaldı. TAGLN'nin TGF-β/Smad3 yolağı üzerinden, TNF'nin ise MMP9 üzerinden hücre göçünü etkilediği düşünülebilir.

FTIR spektroskopisi sonuçlarına baktığımızda miRNA'ların baskılanması kollajenin de dahil olduğu proteinlerde artışa neden oldu. Kombine miR grubunda *Mmp9*'un baskılanması sebebiyle kollajen yıkımının baskılanmasından dolayı kollajen miktarında diğer gruplara göre daha fazla artış görüldü. Ayrıca tüm gruplarda kontrole göre artan lipid, fosfolipid, kolesterol, protein nükleik asitler de fibroblastların dış ortama daha fazla ekzozom saldığını ve bu ekzozomlarda miRNA gibi çeşitli nükleik asitlerini de içerdiğini gösteriyor olabilir. Bu çalışma, miRNA'ların tek tek değerlendirilmesinin yanı sıra, kombine etkilerinin değerlendirilmesinin de önemli olduğunu göstermektedir. Biz bu çalışmayla yara iyileşme sürecinde özellikle hücre göçünün ve kollajenin yetersiz olduğu durumlarda terapötik olarak kullanılabilecek aday miRNA'lar olduğunu göstermiş olduk. Buna ek olarak da miR-99a-3p ve mir-877'yle ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Artan sayıdaki in vitro ve in vivo deneyler, yara iyileşmesi mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlayarak sağlıklı yara iyileşme sürecini sürdürmek için daha iyi bir tedavi algoritması geliştirilecektir.

Çalışmamızda çeşitli kısıtlayıcı faktörler bulunmaktadır. İlk olarak biyoinformatik analizlerle elde edilen bu mRNA genlerine miRNA veritabanlarında baktığımızda bazı genler arasında doğrudan bir bağlantı görünse de deneylerimizde böyle bir sonuç bulunamadı. Muhtemelen bazı mRNA-miRNA bağlanmaları kısmi olduğundan dolayı mRNA ifade seviyesinde değişim gözlemlenmedi. Bu etkileşimlerin gösterilmesi için protein ifade seviyelerine bakılması gerekmektedir. Ayrıca mRNA-miRNA'ların arasında dolaylı etkileşim varsa da bu etkileşimlerin aydınlatılması için olası yolaklar araştırılıp bu yolaklardaki gen ve proteinler analiz edilmelidir. İkinci olarak da, yara iyileşmesi in vivo ortamda gerçekleşirken

birçok hücre, molekül ve çevresel faktörler devreye girmekte ve hücre-hücre ve hücre-ECM arasında birçok karmaşık etkileşim görülmektedir. Bu sebeple, hücre kültüründe tek bir hücre tipinde çalışmayı gerçekleştirmek kısıtlayıcı sonuçların elde edilmesine neden olabilir. Makrofaj, keratinosit gibi diğer hücre soylarının da yer aldığı kültür şartlarında deneylerin ve analizlerin yapılmasının bu kısıtlayıcı faktörü engelleyebilir. Çalışmanın in vitro olması nedeniyle in vivo hayvan çalışmalarının yapılması da uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

Abraham, J.A., Klagsbrun, M., 1996, *Modulation of wound repair by members of the fibroblast growth factor family*, The molecular and cellular biology of wound repair, In: Clark, R.A.F., (ed.), 2nd ed. New York: Plenum Press, 195-248.

Akbas, F., Ozaydin, A., Polat, E., Onaran, I., 2020, Lucilia sericata larval secretions stimulating wound healing effects on rat dermal fibroblast cells, *Records of Natural Products*, 14 (5), 340-354.

Ali Syeda, Z., Langden, S.S.S., Munkhzul, C., Lee, M., Song, S.J., 2020, Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer, *Int J Mol Sci*, 21 (5), 1723.

Alonso, J.E., Lee, J., Burgess, A.R., Browner, B.D., 1996, The management of complex orthopedic injuries. *Surg Clin North Am*, 76 (4), 879-903.

Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., Tuschl, T., 2003, A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9 (3), 277-279.

Attinger, C.E., Janis, J.E., Steinberg, J., Schwartz, J., Al-Attar, A., Couch, K., 2006, Clinical approach to wounds: débridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants, *Plast Reconstr Surg,* 117 (7 Suppl), 72S-109S.

Bailey, A.J., Bazin, S., Sims, T.J., Le Lous, M., Nicholetis, C., Delaunay, A., 1975, Characterization of the collagen of human hypertrophic and normal scars. *Biochim Biophys Acta*, 405, 412-421.

Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., Tomic-Canic, M., 2008, Growth factors and cytokines in wound healing, *Wound Repair Regen*, 16 (5), 585-601.

Bartel, D.P., 2004, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 116, 281–297.

Bartel, D.P., 2004, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 116 (2), 281-297.

Bavan, L., Midwood, K., Nanchahal, J., 2011, MicroRNA epigenetics: a new avenue for wound healing research, *BioDrugs*, 25 (1), 27-41.

Bischoff, M., Kinzl, L., Schmelz, A., 1999, The complicated wound, *Unfallchirurg*, 102, 797-804.

Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., Gorlich, D., 2004, Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs, *RNA*, 10, 185–191.

Bozkurt, O., Severcan, M., Severcan, F., 2010, Diabetes induces compositional, structural and functional alterations on rat skeletal soleus muscle revealed by FTIR spectroscopy: a comparative study with EDL muscle, *Analyst*, 135 (12), 3110-3119.

Broughton, 2nd G., Janis, J.E., Attinger, C.E., 2006, The basic science of wound healing, *Plast Reconstr Surg,* 117 (7 Suppl.), 12S-34S.

Brown, E.J., 1995, Phagocytosis, *Bioessays*, 17 (2), 109-117.

Brown, L.F., Yeo, K.T., Berse, B., Yeo, T.K., Senger, D.R., Dvorak, H.F., van de Water, L., 1992, Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing, *J Exp Med*, 176 (5), 1375-1379.

Bugge, T.H., Kombrinck, K.W., Flick, M.J., Daugherty, C.C., Danton, M.J.S., Degen, J.L., 1996, Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency, *Cell*, 87, 709-719.

Chunhua, L., Donglan, L., Xiuqiong, F., Lihua, Z., Qin, F., Yawei, L., Liang, Z., Ge, W., Linlin, J., Ping, Z., Kun, L., Xuegang, S., 2013, Apigenin up-regulates transgelin and inhibits invasion and migration of colorectal cancer through decreased phosphorylation of AKT, *J Nutr Biochem*, 24 (10), 1766-1775.

Clark, R.A.F., 1990, Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin, *J Invest Dermatol*, 94, (6 Suppl), 128S-134S.

Clark, R.A.F., Ashcroft, G.S., Spencer, M-J., Larjava, H., Ferguson, M.W.J., 1996, Reepithelialization of normal human excisional wounds is associated with a switch from avb5 to avb6 integrins, *Br J Dermatol*, 135, 46-51.

Clark, R.A.F., Lanigan, J.M., DellaPelle, P., Manseau, E., Dvorak, H.F., Colvin, R.B., 1982, Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization, *J Invest Dermatol*, 79, 264-269.

Clark, R.A.F., Nielsen, L.D., Welch, M.P., McPherson, J.M., 1995, Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-b, *J Cell Sci*, 108, 1251-1261.

Coskunpinar, E., Arkan, H., Dedeoglu, B.G., Aksoz, I., Polat, E., Araz, T., Aydos, A., Oztemur, Y., Akbas, F., Onaran, I., 2015, Determination of effective miRNAs in wound healing in an experimental Rat Model, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 61 (8), 89-96.

Dalmay, T., 2008, MicroRNAs and cancer, *J Intern Med*, 263 (4), 366-375.

Degreef, H., 1998, How to heal a wound fast, *Dermatol Clin*, 16, 365-375.

Desmouliere, A., Chaponnier, C., Gabbiani, G., 2005, Tissue repair, contraction, and the myofibroblast, *Wound Repair Regen*, 13 (1), 7-12.

Desmoulière, A., Gabbiani, G., 1996, *The role of the myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases*, The molecular and cellular biology of wound repair, In: Clark, R.A.F., (ed.), 2nd ed. New York: Plenum Press, 391-423.

Detmar, M., Brown, L.F., Berse, B., Jackman, R.W., Elicker, B.M., Dvorak, H.F., Claffey, K.P., 1997, Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin, *J Invest Dermatol*, 108 (3), 263-268.

Dogan, A., Lasch, P., Neuschl, C., Millrose, M.K., Alberts, R., Schughart, K., Naumann, D., Brockmann, GA., 2013, ATR-FTIR spectroscopy reveals genomic loci regulating the tissue response in high fat diet fed BXD recombinant inbred mouse strains, *BMC Genomics*, 14, 386.

Eberhart, J.K., He, X., Swartz, M.E., Yan, Y.L., Song, H., Boling, T.C., Kunerth, A.K., Walker, M.B., Kimmel, C.B., Postlethwait, J.H., 2008, MicroRNA Mirn140 modulates Pdgf signaling during palatogenesis, *Nat Genet*, 40 (3), 290-298.

Fei, B., Wu, H., 2012, MiR-378 inhibits progression of human gastric cancer MGC-803 cells by targeting MAPK1 in vitro, *Oncol Res*, 20, 557-564.

Folkman, J., 1997, Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview, *EXS*, 79, 1-8.

Folkman, J., D'Amore, P.A., 1996, Blood vessel formation: what is its molecular basis?, *Cell*, 87, 1153-1155.

Gabbiani, G., Chaponnier, C., Hüttner, I., 1978, Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing, *J Cell Biol*, 76 (3), 561-568.

Garlet, G.P., Horwat, R., Ray, H.L. Jr., Garlet, T.P., Silveira, E.M., Campanelli, A.P., Trombone, A.P., Letra, A., Silva, R.M., 2012, Expression analysis of wound healing genes in human periapical granulomas of progressive and stable nature, *J Endod*, 38 (2), 185-190.

Goliger, J.A., Paul, D.L., 1995, Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication, *Mol Biol Cell*, 6, 1491-1501.

Greenhalgh, D.G., 1998, The role of apoptosis in wound healing, *Int J Biochem Cell Biol*, 30 (9), 1019-1030.

Greiling, D., Clark, R.A.F., 1997, Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci*, 110, 861-870.

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. 2008, miRBase: tools for microRNA genomics, *Nucleic Acids Res*, 36, 154-158.

Guo, N., Krutzsch, H.C., Inman, J.K., Roberts, D.D., 1997, Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells, Cancer Res, 57, 1735-1742.

Güler, G., Açıkgöz, E., Öktem, G., 2018, Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi ile CD133+/CD44+ prostat kanser kök hücrelerinin iki boyutlu ve üç boyutlu ortamdaki hücresel farklılıklarının belirlemesi, *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 33 (1), 45-56.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., Kim, V.N., 2004, The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing, *Genes Dev*, 18, 3016–3027.

Harvey, C., 2005, Wound healing, *Orthop Nurs*, 24 (2), 143-157; quiz 58-59.

Heldin, C-H., Westermark, B., 1996, Role of platelet-derived growth factor in vivo, The molecular and cellular biology of wound repair, In: Clark, R.A.F., (ed.),. 2nd ed. New York: Plenum Press, 249-273.

https://biorender.com, [Ziyaret Tarihi: 29.05.2022].

https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=wound+healing&term=microRNA, [Ziyaret Tarihi: 28.05.2022].

https://info.abmgood.com/miRNA-microRNA-introduction, [Ziyaret Tarihi: 29.05.2022].

https://surgeryreference.aofoundation.org, [Ziyaret Tarihi: 29.05.2022].

Hunt, T.K., (ed.), 1980, *Wound healing and wound infection: theory and surgical practice*, New York: Appleton-Century-Crofts.

Ilan, N., Mahooti, S., Madri, J.A., 1998, Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis, *J Cell Sci*, 111, 3621-3631.

Iruela-Arispe, M.L., Dvorak, H.F., 1997, Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors, *Thromb Haemost*, 78, 672-677.

Jiang, L., Liu, B., Qi, Y., Zhu, L., Cui, X., Liu, Z., 2020, Antagonistic effects of activin A and TNF-α on the activation of L929 fibroblast cells via Smad3-independent signaling, *Sci Rep*, 10 (1), 20623.

Komarcevic, A., 2000, The modern approach to wound treatment, *Med Pregl*, 53, 363-368.

Kuehbacher, A., Urbich, C., Dimmeler, S., 2008, Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis, *Trends Pharmacol Sci*, 29, 12–15.

Labler, L., Mica, L., Härter, L, Trentz, O., Keel, M., 2006, Influence of V.A.C.-therapy on cytokines and growth factors in traumatic wounds. *Zentralbl Chir*, 131 (suppl 1), S62-S67.

Larjava, H., Salo, T., Haapasalmi, K., Kramer, R.H., Heino, J., 1993, Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinoctyes, *J Clin Invest*, 92, 1425-1435.

Lazurus, G.S., Cooper, D.M., Knighton, D.R., Percoraro, R.E., Rodeheaver, G., Robson, M.C., 1994, Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, *Arch Dermatol*, 130, 489-493.

Lee ,Y., Hur, I., Park, S.Y., Kim, Y.K., Suh, M.R., Kim, V.N., 2006, The role of PACT in the RNA silencing pathway, *EMBO J*, 25, 522-532.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, V.N., 2003, The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, *Nature*, 425 (6956), 415-419.

Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., Kim, V.N., MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization, *EMBO J*, 21 (17), 4663-4670.

Leibovich, S.J., Ross, R., 1975, The role of the macrophage in wound repair: a study with hydrocortisone and antimacrophage serum, *Am J Pathol*, 78, 71-100.

Levenson, S.M., Geever, E.F., Crowley, L.V., Oates, J.F. III, Berard, C.W., Rosen, H., 1965, The healing of rat skin wounds, *Ann Surg*, 161, 293-308.

Lin, S.L., Miller, J.D., Ying, S.Y., 2006, Intronic microRNA (miRNA), *J Biomed Biotechnol*, 4, 26818.

Ling, L., Ren, M., Yang, C., Lao, G., Chen, L., Luo, H., Feng, Z., Yan, L., 2013, Role of site-specific DNA demethylation in TNFα-induced MMP9 expression in keratinocytes, *J Mol Endocrinol*, 2013, 50 (3), 279-290.

Liu. Y., Min, D., Bolton, T., Nube, V., Twigg, S.M., Yue, D.K., McLennan, S.V., 2009, Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers, *Diabetes Care*, 32, 117–119.

Madlener, M., Parks, W.C., Werner, S., 1998, Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair, *Exp Cell Res*, 242, 201-210.

Madri, J.A., Sankar, S., Romanic, A.M., 1996, *Angiogenesis*, The molecular and cellular biology of wound repair. In: Clark, R.A.F., (ed.), 2nd ed., New York: Plenum Press, 355-371.

McClain, S.A., Simon M, Jones E, Nandi, A., Gailit, J.O., Tonnesen, M.G., Newman, D, Clark, R.A., 1996, Mesenchymal cell activation is the rate-limiting step of granulation tissue induction, *Am J Pathol*, 149, 1257-1270.

Midwood, K.S., Williams, L.V., Schwarzbauer, J.E., 2004, Tissue repair and the Dynamics of the extracellular matrix, *Int J Biochem Cell Biol*, 36 (6), 1031-1037.

Mignatti, P., Rifkin, D.B., Welgus, H.G., Parks, W.C., 1996, *Proteinases and tissue remodeling*. In: Clark, R.A.F., (ed.), The molecular and cellular biology of wound repair. 2nd ed. New York: Plenum Press, 427-474.

Miller, M.C., Nanchahal, J., 2005, Advances in the modulation of cutaneous wound healing and scarring, *Biodrugs*, 19 (6), 363-381.

Natarajan, S., Williamson, D., Stilt,z A.J., Harding, K., 2000, Advances in wound care and healing technology, *Am J Clin Dermatol*, 1 (5), 269 -275.

Nissen, N.N., Polverini, P.J., Koch, A.E., Volin, M.V., Gamelli, R.L., DiPietro, L.A., 1998, Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing, *Am J Pathol*, 152, 1445-1452.

Ozek, N.S., Tuna, S., Erson-Bensan, A.E., Severcan, F., 2010, Characterization of microRNA-125b expression in MCF7 breast cancer cells by ATR-FTIR spectroscopy, *Analyst*, 135 (12), 3094-3102.

Pilcher, B.K., Dumin, J.A., Sudbeck, B.D., Krane, S.M., Welgus, H.G., Parks, W.C., 1997, The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix, *J Cell Biol*, 137, 1445-1457.

Polat, E., Aksöz, İ., Arkan, H., Coşkunpınar, E., Akbaş, F, Onaran, İ., 2014, Gene expression profiling of Lucilia sericata larvae extraction/secretion-treated skin wounds, *Gene*, 550 (2), 223-229.

Rappolee, D.A., Mark, D., Banda, M.J., Werb, Z., 1988, Wound macrophages express TGF-a and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping, *Science*, 241, 708-712.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., 2000, The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans, *Nature*, 403, 901–906.

Riches, D.W.H., 1996, *Macrophage involvement in wound repair, remodeling, and fibrosis,* The molecular and cellular biology of wound repair, In: Clark, R.A.F., (ed.),. 2nd ed. New York: Plenum Press, 95-141.

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

Rivera, A.E., Spencer, J.M., 2007, Clinical aspects of fullthickness wound healing, *Clin Dermatol*, 25, 39-48.

Robson, M.C., 1997, Wound infection: a failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria, *Surg Clin North Am*, 77, 637 -650.

Robson, M.C., Steed, D.L., Franz, M.G., 2001, Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories, *Curr Probl Surg*, 38, 72-140.

Sand, M., Gambichler, T., Sand, D., Skrygan, M., Altmeyer, P., Bechara, F.G., 2009, MicroRNAs and the skin: tiny players in the body's largest organ, *J Dermatol Sci*, 53 (3), 169-175.

Shilo, S., Roy, S., Khanna, S., Sen, CK., 2007, MicroRNA in cutaneous wound healing: a new paradigm, *DNA Cell Biol*, 26 (4), 227-237.

Singer, A.J., Clark, R.A., 1999, Cutaneous wound healing, *N Engl J Med*, 341 (10), 738-746.

Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L., 2003, The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes, *Nat Struct Biol*, 10, 1026–1032.

Suarez, Y., Ferna´ndez-Hernando, C., Pober, J.S., Sessa, W.C., 2007, Dicer dependent micro-RNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells, *Circ Res*, 100, 1164-1173.

Sun, Q., Zhang, Y., Yang, G., Chen, X., Zhang, Y., Cao, G., Wang, J., Sun, Y., Zhang, P., Fan, M., Shao, N., Yang, X., 2008, Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation, *Nucleic Acids Res* 36, 2690–2699.

Szycher, M., Lee, S.J., 1992, Modern wound dressings: a systematic approach to wound healing, *J Biomater*, 7, 142-213.

Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J., Baltimore, D., 2006, NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 12481–12486.

Tili, E., Michaille, J.J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C.D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C.G., Calin, G.A., Croce, C.M., 2007, Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock, *J Immunol*, 179, 5082–5089.

Toole, B.P., 1991, *Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation,* Cell biology of extracellular matrix, In: Hay, E.D., (ed.), 2nd ed. New York: Plenum Press, 305-341.

Tsui, K.H., Lin, Y.H., Chang, K.S., Hou, C.P., Chen, P.J., Feng, T.H., Juang, H.H., 2019, Transgelin, a p53 and PTEN-upregulated gene, inhibits the cell proliferation and invasion of human bladder carcinoma cells in vitro and in vivo, *Int J Mol Sci*, 20 (19), 4946.

Vaalamo, M., Mattila, L., Johansson, N., Kariniemi, A.L., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Kähäri, V.M., Saarialho-Kere, U., 1997, Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds, *J Invest Dermatol*, 109, 96-101.

Vanwijck, R., 2001, Surgical biology of wound healing, *Bull Mem Acad R Med Belg*, 115, 175-184.

Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V., 2009, The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms, J Int Med Res, 37 (5), 1528-1542.

Virtanen, V., Tafintseva, V., Shaikh R., Nippolainen E., Haas, J., Afara I.O., Töyräs, J., Kröger, H., Solheim, J., Zimmermann, B., Kohler, A., Mizaikoff, B., Finnilä, M., Rieppo, L., Saarakkala, S., 2022, Infrared spectroscopy is suitable for objective assessment of articular cartilage health, *Osteoarthritis and Cartilage Open*, 4, 100250.

Welch, M.P., Odland, G.F., Clark, R.A.F., 1990, Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction, *J Cell Biol*, 110, 133-145.

Wilkinson, H.N., Hardman, M.J., 2020, Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes, *Open Biol*, 10 (9), 200223.

Wojciechowska, A., Braniewska, A., Kozar-Kamińska, K., 2017, MicroRNA in cardiovascular biology and disease, *Adv Clin Exp Med*, 26 (5), 865-874.

Xu, J., Clark, R.A.F., 1996, Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins, *J Cell Biol*, 132, 239-249.

Yi, R., O'Carroll, D., Pasolli, H.A., Zhang, Z., Dietrich, F.S., Tarakhovsky, A., Fuchs, E., 2006, Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs, *Nat Genet*, 38, 356–362.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R., 2003, Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs, *Genes Dev*, 17, 3011-3016.

Yu, H., Königshoff, M., Jayachandran, A., Handley, D., Seeger, W., Kaminski, N., Eickelberg, O., 2008, Transgelin is a direct target of TGF-beta/Smad3-dependent epithelial cell migration in lung fibrosis. *FASEB J*, 22 (6), 1778-1789.

Yu, H.W., Liu, Q.F., Liu, G.N., 2010, Positive regulation of the Egr-1/osteopontin positive feedback loop in rat vascular smooth muscle cells by TGF-beta, ERK, JNK, and p38 MAPK signaling. *Biochemical and biophysical research communications,* 96, 451–456.

Zhang, A., Liu, X., Wang, J., Deng, K., Wang, J., 2021, MiR-30c-5p directly targets MAPK1 to regulate the proliferation, migration and invasion of adenomyotic epithelial cells in adenomyosis. *Twin Res Hum Genet*, 24 (1), 22-28.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİR-99A-3P ve MİR-877'NİN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIGINALITY REPORT

9%	9%	3%	3%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	2%
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Student Paper	1%
3	humicaderm.com.tr Internet Source	1%
4	9lib.net Internet Source	<1%
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 Internet Source	<1%
6	Submitted to University of KwaZulu-Natal Student Paper	<1%
7	Submitted to 9561 Student Paper	<1%
8	Submitted to Anadolu University Student Paper	<1%

dergipark.org.tr