

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PRP'DEN ELDE EDİLEN LİPİD FRAKSİYONUNUN YARA İYİLEŞME
TEDAVİSİNDE ETKİSİ VE İLİŞKİLİ GENLERİN mRNA EKSPRESYON
PROFİLLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra ÖZDEMİR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

HAZİRAN 2017

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PRP'DEN ELDE EDİLEN LİPİD FRAKSİYONUNUN YARA İYİLEŞME
TEDAVİSİNDE ETKİSİ VE İLİŞKİLİ GENLERİN mRNA EKSPRESYON
PROFİLLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Büşra ÖZDEMİR
(150305118)**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

HAZİRAN 2017

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 150305118 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Büşra ÖZDEMİR, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “PRP'DEN ELDE EDİLEN LİPİD FRAKSİYONUNUN YARA İYİLEŞME TEDAVİSİNDE ETKİSİ VE İLİŞKİLİ GENLERİN MRNA EKSPRESYON PROFİLLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Fahri AKBAŞ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. İlhan ONARAN**
İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Gözde YEŞİL
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi **: 27 Nisan 2017**
Savunma Tarihi **: 9 Haziran 2017**



Biricik eşim Mustafa Özdemir'e ve canım aileme,

ÖNSÖZ

Tezimin her aşamasında, çalışmamı yönlendiren, bilgi, tecrübeleri ile bana ışık tutan, emeğini ve yardımlarını esirgemeyerek öğrenmeye katkıda bulunan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Fahri Akbaş'a; rehberliği, ilgi, anlayış ve desteği için saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın başından sonuna kadar bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım her aşamada yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan çok değerli hocam Prof. Dr. İlhan ONARAN' a

Tezimin deneysel hazırlık aşamalarında yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı'ndan Dr. Nurten Bahtiyar'a, yine tezimin her aşamasında desteğini ve bilgisini benimle paylaşan arkadaşım Msc. Çilem Ercan'a;

Tezimin her aşamasında manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Nazlı Arlı, Zekiye Dişçi, Hülya Arkan'a ve Yıldız Pehlivan Karacan' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayvan deneylerimiz sürecinde bir an olsun güler yüzlerini yardımlarını bilgilerini ve tecrübelerini esirgemeyen Önder Hüseyinbaş' a ve Nurhayat Dönek'e,

Adeta hayat üniversitesi mezunu olup edindiği tecrübelerini bilgilerini ve tavsiyelerini esirgemeyen kayınpederim Ramazan Özdemir'e ve kayınvalideme,

Eğitim hayatımın her aşamasında her türlü desteğini esirgemeyen, her zaman anlayışla ve sabırla yanımda olan mesafelere rağmen sevgilerini bir an dahi esirgemeyen canımın içi annem, babam, ablam ve abime,

Yüksek lisansımın tüm süreçlerinde bir an bile maddi manevi desteğini esirgemeyen sabırla her koşulda yanımda olan bana hep doğru olan yolu gösteren ve en doğru kararı vererek hayatımı birleştirdiğim çok sevgili eşim Mustafa Özdemir'e

Araştırmamızı destekleyen Bezmialem Vakıf Üniversitesinin, Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne teşekkür ederim.

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı tarafından 12. 2016 /26 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2017

Büşra Yıldızhan Özdemir
Uzman Biyolog

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Büşra Özdemir

İmza

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖNSÖZ | iv |
| BEYAN | v |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| KISALTMALAR | viii |
| SEMBOLLER | ix |
| TABLO LİSTESİ | xi |
| ŞEKİL LİSTESİ | xii |
| ÖZET | xiv |
| SUMMARY | xv |
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1 Deri..... | 3 |
| 2.1.1 Derinin görevleri | 3 |
| 2.1.2 Derinin yapısı | 4 |
| 2.2 Yara..... | 7 |
| 2.2.1 Yara iyileşmesi aşamaları | 7 |
| 2.2.2 Yara iyileşmesinde rol oynayan faktörler | 13 |
| 2.2.3 Yara iyileşme şekilleri ve tedavileri..... | 14 |
| 2.3 PRP (Plateletten Zengin Plazma)..... | 15 |
| 2.3.1 PRP' nin içeriği ve avantajları | 17 |
| 2.3.2 PRP' nin kullanım alanları | 18 |
| 2.3.3 PRP' den elde edilen lipid fraksiyonu..... | 19 |
| 2.4 Yara İyileşmesi Sürecinde Görev Alan Moleküler Mekanizmalar | 19 |
| 2.4.1 Büyüme faktörleri | 20 |
| 2.4.2 İnflamatuar sitokin ve kemokinler | 20 |
| 2.4.3 Ekstraselüler matriks ve hücre adezyonu | 22 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 24 |
| 3.1 Gereçler..... | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.1 Cihazlar | 24 |
| 3.1.2 Ticari kitler ve sarf malzemeler | 25 |
| 3.1.3 Kimyasallar | 26 |
| 3.2. YÖNTEM..... | 27 |
| 3.2.1 Tampon solüsyonlar ve çözeltiler | 27 |
| 3.2.2 PRP ve PRP'den Elde Edilen Lipid Fraksiyonu | 28 |
| 3.2.3 Hayvan Deneyleri | 29 |
| 3.2.4 Genetik Analiz Deneyleri..... | 32 |
| 3.2.5 İstatistiksel analizler..... | 37 |
| 4. BULGULAR | 39 |
| 4.1 Makroskopik Bulgular | 39 |
| 4.1.1 Yara alanlarına ait bulgular..... | 40 |
| 4.1.2 Yara kontraksiyonlarına bağlı istatistiksel bulgular..... | 42 |
| 4.2 Moleküler Bulgular | 43 |
| 4.2.1 Yara iyileşmesinin erken (3. gün) evresine ait moleküler bulgular | 45 |
| 4.2.2 Yara iyileşmesinin orta (7. gün) evresine ait moleküler bulgular..... | 49 |
| 4.2.3 Yara iyileşmesinin geç (14. gün) evresine ait moleküler bulgular | 52 |
| 4.2.4 PRP ve LF tedavi gruplarına özgü bulgular..... | 55 |
| 5.TARTIŞMA | 57 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 66 |
| KAYNAKLAR | 67 |
| EKLER..... | 73 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 81 |

KISALTMALAR

| | |
|--------------|--------------------------------------|
| cDNA | :Komplementer Dioksiribonükleik asit |
| cm | :Santimetre |
| DNA | :Deoksiribonükleik asit |
| DMSO | :Dimetil Sülfoksit |
| DNaz | :Deoksiribonükleaz |
| ECM | :Ekstrasellüler Matriks |
| kg | :Kilogram |
| µl | :Mikrolitre |
| mg | :Miligram |
| miRNA | :Mikro RNA |
| mm | :Milimetre |
| MMP | :Matriks Metalloproteinaz |
| MMPs | :Matriks Metalloproteinaz enzimleri |
| mRNA | :Mesajcı RNA |
| ng | :Nanogram |
| nm | :Nanometre |
| PBS | : Fosfat tamponlu tuz çözeltisi |
| PCR | :Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| PMN | :Polimorfonükleer Lökosit |
| PRP | :Plateletten Zengin Plazma |
| RNaz | :Ribonükleaz |
| TNF-α | :Tümör Nekrozis Faktörü-α |

SEMBOLLER

| | |
|----------------|--|
| Acta2 | :Düz kas alfa aktin |
| Actc1 | :Kardiyak aktin alfa 1 |
| Angpt | :Anjiyopoetin 1 |
| Ccl12 | :Kemokin (C-C motif) ligand 12 |
| Ccl7 | :Kemokin (C-C motif) ligand 7 |
| Cd40lg | :CD40 ligand |
| Cdh1 | :Cadherin 1 |
| Col14a1 | :Kollajen, tip XIV, alfa 1 |
| Col1a1 | :Kollajen, tip I, alfa 1 |
| Col1a2 | :Kollajen, tip I, alfa 2 |
| Col3a1 | :Kollajen, tip III, alfa 1 |
| Col4a1 | :Kollajen, tip IV, alfa 1 xii |
| Col4a3 | :Kollajen, tip IV, alfa 3 |
| Col5a1 | :Kollajen, tip V, alfa 1 |
| Col5a2 | :Kollajen, tip V, alfa 2 |
| Col5a3 | :Kollajen, tip V, alfa 3 |
| Csf2 | :Koloni uyarıcı faktör 2 (granülosit/makrofaj) |
| Csf3 | :Koloni uyarıcı faktör 3 (granülosit) |
| Ctgf | :Bağ doku büyüme faktörü |
| Ctnnb1 | :Catenin, beta 1 |
| Ctsg | :Cathepsin G |
| Ctsk | :Cathepsin K |
| Ctsl1 | :Cathepsin L1 |
| Cxcl1 | :Kemokin (C-X-Cmotif) ligand 1(melanoma büyüme uyarıcı aktivitesi) |
| Cxcl11 | :Kemokin (C-X-C motif) ligand 11 |
| Cxcl3 | :Kemokin (C-X-C motif) ligand 3 |
| Cxcl5 | :Kemokin (C-X-C motif) ligand 5 |
| Egf | :Epidermal büyüme faktörü |
| Egfr | :Epidermal büyüme faktörü reseptörü |
| F13a1 | :Pıhtılaşma faktörü XIII, A1 polipeptid |
| F3 | :Pıhtılaşma faktörü III (tromboplastin, doku faktörü) |
| Fga | :Fibrinojen alfa zinciri |
| Fgf10 | :Fibroblast büyüme faktörü 10 |
| Fgf2 | :Fibroblast büyüme faktörü 2 |
| Fgf7 | :Fibroblast büyüme faktörü 7 |
| Hbegf | :Heparin-bağlayan EGF benzeri büyüme faktörü |
| Hgf | :Hepatosit büyüme faktörü |
| Ifng | :Interferon gamma |
| Igf1 | :Insülin benzeri büyüme faktörü 1 |
| Il10 | :Interlökin 10 |
| Il1b | :Interlökin 1 beta |

| | |
|-----------------|---|
| Il2 | :Interlökin 2 |
| Il4 | :Interlökin 4 |
| Il6 | :Interlökin 6 |
| Il6st | :Interlökin 6 sinyal taşıyıcı |
| Itga1 | :Integrin, alfa 1 |
| Itga2 | :Integrin, alfa 2 |
| Itga3 | :Integrin, alfa 3 |
| Itga4 | :Integrin, alfa 4 |
| Itga5 | :Integrin, alfa 5 (fibronektin reseptör, alfa polipeptid) |
| Itga6 | :Integrin, alfa 6 |
| Itgav | :Integrin, alfa V |
| Itgb1 | :Integrin, beta 1 |
| Itgb3 | :Integrin, beta 3 |
| Itgb5 | :Integrin, beta 5 |
| Itgb6 | :Integrin, beta 6 |
| Mapk1 | :Mitojen aktif protein kinaz 1 |
| Mapk3 | :Mitojen aktif protein kinaz 3 |
| Mif | :Makrofaj göç inhibisyon faktör |
| Mmp1a | :Matriks metallopeptidaz 1a |
| Mmp2 | :Matriks metallopeptidaz 2 |
| Mmp7 | :Matriks metallopeptidaz 7 |
| Mmp9 | :Matriks metallopeptidaz 9 |
| Pdgfa | :Trombosit kaynaklı büyüme faktörü alfa |
| Plat | :Plazminojen aktivatör, doku |
| Plau | :Plazminojen aktivatör, ürokinaz |
| Plaur | :Plazminojen aktivatör, ürokinaz reseptör |
| Plg | :Plazminojen |
| Pten | :Fosfataz and tensin homolog |
| Ptgs2 | :Prostaglandin-endoperoksit sentaz 2 |
| Rac1 | :Ras ilişkili C3 botulinum toksin substrat 1 |
| Rhoa | :Ras homolog gen ailesi, A |
| Serpine1 | :Serpine peptidaz inhibitor, 1 |
| Stat3 | :Signal taşıyıcı ve transkriptin 3 aktivatörü |
| Tagln | :Transgelin |
| Tgfa | :Transforming büyüme faktörü alfa |
| Tgfb1 | :Transforming büyüme faktörü, beta 1 |
| Tgfb3 | :Transforming büyüme faktörü, beta reseptör III |
| Timp1 | :TIMP metallopeptidaz inhibitor 1 |
| Tnf | :Tumor necrosis faktör |
| Vegfa | :Vasküler endothelyal büyüme faktörü A |
| Vtn | :Vitronectin |
| Wisp1 | :WNT1 uyarılabilen sinyal yolak proteini 1 |
| Wnt5a | :Kanatsız tip bütünleyici gen ailesi 5A |

TABLO LİSTESİ

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Tablo 2.2: Büyüme faktörleri ve sitokinlerin doku onarımındaki işlevleri | 21 |
| Tablo 3.1: Kullanılan cihazların listesi..... | 24 |
| Tablo 3.1 (devam): Kullanılan cihazların listesi | 25 |
| Tablo 3.2: Kullanılan ticari kit ve sarf malzeme listesi..... | 25 |
| Tablo 3.2 (devam): Kullanılan ticari kit ve sarf malzeme listesi..... | 26 |
| Tablo 3.3: Kullanılan kimyasallar listesi..... | 26 |
| Tablo 3.4: Günlere göre tedavi ve biyopsi alımı. | 31 |
| Tablo 3.5: cDNA sentezi reaksiyon karışımı. | 34 |
| Tablo 3.6: GAPDH gen primerleri. | 34 |
| Tablo 3.7: Kontrol RT-PCR reaksiyon karışımı. | 35 |
| Tablo 3.8: Biyopsi günlerine göre oluşturulan cDNA havuzları..... | 36 |
| Tablo 3.9: Yara iyileşmesi panelinin plate üzerinde gen-primer dağılımı | 36 |
| Tablo 3.10: Bir cDNA havuzu için hazırlanan qPCR reaksiyon karışımı..... | 37 |
| Tablo 4.1 : 3., 7. ve 14. günlerde yara kontraksiyon yüzelikleri | 40 |
| Tablo 4.2 : Hesaplanan “p” değerleri. | 42 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Şekil 2.1: Derinin katmanları | 4 |
| Şekil 2.2: Epidermisin tabakaları..... | 5 |
| Şekil 2.4: PRP eldesi | 16 |
| Şekil 3.1: Çalışmamıza ait diyagram | 27 |
| Şekil 3.2: Yara alanlarının oluşturulması ve konumu. | 30 |
| Şekil 3.3: Gruplara ait tedavi planı (Resimler deneyler sırasında çekilmiştir.)..... | 31 |
| Şekil 4.1: Hayvan deneyleri süresince izlenen yaralara ait fotoğraflar. | 39 |
| Şekil 4.2: 3. Güne ait yara kontraksiyon verileri. | 41 |
| Şekil 4.3: 7. Güne ait yara kontraksiyon verileri. | 41 |
| Şekil 4.4: 14. Güne ait yara kontraksiyon verileri. | 42 |
| Şekil 4.5: Toplam RNA izolasyonuna ait spektrometrik ölçümde absorpsiyon eğrisi (260 nm). | 43 |
| Şekil 4.6: cDNA' lar ile yapılan kontrol RT-PCR'ına ait amplifikasyon eğrisi. | 44 |
| Şekil 4.7: RT-PCR'ı yapılan 2., 7. ve 11. cDNA havuzlarına ait amplifikasyon eğrilerine örnek..... | 44 |
| Şekil 4.8: Biyopsi günlerinde görülen moleküler gen regülasyonlarının yüzdelikleri | 45 |
| Şekil 4.9: 3. Gün PRP tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği | 46 |
| Şekil 4.10: 3. Gün LF tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği | 46 |
| Şekil 4.11: 3. Gün DMSO tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği | 47 |
| Şekil 4.12: 3. Güne ait LF tedavi grubunda PRP grubuna göre gen regülasyon grafiği | 47 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.13: 3. Gün PRP tedavi grubunun DMSO grubuna göre gen regülasyon grafiği | 48 |
| Şekil 4.14: 3. Gün LF tedavi grubunun DMSO grubuna göre gen regülasyon grafiği | 48 |
| Şekil 4.15: 7. Gün PRP tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği | 49 |
| Şekil 4.16: 7. Gün LF tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği | 49 |
| Şekil 4.17: 7. Gün DMSO tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği | 50 |
| Şekil 4.21: 14. Gün PRP tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyonu... | 52 |
| Şekil 4.22: 14. Günde LF tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği | 52 |
| Şekil 4.23: 14. Gün DMSO tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği | 53 |
| Şekil 4.24: 14. Gün LF tedavi grubunun PRP grubuna göre gen regülasyon grafiği | 53 |
| Şekil 4.25: 14. Gün PRP tedavi grubunun DMSO grubuna göre gen regülasyon grafiği | 54 |
| Şekil 4.26: 14. Gün LF tedavi grubunun DMSO grubuna göre gen regülasyon grafiği | 54 |
| Şekil 4.27: 3. 7. ve 14. günlerde PRP tedavi grubunun SHAM grubuna oranla bazı genlerdeki regülasyon grafiği | 55 |
| Şekil 4.28: 3. 7. ve 14. günlerde LF tedavi grubunun SHAM grubuna oranla bazı genlerdeki regülasyon grafiği | 56 |

PRP'DEN ELDE EDİLEN LİPİD FRAKSİYONUNUN YARA İYİLEŞME TEDAVİSİNDE ETKİSİ VE İLİŞKİLİ GENLERİN mRNA EKSPRESYON PROFİLLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Günümüzde yara iyileşmesi tedavisi olarak uygulanan birçok yöntem olmasına karşın yara kapanma hızını arttırmak, en az yara izi oluşumunun sağlamak ve hissedilen acıyı en aza indirmek amacıyla yara üzerine çalışmalar devam etmektedir. Son zamanlarda, içerdiği bileşenlerin rejenerasyonu artırıcı etkisi ortaya konulan PRP (plateletten zengin plazma) tedavisi, yara iyileşmesi çalışmalarının da popüler konusu haline gelmiştir. PRP'nin içeriğini oluşturan protein ve lipid yapılı biyoaktif biyomoleküller yara iyileşmesini moleküler düzeyde uyararak iyileşmeyi hızlandırırlar. PRP'nin bileşenlerinden protein yapılı olanların yara bölgesinde bulunan proteaz aktivitesi ile yıkılarak işlevsiz hale geldiği bu sebeple PRP'nin iyileştirici etkisinin protein yapılı bileşenlerinden ziyade lipid yapılı olanların aktivitesi ile gerçekleştiği üzerine yapılan *in vitro* çalışmalar literatürde yer almaktadır. Söz konusu hipotezin *in vivo* olarak test edilmesi, tez çalışmamızın konusu olup, PRP'den elde edilen lipid fraksiyonunun yara iyileşmesi üzerindeki etkisi makroskopik ve moleküler olarak değerlendirilmiştir. Makroskopik anlamda yara alanlarına bağlı yara kontraksiyon hesaplamaları yapılırken moleküler anlamda ise yara iyileşmesiyle ilişkili olduğunu bildiğimiz 84 tane farklı genin mRNA ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. mRNA protein sentezinde genetik şifreyi taşıyan RNA molekülü olup ekspresyon profillerinin değerlendirilmesi yara iyileşmesi süresince moleküler seviyede meydana gelen protein sentezi hakkında bilgi vermektedir. Çalışmamızın hayvan deneyleri, 20 tane Sprague Dawley türü sıçanların sırt bölgelerinde yaklaşık 1.2 cm çapında dairesel tam kat yaralar oluşturularak 4 farklı grup üzerinden tamalanmıştır. PRP, lipid fraksiyonu, DMSO ve SHAM grublarına ait yaralardan yara iyileşmesinin inflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma (yeniden şekillenme) evrelerine denk gelen 3., 7., ve 14. günde biyopsi örneği alındı. Alınan biyopsi örneklerinden yararlanılarak PCR array tekniği ile gerçek zamanlı PCR yapıldı ve yara iyileşmesi genlerine ait ekspresyon seviyeleri analiz edildi. $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile kat değişimleri hesaplandı ve artış veya azalış gösteren genler belirlendi. Günlere göre regülasyon gösteren gen sayısı bakımından en fazla sayıda gen regülasyonu proliferasyon evresinde gözlenmiştir. PRP ve lipid fraksiyonu tedavi grupları inflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşmada benzer regülasyonları gösterse de kat değişimleri açısından PRP daha fazla fark göstermiştir. Makroskopik değerlendirmelerde lipid fraksiyonu tedavi grubuna ait yaraların PRP'ye göre kapanma hızının daha az olduğu tespit edilmiştir. PRP grubuna ait yara kontraksiyon bulguları T-test ile analiz edildi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. PRP tedavi grubu ve lipid fraksiyonu tedavi grubuna ait RT-PCR verileri, moleküler seviyede benzerlik göstermeleri açısından PRP'den elde edilen lipid fraksiyonu, PRP'nin sahip olduğu içeriğe ve iyileştirici etkiye sahip olduğu ancak PRP'nin daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Yara, Yara İyileşmesi, PRP, Lipid Fraksiyonu, mRNA Profili, PCR Array

THE EFFECTS OF LIPID FRACTION OBTAINED FROM PRP ON THE WOUND HEALING CARE AND TO EVALUATE EXPRESSION PROFILES OF mRNA RELATED GENES

SUMMARY

Nowadays, there are many wound healing therapy methods but yet to increase rate of wound contraction, to provide least scar forming and to decrease feeling pain lots of studies on wound and wound healing are going on. In recent years, it is revealed that the ingredients of PRP have an intensifier effect on regeneration and therefore PRP treatment has become a popular topic for wound healing. Protein and lipid structured bioactive biomolecules are components of PRP and they accelerate healing via stimulating wound healing at the molecular level. According to an *in vitro* study in literature, during wound healing protein structured components of PRP are being degraded by protease enzymes' activity, therefore healing effect of PRP is going on with lipid structured components of PRP that is lipid portion of PRP. On the basis of this hypothesis, thesis's idea is designated as to evaluate the macroscopic and molecular effects of lipid portion of PRP on the wound healing via *in vivo* experimental set up. For macroscopic testing, wound contraction calculations dependent on wound areas were registered while for the molecular testing, mRNA expressions of 84 different genes related with wound healing were analyzed. mRNA that is RNA molecule transporting genetic code for protein synthesis, assesment of mRNA expression profiles provide the information about the molecular level protein synthesis during the wound healing. Animal experiments part of our study have been completed with 20 Sprague Dawley rats as four different groups with 1.2 diameter circular full thickness wounds were defected on their's dorsum region. Groups were PRP, lipid portion, DMSO and SHAM (as control). Then, biopsy samples have been taken from wounds on 3., 7., ve 14. days. After mRNA isolation from biopsy samples and cDNA synthesis from mRNA, w a PCR array technique, real-time PCR, were made to analyse expression levels of genes related with wound healing. $2^{-\Delta\Delta CT}$ procedure has been used with fold change values to determine which genes upregulate and downregulate their expression. When regulations' results were analyzed with respect days of biopsy taken, the most number of gene expression alterations were seen at proliferation phase as percentaged. Although PRP and lipid portion treatment groups show similar regulation at the stages of wound healing as inflamation, proliferation and maturation, PRP group's fold changes on some genes were more than lipid portion. According to macroscopic evaluations, rate of wound contraction of lipid portion treatment group's wounds were less than PRP treatment group's wounds. PRP group's wound contraction data were analyzed with T-Test and it was meaningful statistically. As a result, RT-PCR data belong to PRP and lipid portion treatment groups have appeared similar at the molecular level, lipid portion obtained from PRP has component and healing effect of PRP but PRP is more effective on the wound healing.

Key Words : Wound, Wound Healing, PRP, Lipid Portion, mRNA Profile, PCR Array

I would like to thank Bezmialem Scientific Research Projects Unit for its financial support.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hayvanların çoğunda ve insanlarda bulunan deri yüzey alanı bakımından en büyük, pozisyon bakımından ise en dışta bulunan organ olup organizmayı dışardan gelebilecek her türlü zararlı girişime karşı korumakla görevlidir. Ancak, istenmeyen travmatik sebeplerle derinin bütünlüğü bozulabilmekte ve yara oluşabilmektedir. Deri bütünlüğünün tekrardan sağlanabilmesi açısından yara ve yara iyileşmesi tıp biliminin her zaman en çok ilgilendiği alanlardan biri olmuştur. Yara iyileşme hızını arttırmak, yara izi oluşumunu azaltmak ve yaraya bağlı ağrıları dindirmek için geçmişten günümüze kadar yara iyileşmesi konusunda birçok çalışma yapılmıştır ve literatür bu konuda oldukça zengindir.

Yara iyileşmesi, travmaya bağlı deri bütünlüğünün bozulması sonrası yara bölgesinin oluşması ile başlayan çok sayıda hücrenel ve biyokimyasal süreçlerin bulunduğu moleküler olarak sıralı, düzenli bir olaylar zinciridir. Yara iyileşmesinde görev alan fibroblastlar , miyofibroblastlar, düz kas hücreleri, keratinositler ve immun hücreler kendi aralarında efektif şekilde kolarasyon sağlarlar ve derinin bozulan bütünlüğü geri sağlanmasında etkin rol oynarlar. Yara iyileşmesi birbirleriyle ilişkili üç temel evreden oluşan karmaşık bir süreçtir [1 ,2]. İnflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma (yeniden şekillenme) yara iyileşmesinin fazları olup bu süreçlerin her birinde birbirleriyle bağlantılı moleküler yolaklar görev almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile bu süreçlerde görev alan genlerin varlığı tespit edilmiş olup mesajcı RNA(mRNA) ve mikro RNA(miRNA) seviyelerinde çeşitli bulgular elde edilmiştir. Yapılan moleküler analiz çalışmaları ile yara iyileşmesiyle yakından ilişkili 100 civarında farklı genin ekspresyonu bilinmektedir [3].

Yara iyileşmesi tedavisine alternatif ve modern tıbbın çeşitli yaklaşımları ve çözümleri bulunmakla beraber ; yeni arayışlarda devam etmektedir. Amaç iyileşmeyi arttırmak, enfeksiyonu önlemek ve onarımı sağlamaktır. Yara tiplerine göre farklı tedaviler uygulanmaktadır [4]. Son zamanlarda literatüre yeni katılan plateletten zengin plazma (PRP) tedavisi, üzerinde hala çalışmaların devam ettiği yara iyileştirici etkisi de çeşitli çalışmalarca kanıtlanmıştır [5].

PRP tam kanın belirli koşullarda santrifüj edilmesiyle elde edilen trombosit bakımından zengin ve yoğun miktarda büyüme faktörlerinden oluşan bir komponenttir [6]. PRP nin iyileştirici etkisi otolog uygulamalar ile *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla defalarca gözlemlenmiş ve literatüre katılmıştır. Sonuç olarak PRP' nin doğal iyileşmeyi ve yumuşak doku yapımını hızlandırıcı etkiye sahip olduğu bilinmektedir [6].

PRP ile ilgili yapılan bazı çalışmalar incelendiğinde PRP yi oluşturan zengin içeriğin protein yapılı olduğu ve yara bölgesinde bulunan proteinaz enzimlerinin aktivasyonu ile yıkıma uğrayabileceği üzerinde çalışılmaktadır. Buna bağlı olarakda asıl iyileştirici etkiyi PRP de bulunan yağ asitlerinin gösterdiği üzerine yapılan *in vitro* çalışma da literatüre katılmıştır [7].

PRP ile ilgili literatür bilgisine dayanarak çalışmamızda PRP ve PRP' den elde edilen lipid fraksiyonunun yara iyileşmesi tedavisindeki etkisi, yara iyileşmesiyle ilgili genlerin mRNA ekspresyon profilleri moleküler seviyede incelenmiştir. Bu konuda yapılan *in vitro* çalışmayı, çalışmamızla beraber *in vivo* olarak da çalışarak literatüre bu konuda yeni bilgiler kazandırmak yaptığımız araştırmanın kısa vadeli hedeflerindedir. Çalışmamızın uzun vadeli hedefi ise var olan yara iyileşmesi tedavilerine alternatif çözümler ve yenilikler katarak klinik düzeyde kullanılabilir bir yöntem önermektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Deri

Tüm insanlarda ve hayvanların çoğunda ortak olarak bulunan organlardan biri olan deri kendine özgü birçok fonksiyona sahip olup organizmayı en dıştan saran, merkeze en uzak ve hacim olarak en büyük organdır. Yetişkin bir insan derisi yaklaşık 2,7 kg ağırlığındadır ve 1,7 m² alana sahiptir [8]. Derinin yüzölçümü miktarı kan hacmi, vital kapasite ve metabolizma hızı hesaplamalarında önem taşımaktadır. Derinin bulunduğu bölgeye göre kalınlığı değişkenlik gösterebilir ve bu değer 0,5 mm'den 4 mm'ye kadar ulaşabilir. Yaş, cinsiyet, beden iriliği derinin yüz ölçümünü değiştiren etkenlerdendir ve derinin rengi “melanin” maddesinin yoğunluğuna bağlı olarak organizmadan organizmaya değişkenlik gösterebilir [9].

2.1.1. Derinin görevleri

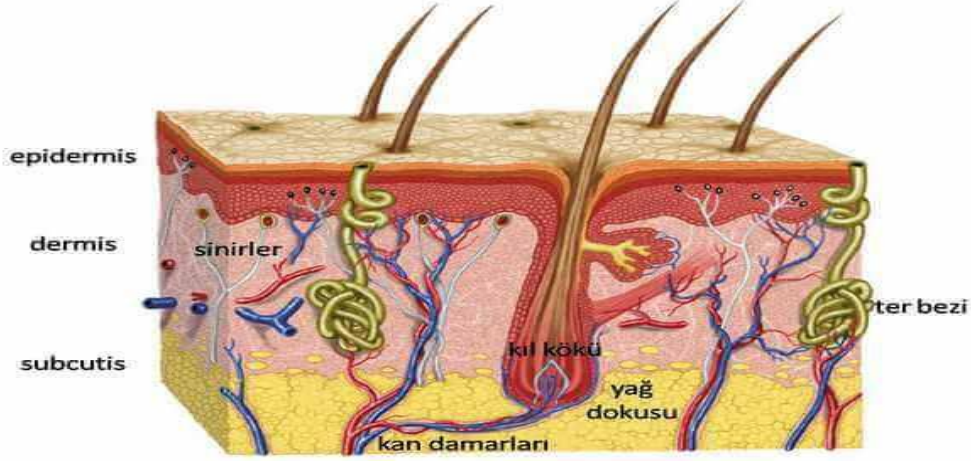
Deri genel anlamda organizmayı dışarıdan gelebilecek her türlü tehlikelerden korumakla görevli olup kendine özgü fonksiyonlara sahiptir. Organizmayı bütün olarak örten ve bu haliyle dinamik bir organ olan deri ;

- Duyu sensörleri sayesinde çevrenin algılanmasında ve korunmasında,
- Vücut sıcaklığının korunmasında,
- Sıvı kaybının önlenmesinde,
- Zararlı UV ışınlarından korumada,
- Mikroorganizmalara karşı savunmada,
- D vitamini üretiminde,
- İkincil cinsiyet özelliklerinin ortaya çıkarılmasında ve böylece türün neslinin devamının sağlanmasında,

ve daha birçok vücut regülasyon sisteminde görev alır [10]. Derinin kimyasal içeriği ise % 70 su, % 25 protein ve % 2 yağlardır [11].

2.1.2 Derinin yapısı

Dinamik bir organ olan deri en dıştan içeriye doğru sırasıyla epidermis, dermis ve hipodermis tabakalarından oluşmaktadır (Şekil 2.1). Bu tabakalar birbirleriyle bağlantılı olup fonksiyonları birbirleriyle ilişkilidir.



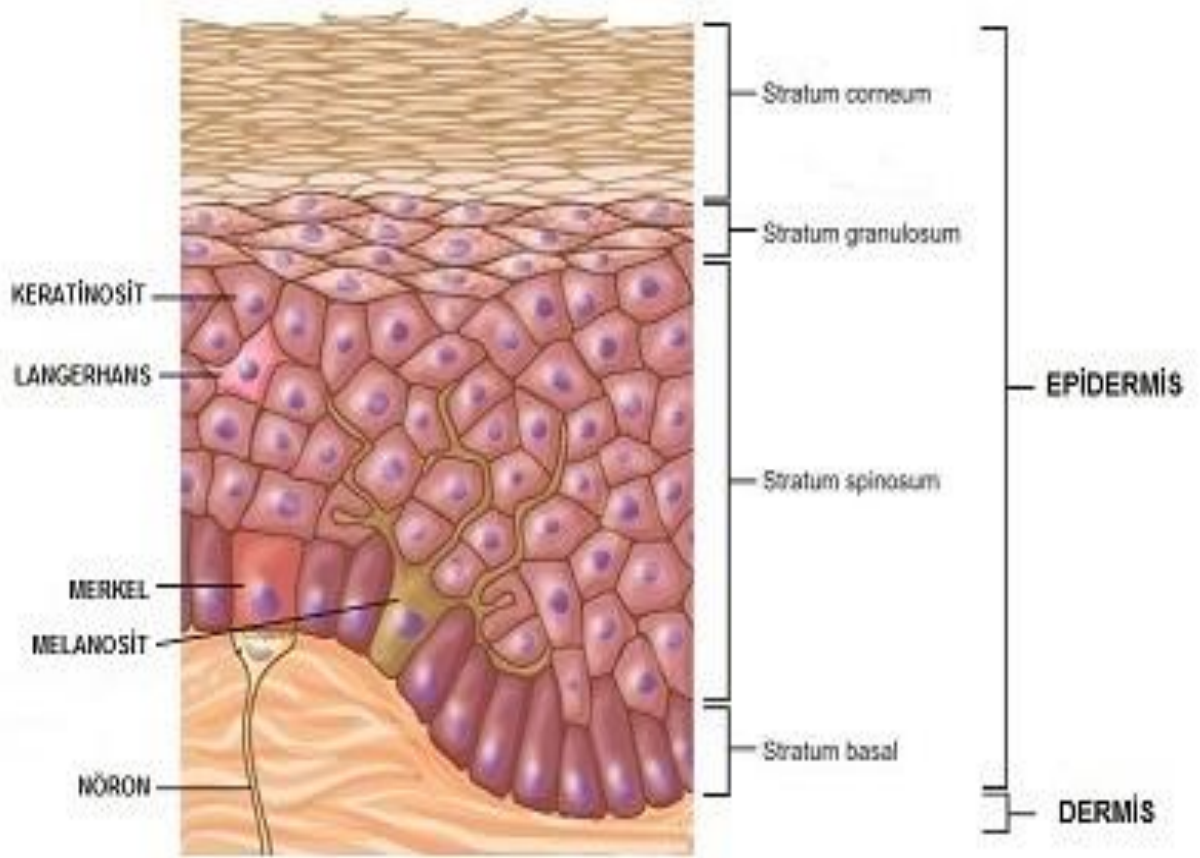
Şekil 2.1: Derinin katmanları [12].

2.1.2.1 Epidermis

Epidermis derinin en üst tabakası olup organizmayı dıştan gelebilecek her türlü fiziksel ve kimyasal tehlikelere karşı korurken, su geçirmez bir bariyer oluşturarak savunma ve permeabiliteyi sağlamaya yardımcı olur. Sürekli aşındığından ve çevre ile etkileşim halinde olduğundan en fazla rejenerasyon bu katmanda olur. Buna bağlı olarak ta en sık yenilenen katmandır ve kendini onarma hızı oldukça yüksektir. Epidermis tabakasında kan damarları bulunmaz ihtiyacı olan besinleri bir alt tabaka olan dermisle birleşme noktalarındaki epidermal kavşaklardan sağlar. Isı ve sıvı kaybını önleyen epidermis tabakası % 95 holoklon, merokrin ve paraklon hücreler içeren keratinositlerden oluşmuştur ve beş alt gruba sahiptir [13 ,14]. Bu tabakalar latince olarak aşağıdan yukarıya şekildeki gibi sıralanır:

- *Stratum bazale*
- *Stratum spinozum*
- *Stratum granülozum*
- *Stratum lusidum*
- *Stratum korneum*

Epidermis tabakasının en önemli olan iki alt tabakaları *Stratum korneum* ile *Stratum bazale*'dir. *Stratum korneum* epiderminin en üstünde bulunur ve yapısında keratin denilen keratinositlerin ürettiği protein yapılı moleküller bulundurarak deriye sertlik kazandırır. Bu tabaka suda şişme özelliğine sahip olmakla birlikte cansızdır. Keratinler 30 farklı genin sorumlu olduğu 30 farklı proteinden oluşan moleküllerdir. Farklı yerlerdeki epidermislerde farklı keratinler bulunur. *Stratum bazale* ise epiderminin en alt tabakasıdır ve dermisle komşudur. Rejenerasyon bu tabakada bulunan çoğalabilme kabiliyetine sahip hücreler sayesinde meydana gelir. Keratinositlerin üretildiği ve bulunduğu tabaka olmakla birlikte deriye renk veren melanin pigmentlerini sentezleyen melanositlerde bu tabaka hücreleri arasında yer alır. Bütün insanlarda aynı miktarda melanosit vardır ancak derinin farklı koyuluklarda oluşu melanin pigmentinin miktarına bağlıdır. Bu pigmentler organizmayı güneşin zararlı UV ışınlarından korur. Bu tabakada bulunan hücreler zamanla *Stratum korneum* tabakasından dökülen hücrelerin yerine geçer bu şekilde deri yüzeyi yenilenir. Epidermise ait alt tabakalar gösterilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Epiderminin tabakaları [12].

2.1.2.2 Dermis

Derinin orta tabakası olan dermiş, epidermis tabakasından 20-30 daha kalın olup derinin en kalın tabakasıdır. Yapısında bulunan sıkıca bağlanmış sağlam kollejen ve elastik fibriller bu katmanda yer alan önemli protein molekülleridir. Kollejen yapısal destek noktasında, elastinler ise deriye esneklik kazandırma noktasında önemlidir. Fibrillerin bulunduğu proteinden zengin bölgeye ekstraselular matriks (ECM) denir. Dermis tabakasının anahtar sayılabilecek hücre tipi fibroblastlardır. Kollejenleri, elastinleri ve diğer yapısal moleküllerin yapımında rol alırlar. Fibroblast hücrelerinin etkinliği tüm derinin sağlığı açısından önemlidir. Bu hücreler yara iyileşmesinde rol alan proteaz ve kolajenaz gibi enzimleri üretebilme yeteneğine sahiptirler [11 ,15]. Dermis yapısal olarak 2 tabakadan oluşur:

Papiller tabaka: Epidermin hemen altında yer alan papiller tabaka içerisinde, derminin bir kısmı uzantılar yaparak bir üst tabaka olan epidermise girintiler yaparak bağlantı kurar. Bu bölgede yoğun şekilde terminal kapiller ve sinir uçları bulunmaktadır. Papiller tabakada kollejen fibriller deri yüzeyine dik doğrultuda ve gevşek demetler halinde uzanır ve deriye sağlamlık katar.

Retiküler tabaka: Bu tabaka derminin alt tabakası olan hipodermisin üzerinde yer alır. Kollejen fibriller papillerin aksine deri yüzeyine paralel ve daha sıkı demetler halinde uzanmıştır. Dermise ait retiküler tabaka deriyi iç kısımlarda bulunan derin dokulara birleştirmeye yardımcı olur [16].

Dermis tabakasının ECM bölgesinde kılcal damarlar, lenf nodülleri, sinir uçları ve bazı salgı bezleri bulunur. Dermiste bulunan kılcal damarlar epidermise besin ve oksijen taşıırken, lenf nodülleri deriyi mikroorganizmalara karşı korumakla görevli olup deriye bağışıklık sağlarlar. Barındırdığı duyu reseptörleri sayesinde dokunmaya, basınca, acıya ve sıcaklığa duyarlılık kazandırır. Dermisin yapısında bulunan sebasöz bezler kıl foliküllerinin (pilosebasöz birim) etrafında lokalize olmuşlardır ve az miktarda yağ (sebum) üretir. Üretilen yağ ve ter deri yüzeyinin nem dengesini sağlamakla sorumludurlar. Dermisin yapısında ekrin ve apokrin olmak üzere iki çeşit ter bezi bulunmaktadır [11].

Ekrin bezler, özellikle avuç içinde ayak tabanlarında ve alında bulur. Bu bezlerin aktivitesi vücut sıcaklığına ve fiziksel egzersiz veya direkt olarak ortamın sıcaklık artışına bağlı olarak artmaktadır. Apokrin bezler, ekrin bezlerden daha büyük olup koltuk altında, kasıklarda ve meme etrafında bulunur. Kıl foliküllerinde sonlanacak

şekilde konumlanırken, bu bezlerden salgılanan ter içerisinde proteinler ve yağ asitleri bulunur [11]. Dermisin yapısında bulunan kıl folikülleri kök ve gövde olmak üzere iki yapıya sahiptir. Gövde kısmı keratin denilen ölü ve katı halde bulunan protein yapılıdır. Kıl yüzeyinin hemen altında dermis tabakasında ise kıl kökü bulunur. Bu yapı ise kılcıl damarlarla beslenir. Papillada bulunan keratinosit hücrelerinin hızlı bölünmesiyle kıl formu oluşur [11].

2.1.2.3 Hipodermis

Derinin en alt tabaksı olup aynı zamanda subkutis olarak da adlandırılır. Destek doku ve yağ moleküllerinden oluşur. Hipodermisi oluşturan gevşek bağ dokusu derinin alt dokulara (kas ve kemik) bağlanmasını sağlar. Vücudu çevresel travmalardan sıcaklık değişimlerinden korumakla beraber besin deposu olarak da görev alır [11].

2.2 Yara

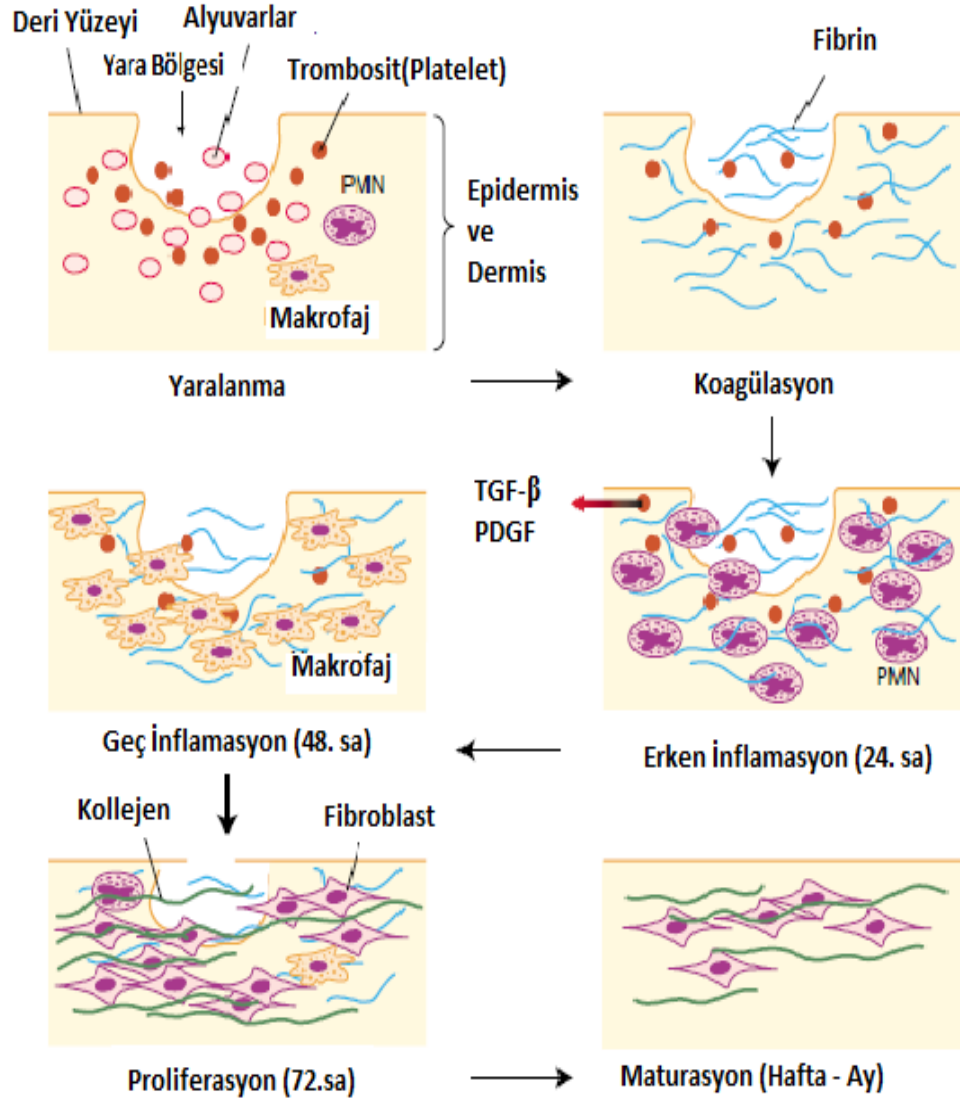
Yara ve yara iyileşme tedavisi insanlığın varoluşundan beri tıp biliminin önemli araştırma alanlarından biri olmuştur. Yara iyileşmesine ait tarihteki ilk bulgular günümüze uyarlanmış haliyle MÖ 2200' lü yıllarda Sümerlere ait tabletlerde yaraya uygulanması gereken 3 basamak ; yarayı yıka, pansuman yap ve bandajla şeklindedir [17].

Değişken sebepler sonucunda derinin veya bir başka organın anatomik yapısının ve işlevselliğinin bozulması durumuna yara denir. Herhangi bi sebeple yaralanıp bütünlüğünü kaybeden dokunun tekrardan işlevsel hale gelmesi için gerçekleşen bir dizi sıralı düzenli ve muntazam biyokimyasal yolakların toplamını kapsayan süreç ise yara iyileşmesidir [18].

2.2.1 Yara iyileşmesi aşamaları

Yaralanan bölgeye kaybedilen anatomik ve fonksiyel yapının tekrar kazandırılması için başlatılan yara iyileşmesinin 3 temel evresi bulunmaktadır. Bu evreler İnflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma (yeniden şekillenme) şeklindedir.

Bu aşamaların her biri birbirine bağlı olup görev bakımından muntazam ve karmaşık bir korelasyon gösterirler. Aşamaların hepsi yaralanma sonrası rejenerasyon açısından organizma için vazgeçilmez ve hayatsaldır. Bu aşamalar ve görev alan yara iyileşmesi elamanları gösterilmektedir (**Şekil 2.3**).



Şekil 2.3: Yara iyileşme dönemleri [19].

2.2.1.1 İnflamasyon evresi

Travma veya cerrahi bir müdahale sonrası yeni oluşan yaraya karşı organizmanın verdiği ilk doğal cevap; bir alarm durumu olan inflamasyon aşamasıdır. Yara iyileşmesinde bu dönemin kendi içinde iki basamağı vardır ; hemostazis ve inflamatuvar infiltrasyon [18]. Hemostazis aşamasında yaralanmadan hemen sonra yara içerisi kan ile dolar, burada toplanan kan bu evrenin en önemli elemanıdır. Kan ile dolan defekt olmuş yara bölgesinde kan, hageman faktörünün aktivasyonu ile pıhtılaşmaya başlar. Pıhtı oluşumunu yönlendiren ve pıhtı içerisinde bulunan trombositler trombüs oluşumunu sağlar ve yara iyileşmesini başlatıcı faktörleri

salgılamaya başlarlar. Trombositlerin α granüllerinden platelet-derive growth faktör (PDGF), insülin benzeri growth faktör- I (IGF-I), epidermal growth faktör (EGF) ve transforming growth faktör- β (TGF- β) gibi protein yapısında büyüme faktörleri salınır. Bu faktörler fibroblast göçünü ve çoğalmasını sağlar. Aynı zamanda çok sayıda vazoaktif ve kemotaktik mediatörler ortama salınır. Böylece iyileşme denilen muntazam biyokimyasal yollar süreci başlatılmış olur [20 ,21].

İnflamasyon sırasında aktifleşen uyarıcıların etkisiyle yara bölgesine yoğun bir şekilde hücre göçü başlar. Hücre bakımından zengin olan bölgeye ilk olarak gelen hücreler kemotaktik uyarıcıların etkisiyle nötrofillerdir olup yaralanmadan yaklaşık 6 saat sonra yara bölgesinde görülürler. Maksimum sayıya 1-2 günde ulaşırlar ve eğer yara bölgesinde enfeksiyon yoksa 2-3 gün sonra sayıları azalmaya başlar. Nötrofillerin fonksiyonu ise fagositoz yetenekleri sayesinde olası bir enfeksiyonu önlemek ve proteaz enziminin salınması ile ortamdaki ölü dokuya ait proteinlerin uzaklaştırılmasıdır [20 ,21]. Nötrofillerin ardından yara bölgesine lenfositlerde gelir ve lenfositlerden salgılanan sitokinler fibroblast göçünü ve aktivasyonunu uyarıcı etkiye sahiptir.

Nötrofiller ve lenfositlerden sonra yara bölgesindeki hücre zenginliğine katılan hücreler makrofajlardır. Yara iyileşmesinin temelini oluşturan başlıca büyüme faktörleri, makrofaj derive growth faktör (MDGF) temel fibroblast growth faktör (bFGF) ve heparine bağlı epidermal growth faktör (HB- EGF) bu aşamada nötrofil ve makrofajlardan salgılanır. Salgılanan büyüme faktörleri epitel hücrelerinin fibroblastların ve vasküler endotel hücrelerinin yara bölgesine göç etmesi için uyarır. Makrofajların hücre migrasyonuna katkısının yanısıra anjiyogenez ve kollajen sentezini uyarıcı mitojen maddeleri serbest bırakılmasını sağlar [22 ,23].

İnflamasyon aşamasında yaralanan dokuda olası bir enfeksiyonu önlemek amacıyla zarar gören ölü doku, patojenler ve bakteriler yara bölgesinden uzaklaştırılır. Görev alan hücreler ve hücrelerin salgıladığı sitokinlerin etkisiyle yara bölgesinde şişme, ısı, acı ve kızarıklık meydana gelir.

2.2.1.2 Proliferasyon evresi

Yaralanmanın ardından alarma geçen yara bölgesi inflamasyon aşamasını takiben proliferasyon evresini başlatır. Bu evre yaralanmadan sonraki 3. gün başlar ve yara iyileşmesinin anahtar sayılabilecek beş farklı aşama be evrede gerçekleşir.

Granülasyon dokusunun oluşması, migrasyon-fibroblazia, anjiyogenez ve epitalizasyon proliferasyon evresinde gerçekleşen süreçlerdir. Yaralanmadan ortalama 4 gün sonra tahrip olan ECM ile yer değiştiren dokuya granülasyon dokusu denir. Normal yara iyileşme sürecinin en önemli göstergelerinden biri düzenli oluşturulmuş granülasyon dokusu olup fibroblazi ve yeni oluşan kan damarları tarafından meydana getirilir. Granülasyon dokusu kapalı yaralara oranla açık yaralarda daha belirgindir ve yaralanmadan sonraki 3-6. günden sonra ortaya çıkar [18 ,24]. Granülasyon dokusunun yapımında fibroblastlar, kollejenler kan damarları ve makrofajlar görev alır. Oluşumu ise kollejen, fibronektin ve hyaluronik asidin hücre dışı matriks içerisine gömülmesi ve yeni kılcak tomurcuklanma ile yara bölgesine göç eden fibroblastlar ve inflamasyon hücrelerinin birleşiminden oluşur ve yaraya parlak kırmızı granüler görünüm kazandırır [18]. Yara bölgesini örterek olası bir enfeksiyona karşı korur ve yenilenen epitel hücrelerinin göç etmesine de zemin oluşturarak yardımcı olur. Fibroblastların yaralanma sonrası uyarılıp yara kenarlarından köken alarak yara bölgesine göç etmelerine migrasyon denir. Düşük oksijen basıncı ve laktik asit birikmesine bağlı pH düşüşü fibroblastların göçü için alarm veren koşullardır. Fibroblastların migrasyonu ve proliferasyonu IL-1, PDGF, EGF, TGF- β_1 , TGF- β_2 , TNF- α , CTGF ve Cyr 61 gibi büyüme faktörleri tarafından stimüle edilir. Fibroblastların temel metabolik fonksiyonu kollejen, proteoglikon ve elastin sentezidir. Yara bölgesindeki fibroblastlar tarafından üretilen kollejenlerin bölgede birikmesi fibroblazia olarak tanımlanır [18 ,20 ,25]. Yara iyileşmesinin en önemli elemanı olan fibroblastlar iyileşme sürecinde fabrika ve makine görevi üstlenirler. Fabrika olarak kollejen bazlı ECM üretirler ve geçici fibrin bazlı matriksle yer değiştirirler. Makine olarak ise kasılabilme yetenekleri sayesinde yara sınırlarının tekrardan yakınlaştırılıp yaranın kapanmasına yardımcı olurlar [24]. Fibroblastların ürettiği kollejenlerin çarpaz bağlanabilmesi için oksijen zorunlu bir kofaktördür ancak ortamın hipoksi oluşundan kollejenler biriktikten ve protein üretimi bittikten sonra fibroblastlar fenotiplerini değiştirerek miyofibroblast formuna dönüşürler ve onarımın ikinci haftasında yara kapanmasına katılırlar. Fibroblastlar yaralanmadan sonraki 3-4. günlerde görülürler ve 7. günde maksimum seviyeye ulaşarak 15-21. güne kadar aktif kalırlar. Göç etmeleriyle birlikte yara bölgesindeki fibrin pıhtısını geçici matriks olarak kullanırlar. Yükselen oksijen seviyesi ve asitliğin azalmasıyla yara bölgesindeki fibroblast sayısında düşüş gözlenir. Yaralanma sonrası besinsiz kalan doku görsel olarak iskemiktir ve bozulan kan damarların yenilenip

tekrardan kan akışı sağlanmadan iyileşme tamamlanamaz. İnflamasyon aşamasından yara bölgesine yığılan makrofajlar şiddetli hipoksi ve artmış laktik asit içeren ortama dayanabilen hücrelerdir. Makrofajlar böylesi bir ortamla karşılaştıklarında kan damarlarının oluşumunu ve fibroblast göçünü tetikleyen büyüme faktörlerini salgırlar [20 ,25]. Yara bölgesinde yer alan endotel hücreleri tarafından hasar gören kan damarlarının yerine yeni kan damarlarının oluşumuna anjiyogenez denir [26 ,27 ,28]. Anjiyogenez migrasyon ve fibroblasia ile eş zamanlı gerçekleşir. Proliferasyon aşamasında görev alan mezankimal hücre olan fibroblastların ihtiyacı olan gerekli oksijen ve enerji anjiyogenez ile yeni oluşan damarlar ile sağlanır. Anjiyogenez aşaması VEGF, TGF ve FGF gibi büyüme faktörlerince uyarılır. Yaralanmanın 3. gününde makrofaj ve trombositlerden salınan özellikle bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) proteaz enzimlerini aktifleştirerek mikropillerin bazal membranlarının parçalanmasını sağlayarak serbest endotel hücreleri meydana getirir ve yara bölgesine doğru migrasyonu başlatır. Anjiyogenezin başlamasıyla birlikte endotel hücreleri salgıladıkları kollejenaz, plasminojen aktivatörü ve stromelizin gibi mediatörler ile venül bazal membranı yıkarlar [18]. Kılcal damar uçlarında konumlanan endotel hücreler yara içine göç etmesi ve ve ardı ardına dizilmeleriyle kılcal tomurcuklanmayı sağlarlar. Oluşan bu tomurcuklanmalar yaranın diğer bölgelerinden gelen tomurcuklarla birleşip kılcal şebekeyi oluştururlar [26]. Derinin en üst katmanı olan epidermis organizmanın iç ve dış ortamını birbirinden ayıran bariyer oluşturur. Yaralanma sonrasında epidermin onarılması tekrardan bariyer özelliğini kazanması için gerçekleşen süreç epitelizasyon evresidir. Proliferasyonun bu aşaması sağlıklı epitel hücrelerinin hasarlı bölgeye göçünü, çoğalmasını, organize ve keratinize olmasını içeren bir süreçtir [26]. Yaralanmayla birlikte yara çevresinden gerçekleşen hücresel göç ve fenotipik değişimler sonucu epitel hücrelerin hem birbirleriyle olan hemde bazal membranla olan bağlantıları kesilir. Kanamanın durdurulması için oluşturulan pıhtı epitelizasyon için engel teşkil eder. Bu sebeple yara iyileşmesinin erken aşamalarında epitelizasyon başlamaz [29]. Keratinositler, tip V kollejen, nötral proteazlar, plazminojen aktivatörü, kollejenaz ve fibronektin üreterek epitelizasyon evresinde yardımcı olurlar. Fibronektin molekülü yara tabanına doğru hareket etmelerini sağlar [30]. Nötral proteazlar ve kollejenaz enzimleri ise (epitel hücreler ölü yüzeylerde değil yalnızca canlı yüzeylerde hareket edebildikleri için)hasarlı ölü pıhtı ortamı ile canlı yüzeyi ayırarak epitel hücrelerinin rahat hareket edebilecekleri göç zeminini hazırlarlar [30 ,31]. Epitelizasyonun

başlamasıyla birlikte epitel hücreler yara kenarlarında ilerler ve ilerleme başka bir noktadan gelen epitel hücrelerle kaşılaşınca kadar devam eder. İki farklı doğrultudan gelen ve karşılaşan epitel hücreler arasında kontak inhibisyon kurulur ve ilerleme durur [28 ,32]. Yaralanan bölgede kabuk oluşmuşsa epitelizasyon bu kabuk altında devam eder ve buraya göç eden epitel hücreleri fenotipik olarak değişmiş ve sütünumsü bir görünümde olup mitotik aktiviteleri 17 kat artmıştır. Oluşan tek katlı epitel örtü sonrasında göç eden yeni epitel hücrelerle üst üste binecek şekilde ikinci ve üçüncü katı oluştururlar [28 ,33]. Bu şekilde serbest yara çevresinde epitel hücrelerin göçüyle oluşan ve tabakalaşan epitelin yüzeyi zamanla keratinize olur ve sağlamlaşır. Ancak oluşan bu tabaka asla normal epitel veya epidermis yapısında değildir, öyle ki epitel deri eklentileri bakımından yoksun ince ve kırılğan bir haldedir [33 ,34] Yara kontraksiyonu, açık deri yarasının iyileşme sürecinde spontan bir şekilde gerçekleştirilen yaranın kapatılmasını kolaylaştırmak amacıyla yara çevresindeki tam kalınlıkta bulunan yara dudaklarının merkeze doğru hareketi sonucu yaranın küçülmesidir. Yaralanmadan sonraki 72 saat boyunca yara bölgesinde elastik gerilme meydana gelir [18]. Sözkonusu gerilmenin etkisiyle yara kenarlarında oluşan hafif çekilmeyle birlikte yara alanında artış görülür. Yaralanmadan sonraki 5-7. Günlerde başlayan kontraksiyon hareketi 5-15. günlerde maksimum seviyelere ulaşır ve yaranın fiziksel özelliklerine bağlı olmaksızın günde ortalama 0,6-0,7 mm ilerleyerek sabit bir hızla 39. güne kadar devam eder [25 ,30 ,35]. Doku kontraksiyonu ile yara önce orijinal boyutuna gelir ve yara kontraksiyonunun etkisiyle yaranın boyutu zamanla azalır. Yara kontraksiyonunda bir fabrika gibi çalışan fibroblastların fenotip değiştirerek ulaştıkları miyofibroblast formları görev alır. Bu özelleşmiş hücreler sadece hasar gören yaralı bölgede bulunurlar, sağlam bağ dokuda bulunmazlar [31]. Miyofibroblastlar yara bölgesinde birbirlerine, kas tabakasına ve yara dudaklarındaki dermise bağlanarak yara kenarlarını yaranın merkezine çekerek yara alanının küçülmesini gerçekleştirirler. Derinin sıkı olmadığı yerlerde kontraksiyon en efektif şekilde çalışır ve yara izi oluşumu minimumdur. Derinin sıkı olan yerlerinde kontraksiyon yavaştır ve yara izi oluşumu fazladır [36].

2.2.1.3 Olgunlaşma ve yeniden şekillenme evresi

Yara olgunlaşmasına ait klinik bulgular incelendiğinde yara bölgesinde kontraksiyon, kızarıklığın azalması, kalınlığın ve sertliğin azalması ile birlikte sağlamlılığının

artması gözlemlenir. Olgunlaşma (maturasyon), proliferasyon aşamasına ait olan granülasyon dokusunun skar dokusuna dönüşmesini ve yenilenen ekstrasellüler matriksin olgunlaşmasını içeren yara iyileşmesinin son aşamasıdır. Bu evrede inflamasyon ve proliferasyon boyunca yara bölgesine biriken hücreler sayıca azalır, anjiyogenez tamamlanır, fibroblazi ve kollejen üretimi doyumluğa ulaşır, epitelizasyon sonlanır, yara renginde açılma gözlenir skar dokusunun hacmi azalır ve iyileşmesini tamamlamış skar dokusu gözlenir [30 ,36 ,37 ,38]. Bu evrede granülasyon dokusu programlı hücre ölümü olarak adlandırılan apoptozis ile yerini skar dokusuna bırakır. Hücre bakımından azalma gözlenirken damarlara sahip bir skar dokusu oluşturulur. Proliferasyon evresinde fibroblazi ile biriken fazla ancak ince olan kollejenler bu aşamada kovalent bağlarını arttırarak stabilizasyon sağlar ve stabil örgü halini alırlar[25]. Fazla olan kollejenler ise kollejenaz enzimiyle yıkılır. Yara bölgesi normal derinin taklidini yapmaya başlar [21]. Azalan kollejene bağlı olarak yara gerilme direnci artar ancak bu direnç normal derinin gerilme direncinin % 80 nine 3. ay ve sonrasında kavuşur [39].

2.2.2 Yara iyileşmesinde rol oynayan faktörler

Yaralanmanın ardından gerçekleşen iyileşme sürecinin kalitesini hücresel veya biyokimyasal olarak etkileyen birçok önemli faktör bulunmaktadır. İyileşen dokunun morfolojik ve fonksiyonel bütünlüğünün kazandırılmasında söz konusu faktörler olumlu veya olumsuz gelişmelere neden olmaktadır. Bu faktörlerden bazıları şunlardır [21] :

- ❖ Beslenme, organizmanın ihtiyacı olan proteinler karbonhidratlar, yağlar, vitaminler ve mineraller yeterli seviyelerde olduğunda yara iyileşmesi reaksiyonlarının kalitesi artacaktır. Proteinler iyileşmenin inflamasyon evresi için önemli olup eksikliği fibroblaziyi bozar ve maturasyonda etkilenir. Yara iyileşmesi sürecinde tüm aminoasitler önemlidir ancak metionin, sistin ve arginin aminoasitleri zorunludur [40].

Karbonhidratlar ve yağlar ise hücrenin temel enerji kaynağı olup hücre zarının yapımında kullanılırlar. Yara iyileşmesinde sodyum, potasyum, kalsiyum, klor, fosfor, çinko ve magnezyum gibi minerallerde gerekli olup eksiklikleri kollejen yapımını olumsuz etkiler [21]. Vitamin eksikliğine bağlı olarak ise cildi problemler oluşur [41 ,42].

- ❖ Dolaşım, yara iyileşmesi evrelerinin düzenli ve muntazam olabilmesi için kan dolaşımı da büyük öneme sahiptir. Herhangi bir sebeple dolaşım bozukluğu yaşayan organizmalarda oksijenin geç gelmesinden ötürü iyileşmenin tamamlanması gecikir [43].
- ❖ Oksijenizasyon, yara iyileşmesinde hayati önem taşır ve eksikliği kollejen liflerin stabilitesini bozar. Oksijenizasyonun bozulması bağışıklık sistemini de olumsuz etkiler ve enfeksiyona karşı direnç azalır [21].
- ❖ Enfeksiyon, yaralanma durumunda dışardan veya kan yoluyla bakterilerin yara bölgesinde bulunmasıyla ve belli bir oranı geçmesiyle oluşan iyileşmeyi geciktiren durumdur. Her kontaminasyon enfeksiyona sebep olmaz, bir gram dokuda sayıca 100.000 bakteriye (yangı olasılığı %50) kadar enfeksiyon olmadığı kabul edilerek vucüt direnciyle beraber iyileşme gerçekleşir [44].
- ❖ Yaş ve cinsiyet, yara iyileşmesine aşikâr bir etkileri olmamasına rağmen büyüme çağındaki çocuklarda iyileşmenin daha hızlı olduğu bilinmektedir [21].
- ❖ Hormonlar, tiroid, sürrenal hipofiz ve pankreas hormonlarının yara iyileşmesine etkisi olduğu ileri sürülmektedir. Diyabet hastalığına bağlı anjiyopati bulunan durumlarda dolaşım bozukluğu, enfeksiyon ve nöropati nedeniyle yara iyileşmesi olumsuz etkilenir [45 ,46].

2.2.3 Yara iyileşme şekilleri ve tedavileri

Bir dizi sıralı ve düzenli olaylar zinciri yara iyileşmesi kapanma şekillerine göre 3'e ayrılır ; primer iyileşme, sekonder iyileşme ve tersiyer iyileşme.

Primer iyileşme, yara kenarlarının sütüre edilerek bir araya getirilmesi sonucu gerçekleşen iyileşmedir ve yara izi oluşumu minimumdur.

Sekonder iyileşme, yara kenarlarının herhangi bir şekilde birleştirilmeden açık bırakılarak iyileşmeye bırakılan yaralardır. Yara kontraksiyon, granülizasyon ve epitelizasyon ile kapanır. Oluşan yara izi daha büyüktür.

Tersiyer iyileşme, sekonder iyileşmeye bırakılan yaranın enfeksiyon gelişmesini önlemek amacıyla yaranın birkaç gün sonra kapatılmasıyla iyileşen yaralardır.

Yara iyileşmesi tedavilerinde öncelikli amaç enfeksiyonu önlemek, iyileşmeyi hızlandırmak ve en az skar izi oluşumunu sağlamaktır. Her hastaya ve yarasına uygun tedavi uygulanmalıdır. Yaranın akut veya kronik olması uygulanacak tedavi metodunu değiştiren bir etmendir [4 ,47]. Yara bölgesine uygulanan tedaviler;

2.3.3.A Hiperbarik oksijen tedavisi : Bu tedavi modeli problemlı yaraların iyileşmesini arttırmak amacıyla 30 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. Uygulanan bu tedavi ile kanın dokulara oksijen taşıma kapasitesi arttırılır. Taşınan oksijen yara bölgesinde hücre yenilenmesinde rol oynar. Zararlı anaerob bakterilere karşı öldürücü olup yara bölgesine lökosit migrasyonunu ve fagositozunu düzenler. Hiperbarik oksijen tedavisi hastaya %100 oksijen solutulularak basınç odalarında uygulanan bir yöntemdir [48].

2.3.3.B Negatif basınç tedavisi :Yara bölgesinde bulunan sıvının drenajını, granülasyon formasyonunu, stimülasyonunu ve bakteri kolonizasyonu miktarını azaltmak amacıyla uygulanan bir tedavi modelidir. Negatif basınç vakum yardımcı yara kapatma (Vacuum Assisted Closure) (VAC) pompası ile uygulanır. Steril, poliüretan köpük sünger yara alanına göre kesildikten sonra drenaj tüpü yaraya konulur ve köpük süngerle kaplanır. Bu tüp VAC pompasıyla bağlantılıdır ve oklüzif örtüyle kaplanır. Sıvı ve eksüda bir kutuya toplanır. VAC uygulamadan önce yara nekrotik dokudan temizlenmelidir [48].

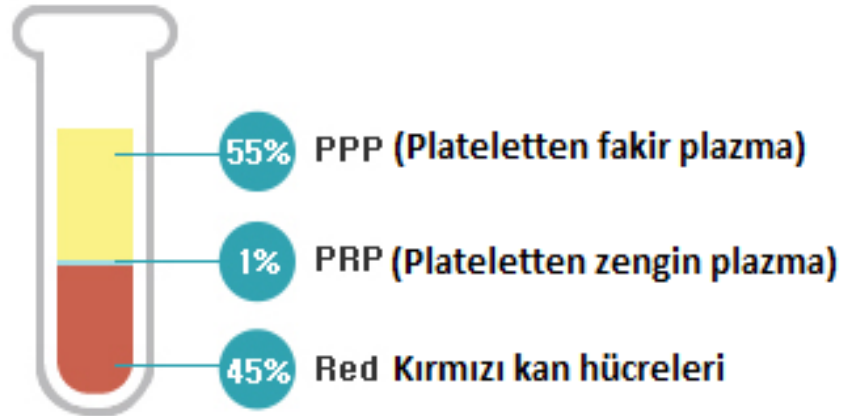
2.3.3.C Büyüme Faktörleri : Yara bölgesine insandan elde edilen veya rekombinat DNA teknolojisi ile üretilen büyüme faktörlerinin uygulandığı tedavi yöntemidir. Büyüme faktörleri yara iyileşme hızının arttırılmasını, granülasyon dokusunun oluşumunu hızlandırılması, yaranın hücresel ve moleküler çevresini olumlu etkileyerek yara bölgesindeki doku tamirini başlamalarını sağlar [4 ,49]. Bu tedavi yöntemine dayanarak geliştirilen PRP tedavisinin de yara iyileşme tedavisine olan olumlu etkisi yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir. Çalışmamızda PRP tedavisi üzerine yapılmıştır.

2.3 PRP (Plateletten Zengin Plazma)

Plateletler (trombosit) peiferal kan bileşenlerinden biri olup çekirdeği olmayan kan hücreleridir. Kan pulcukları olarak da adlandırılan plateletler hemoztaz sırasında kanın pıhtılaşmasında görev alırlar. Plateletler çok sayıda protein, sitokin ve yara iyileşmesini başlatan ve temel reaksiyonları regüle eden biyoaktif faktörleri içerirler [50]. Plateletler diğer kırmızı kan hücrelerine oranla oldukça küçük moleküller olmalarına rağmen granül denilen çeşitli faktörler salgılayabilen salgı vesiküllerine sahiptirler [51 ,52]. Plateletlerin yapısında bulunan membrana bağlı α -granüller

hücreyi depolama yaparak yara iyileşmesi için hayati öneme sahip trombosit türevli büyüme faktörlerini (PDGF), transforming büyüme faktörlerini (TGF- β) ve insülin benzeri büyüme faktörlerini (IGF-I) içeren bir havuz görevi üstlenir [51]. Yara iyileşmesinin hücresel aşamasında α -granüllerden salgılanan polipeptit yapıdaki büyüme faktörleri kemotaksis, farklılaşma, mitogenez ve hücrelerin salgı proteinlerini aktive etmek amacıyla yara bölgesinde birikirler ve iyileşmeyi başlatırlar [53]. Salgılanan uyarıcı proteinler epidermal hücreler, mezankimal hücreler ve fibroblast gibi hedef hücrelerin transmembran reseptörlerine bağlanır. Artan sinyal transdüksiyonu ile hücre içerisinde, proliferasyon, doku tamiri, farklılaşma, kollejen sentezi ve antiapoptozis gibi metabolik yollarda görev alan çeşitli genlerin ekspresyonlarında artış görülür [51]. Literatüre göre 16 adet başlıca büyüme faktörleri ailesi bulunmakla beraber, platelet α - granüllerden salgılanan 250 den fazla farklılaşmış büyüme faktörü vardır [52].

Normal koşullarda periferik kanda 150.000/ μ l – 350.000/ μ l sayıda platelet vardır. Periferik kanın antikoagulanlı tüplerde belirli hız ve sürede santrifüj edilmesiyle elde edilen trombositten zengin kısma plateletten zengin plazma (PRP-Platelet Rich Plasma) denir. Santrifüj sonrasında PRP % 1 lik kısımdadır [54] (**Şekil 2.4**). Trombositten zengin olan bu kısımda yaklaşık (8 kat) 1.000.000/ μ l platelet ve 3-5 kat daha fazla büyüme faktörleri bulunmaktadır[50].



Şekil 2.4: PRP eldesi [54].

2.3.1 PRP' nin içeriği ve avantajları

Periferal kandan elde edilen PRP içerisindeki granüllerin degranülasyona uğramasıyla aktifleşir ve büyüme faktörleri salınmaya başlar. İlk 10 dakida içerisinde depolanmış olan büyüme faktörlerinin % 70 i ilk bir saat içerisinde de %100 e yakını salınır. 8 gün boyunca plateletler tükenip ölene kadar ekstra salınım olur ancak PRP hazırlandığı anda uygulanmalıdır [55].

Plateletten zengin PRP, içeriğinde bulunan büyüme faktörleri ve sitokinler nedeniyle klinikte birçok kullanım alanına sahiptir. Hastanın kendisinden alınan otolog kandan elde edildiği için güvenilirdir ve herhangi bir hastalık bulaşma riski bulunmaz. Herhangi bir immün redde sebep olmaz. Uygulandığı bölgede içerdiği büyüme faktörlerinin aktifleşmesiyle doku onarımını, hücre yenilenmesini ve iyileşmeyi hızlandırır. Elde edilişi ve uygulanması ucuz ve kolaydır. Kanayan yara bölgelerinde, anti-platelet ilaçlarla birlikte veya kronik karaciğer hastalıklarında kullanılmamaktadır [56].

Tablo 2.1: PRP' yi oluşturan başlıca bileşenler [50 ,57 ,58 ,59].

| Bileşen | Görevi |
|--|---|
| Platelet türevli büyüme faktörü (PDGF) | Erken inflamasyon evresinde hücre olgunlaşmasına, protein sentezine, fibroblast ve miyoblast proliferasyonuna katılır. |
| Dönüştürücü Büyüme faktörü β (TGF- β) | Fibroblast sayısını ve tip I, III kollejen ekspresyonunu artırır, anjiyogenez ve fibrogenezin kontrolünü yapar |
| Basic fibroblast büyüme faktörü (FGFb) | Hücre olgunlaşması, migrasyon, kan damarlarının olgunlaşmasını sağlar |
| İnterlökin 8 (IL-8) | Erken inflamasyon mediyatörlüğü ve inflamasyon hücrelerinin katılımının uyarılmasına katkıda bulunur. |
| İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF- I) İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 (IGF-II) | Hücre olgunlaşması, farklılaşması, PDGF ile kollejen sentezini arttırmak, fibroblastların kemotaktik yeteneğine ve protein sentezine katkıda bulunur, kemik oluşumunu artırır |

Tablo 2. 1 (devam) : PRP' yi oluşturan başlıca bileşenler [50 ,57 ,58 ,59].

| Bileşen | Görevi |
|--|---|
| Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) | Hücre olgunlaşması migrasyonu, yeni kan damarlarının oluşmasını artırır, anti-apoptosis aktivasyonu yapar |
| Epidermal büyüme faktörü (EGF) | Hücrelerin proliferasyonu,farklılaşması ve canlılığını sağlanması fibroblastların veya mezankimal hücrelerin mitogenezi, kollejen yapımının regülasyonunu sağlar. |
| Keratinosit büyüme faktörü (KGF) | Endotel hücrelerinin olgunlaşması, migrasyonu, adhezyonu ve canlılığını korumasını sağlar ve anjiyogenezise yardımcı olur. |
| Konektif doku büyüme faktörü (CTGF) | Anjiyogenezi düzenlemede ve kıkırdak rejenerasyonu fibrozis ve trombosit adezyonunun sağlanmasına katkıda bulunur. |

2.3.2 PRP' nin kullanım alanları

PRP içerdiği büyüme faktörleri ve zengin plateletten ötürü rejenerasyonu hızlandırıcı etkiye sahip olduğu bilinmekte olup literatürde de yer almaktadır. Klinik olarak çok fazla kullanım alanına sahip olan otolog PRP tedavisi ilk olarak 1987' de açık kalp operasyonunda uygulanmıştır [60]. Takip eden yıllarda özellikle dental alanında yaraların iyileşmesinde kullanılmıştır. 20 yılı aşkın süredir ise doktorlar kemik onarımında, omurga hasarlarında, yumuşak doku hasarlarında ve plastik cerrahide kullanmışlardır [61]. PRP tedavisi günümüzdeki ününe 2009 yılında Amerikan futbolu takımı Pittsburgh Steelers şampiyon oldukları dönem oyuncuların ayak bileklerine PRP uyguladıklarını açıklamalarıyla kavuşmuştur [62]. Son yıllarda kullanım alanları oldukça genişlemiştir; ortopedi, kardiyovasküler cerrahi, kozmetik ve üroloji alanlarında hekimlerin uyguladığı tedavi yöntemi haline gelmiştir [63]. PRP tedavisi ile kanserin ilişkisi de incelenmiştir. PRP nin hücre sel proliferasyonu uyaran büyüme faktörlerinin ve kemik morfogenetik proteinlerin (BMP's) kanser hücrelerini de uyurabileceği düşünülmüştür. Ancak büyüme faktörleri çekirdekte değil hücre zarında etkilerini gösterdiklerinden kanserle ilişkisi bulunamamıştır. Büyüme

faktörleri normal gen ekspresyonuyla sentezlenen sitoplazmik sinyal proteinlerini aktifleştirir, anormal gen ekspresyonlarını tetiklemez. Büyüme faktörleri kanserojen olan radyasyon veya UV ışınları gibi mutajen değildir. PRP bireyin kendi periferik kanından fazlası değildir; trombosit bakımından zengindir [55].

2.3.3 PRP' den elde edilen lipid fraksiyonu

Birçok araştırmaya PRP' nin cerrahi uygulama ve yanık sonucu oluşan yaraların iyileşme tedavilerinde kullanıldığını desteklemektedir [64 ,65]. PRP' nin iyileştirici etkisinin kaynağının içeriğindeki peptid yapılı büyüme faktörleri(TGF- β ve PDGF) olduğu da bilinmektedir [66]. Ancak yapılan son çalışmalar kronik yara bölgesinde bulunan yoğun proteaz aktivitesinden dolayı peptid kaynaklı büyüme faktörlerinin hızla degrade olduğunu desteklemektedir [67 ,68]. Bununla birlikte gelişen yeni düşünce ise PRP' nin içeriğinde peptid kaynaklı olmayan büyüme faktörleri proteaz aktivitesinden etkilenmez ve yara iyileşmesine katkıda bulunur olmuştur.

Son 30 yıl içerisinde yapılan çalışmalar, lipid yapıdaki sinyal moleküllerinin çok yönlü hücre yolaklarının çalışmasında görev aldığını gösterir niteliktedir [69 ,70]. Proteolitik aktivasyona olan dayanıklılığı sayesinde PRP'nin içeriğinde bulunan lipid porsiyonu da son zamanlarda yara iyileşmesi tedavisi üzerine yapılan çalışmalarda araştırılan bir konu haline gelmiştir. PRP' den elde edilen lipid fraksiyonunun yara iyileşmesi sırasında migrasyon ve mitojenez öncesinde olumlu katkılarının olduğu 2015 yılında yapılan *in vitro* çalışmayla literatüre kazandırılmıştır [7]. Ancak söz konusu etki daha önce *in vivo* olarak çalışılmamış olup tez çalışmamızda PRP' den elde edilen lipid fraksiyonunun yara iyileşmesine olan etkisi *in vivo* olarak çalışılmıştır.

2.4 Yara İyileşmesi Sürecinde Görev Alan Moleküler Mekanizmalar

Yara iyileşmesi yaralanmadan itibaren yaranın tamamen kapanmasına kadar hemostaz, inflamasyon, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve dokunun yeniden şekillenmesi aşamalarını içeren uzun, düzenli ve karmaşık bir süreçtir. Yara iyileşmesi çalışmalarının çoğu bu süreçte etkili olan genler ve proteinler üzerine yapılmış olup yaklaşık 100 farklı gen ve bu genlerle ilişkili proteinlerin varlığı bu çalışmalarla gösterilmiştir [3]. Ancak söz konusu genleri etkileyen faktörler ve birbirleriyle olan ilişkileri tam olarak açıklanmış değildir. Çalışmamızda PRP'den

elde edilen lipid fraksiyonunun yara iyileşmesi sürecindeki etkisini incelemek amacıyla yalaşık 84 tane ilgili genin mRNA profillerine bakılmıştır ve kendiliğinden iyileşen yaralar ile kıyaslanarak gen ifadelerindeki farklılıklar tespit edilmiştir. Bu genler büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks bileşenleri, proteaz aktivitesi, çeşitli hücre proliferasyonları, migrasyonları ve işlevselliğiyle ilişkilidir. İncelenen 84 farklı gen fonksiyonel olarak gruplandırılıp anlatılacaktır.

2.4.1 Büyüme faktörleri

Hücrel aktiviteyi etkilemek için çok az miktarları dahi yetebilen ağırlıkları 4,000-60,000 dalton arasında değişen pteoin yapılı moleküllerdir. Büyüme faktörleri üç farklı mekanizma ile hücrel fonksiyonları sağlar; endokrin, parakrin, otokrin veya intakrin. Büyüme faktörlerinin hedef hücreyi etkileyebilmesi ve istenen cevabı oluşturabilmesi hücrenin sahip olduğu spesifik reseptörlere bağlıdır. Büyüme faktörünün kendine özgü hücre reseptörlerine bağlanması ile birlikte hücre içerisinde özgün bir yanıt oluşumuna neden olan bir dizi sinyal ortaya çıkar. Birbirinden farklı büyüme faktörlerine özgü olan reseptörler her hücrede sayıca farklılık gösterir. Büyüme faktörlerinin spesifik ve belirli sayıda bağlanması istenen özel yanıtın oluşmasını sağlar. Hücrelerin ve büyüme faktörlerinin bulunduğu matriks de yanıtın oluşmasında rol oynar. Matriks, büyüme faktörlerinin bağlanmasına ve çözülmesine etki ederek ortamdaki faktörler için depo görevi görür [71]. Çalışmamızda ticari olarak üretilen PCR array panelini baz alarak hazırlamış olduğumuz yara iyileşmesi panelinde bulunan “Angpt1, Csf2 (GM-CSF), Csf3 (GCSF), Ctgf, Egf, Fgf10, Fgf2, Fgf7, Hbegf (Dtr), Hgf, Igf1, Mif, Pdgfa, Tgfa, Tgfb1, Tnf, Vegfav” genleri büyüme faktörleri genleridir.

2.4.2 İnflamatuar sitokin ve kemokinler

Farklı hücre tipleri tarafından sentezlenebilen ve salgılanan polipeptid yapılı olan sitokinler enflamasyon, hücre olgunlaşması ve yaralanmaya karşı gelişen sistemik cevabı da içerisinde bulunduran bağışıklık ve enflamatuar olayları düzenlemekte görev alır. Sitokiner hormonlara benzemesine karşın hormon değildir [72]. Sitokinler genel olarak öncül moleküller olarak depolanmazlar ve salınmaları yeni gen transkripsiyonuna bağlıdır. Yeni gen sentezi genellikle geçici olup sitokinleri kodlayan mRNA’lar stabil değildir. Bu sebeple sitokin salınımı kısa ve geçicidir. Sentezlenmesi bir kez başladığında hızla salınırlar. Sitokinlerin etkinliği genellikle

gerektiğinden fazladır ve aynı hedef hücrede birçok farklı etkiye sahip olabilmektedir. Bazı etkiler salınmayla aynı anda meydana gelirken, bazı etkiler farklı zaman aralıklarıyla meydana gelebilmektedir. Birbirinden farklı sitokinler genellikle birbirlerini de etkileyerek çalışırlar. Sitokinlerde diğer polipeptid moleküllerde olduğu gibi hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak etkilerini gösterirler. Bu reseptörler transmembran proteinlerdir ve ekstraselüler altbirimleri sayesinde kendilerine özgü büyüme faktörlerini ve sitokinleri tanıyıp bağlarlar [72 ,73 ,74].

Sitokinler içerisinde son yıllarda keşfedilen, yaklaşık 8-10 kDa ağırlığındaki kemokinler birbirine benzeyen bir ailedir. Kemokin molekülleri, lökositlerin hareketlerini (kemokinez) ve yönlendirilmiş hareketi (kemotaksis) uyarırlar. Aynı etkiyi monositler ve fibroblastlar için de gösterirler. Bazı araştırmacılar kemokinleri amino uçtaki sistin aminoasitlerinin komşu olması (c-c)(α) ya da aralarında bir amino asit bulunması (c-x-c)(β) durumunu göz önünde bulundurarak α ve β şeklinde iki alt gruba ayırmışlardır [75]. Birçok kemokin reseptörü yeni keşfedilmiş olup hepsinin yedi transmembran α -heliks reseptör ailesine ait olduğu saptanmıştır. Ligandın bağlanmasıyla birlikte bu reseptörler GDP'yi GTP'ye çevirmede görev aldıkları düşünülmektedir [74]. Çalışmamızda yara iyileşmesi panelinde yer alan "Ccl12, Ccl17 (Mcp-3), Cd40lg (Tnfsf5), Cxcl1, Cxcl11 (I-TAC/IP-9), Cxcl3, Cxcl5, Ifng, Il10, Il1B, Il2, Il4, Il6" genleri inflamatuvar sitokin-kemokin genleridir.

Tablo 2.2: Büyüme faktörleri ve sitokinlerin doku onarımındaki işlevleri [76].

| İşlevler | Büyüme faktörleri ve sitokinler |
|------------------------|---|
| Nötrofil infiltrasyonu | TGF- β , IL-8, IL-6, IL-10 (-) |
| Makrofaj infiltrasyonu | TGF- β , IL-10 (-) |
| Anjiogenezis | VEGF-A, FGF-2, HGF, GM-CSF |
| Fibroplazi | PDGF, TGF- β , GM-CSF, IGF |
| Matriks depozisyonu | FGF-2, IGF-1, TGF- β |
| Skar oluşumu | IGF-1, TGF- β , IL-6, IL-10 (-) |
| Reepitelizasyon | FGF-2, FGF-7, FGF-10, EGF, TGF- α , IGF, IL-6, GM-CSF, TGF- β (-), IP-10 (immun protein-10)(-) |

Not: (-) işaretle gösterilenler negatif düzenleme yaparlar.

2.4.3 Ekstraselüler matriks ve hücre adezyonu

Dokuların ve organların yapısının ve bütünlüğünün korunmasında, hücreler arasındaki iletişimin ve koordinasyonun sağlanmasında ekstraselüler matriks (ECM) büyük öneme sahiptir. Protein ve polisakkaritlerin ayrıntılı bir şekilde özel olarak biçimlenmesiyle oluşan karmaşık bir yapıya sahip olan ECM besin ve madde alışverişini sağlayan ortamdır. Başlıca bileşenleri ise kollejenler, lamininler, fibronektinler, vitronektinler ve elastinlerdir. En önemli bileşeni olan kollajen molekülü α -zincir adı verilen üç polipeptidin birbiri etrafına sarılması ile oluşmuş üçlü heliks yapıdadır [77]. Bu üçlü heliks yapıdaki zincirlerin birbirlerine dolanmasıyla kendisine eş boyuttaki çelik bir telden daha fazla gerilim kuvveti oluşturur. Biyokimyasal yapılarına göre birbirinden farklı kollejen tipleri bulunur [78]. Bileşenlerin işlevselliği açısından ECM sentezi ve yıkımı arasında kurulan denge derinin tamiri açısından önemlidir. Çalışmamızda hazırladığımız yara iyileşmesi panelinde bulunan “Col14a1, Col1a1, Col1a2, Col3a1, Col4a1, Col4a3, Col5a1, Col5a2, Col5a3, Vtn” genler ECM bileşenleri genleridir.

Proteaz aktivitesi normal gelişim sürecince kritik kontrol altında olup yara iyileşmesi sürecinde olgun dokularda meydana gelen homeostazın doku bazında sürdürülmesini sağlar. ECM yıkımı proteaz aktivitesi ile proteolitik kaskadlar tarafından gerçekleştirilir. Primer yapısı, hücresel lokalizasyonu ve substrat spesifitesine göre birbirleriyle yakından ilişkili en az beş farklı alt gruba sahip olan matriks metalloproteazlar (MMPs) birden fazla matriks dinamiklerini etkileyen endopeptidaz enzim grubudur [79]. En çok bilinenleri kollejenazlar, jelatinazlar ve metalloelastazlardır. MMPs’ler ECM’nin yapısında bulunan bütün bileşenleri yıkmaya kabiliyetine sahiptir. MMPs’ler sitokinlerle uyarılarak hücre proliferasyonu ve göçü farklılaşma apoptoz ve anjiyogenez gibi metabolik olaylarda görev alırlar [80,81]. Çalışmamızda hazırladığımız yara iyileşmesi panelinde yer alan “Ctsg, Ctsk, Ctsl1, F13a1, F3 (Tissue Factor), Fga (Fibrinogen), Mmp1a, Mmp2, Mmp7, Mmp9, Plat (tPA), Plau (uPA), Plaur (uPAR), Plg, Serpine1 (PAI-1), Timp1” genler dokunun yeniden rejenerasyonu ile ilgili genlerdir.

Yara iyileşmesi süresince gerçekleşen anabolik (yapım) - katabolik (yıkım) süreçleri arasında kurulan denge sayesinde işlevsiz hale gelen hasarlı hücreler yıkılır, yeniden doku şekillenmesi sağlanır ve hücreler arasında sitoskelet ve adezyon yeniden oluşturularak doku tamiri tamamlanır [79]. Sitoskelet ve adezyon hücrenin

çevresiyle koordinasyonu iletişimi ve hareketini sağlayan bir olgudur ve hücre için vazgeçilmezdir. Yara iyileşmesi panelinde bulunan “Cdh1 (E-cadherin), Itga1, Itga2, Itga3, Itga4, Itga5, Itga6, Itgav, Itgb1, Itgb3, Itgb5, Itgb6, Acta2 (a-SMA), Actc1, Rac1, Rhoa, Tagln” genleri adhezyon ve sitoskelet ile ilgili genlerdir.

Çalışmamızda hazırlanan yara iyileşmesi panelinde bu gen gruplarının dışında bulunan “Tgfb1, Tgfbr3, Stat3, Ctnnb1, Wisp1, Wnt5a, Mapk1 (Erk2), Mapk3 (Erk1), Pten, Egfr, Il6st (Gp130), PTGS2” genleri sinyal dönüştürme ve iletme ile ilgili bazı genlerdir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereçler

3.1.1 Cihazlar

Tez aşamasında kullanılan cihazlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

Tablo 3.1: Kullanılan cihazların listesi.

| Cihaz Adı | Cihazın Firması | Kullanım Amacı |
|-------------------------|------------------------------|--|
| Otoklav | Nüve | Laboratuvar malzemeleri sterilizasyonun da kullanılmıştır. |
| Santrifüj | Hettich | Tüm moleküler çalışmalar da kullanılmıştır. |
| Etüv | Nüve | Yağ fraksiyonunun elde edilmesinde kullanılmıştır. |
| Derin dondurucu (-20°C) | Vestel | Örneklerin saklanması da kullanılmıştır. |
| Azot Gazı Tüpü | Taylor-Wharton Gas Equipment | Alkolün uçurulmasında kullanılmıştır. |
| Derin dondurucu (-80°C) | Haier | Biyopsi örneklerinin saklanması da kullanılmıştır. |
| Spektrofotometre | Thermo Scientific | Trombosit miktarının tayininde kullanılmıştır. |
| Buz makinesi | Scotsman | Soğuk ortamda gerçekleştirilen çalışmalar da kullanılmıştır. |
| Hassas tartı | Precisa | Kimyasalların miktar tayinin de kullanılmıştır. |
| Homojenizatör | Heidolph | Biyopsi örneklerinin parçalanmasında kullanılmıştır. |
| Soğutmalı santrifüj | Nüve | mRNA izolasyonunda kullanılmıştır. |
| Nanodrop | Maestro | mRNA konsantrasyonlarının ölçümünde kullanılmıştır. |

Tablo 3.1 (devam): Kullanılan cihazların listesi.

| Cihaz Adı | Cihazın Firması | Kullanım Amacı |
|-------------------|-------------------|--|
| RT-PZR Cihazı | Biorad | Hedef genlerin regülasyon seviyelerinin bakılmasında |
| PZR Cihazı | Biorad | Tüm moleküler sentez tepkimelerinin inkübasyonunda kullanılır. |
| Otomatik Pipetler | Eppendorf, | Tüm moleküler çalışmalar da kullanılmıştır. |
| Buzdolabı (+4°C) | Beko | Solüsyonların ve örneklerin saklanması için kullanılmıştır. |
| Vorteks | Stuart | Örneklerin homojenizasyonun da kullanılmıştır. |
| Hemogram | Abacus Junior vet | Trombosit sayımı yapmak için kullanılmıştır. |

3.1.2 Ticari kitle ve sarf malzemeler

Ticari olarak satın alınan kitle ve sarf malzemeler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan ticari kitle ve sarf malzeme listesi.

| Kitler | Marka | Kullanım amacı |
|--|---|--|
| Direct-zol™ RNA MiniPrep | Zymo research | Dokudan RNA izolasyonu için kullanılmıştır. |
| Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Thermo Fisher Scientific | RNA dan cDNA transkripsiyonu için kullanılmıştır. |
| GAPDH primerleri (F ve R) | Thermo Scientific | Verim ve kontrol RT-PZR reaksiyonlarında kullanılmıştır. |
| Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix | Biorad | Kantitatif PCR analizlerinde kullanılmıştır. |
| iTaq Universal SYBR Green Supermix | Biorad | Kantitatif PCR analizlerinde kullanılmıştır. |
| ZR BashingBead Lysis Tubes (2.0 mm Beads) | Zymo research | Biyopsi dokularının parçalanmasında kullanılmıştır. |
| Sitratlı Tüpler | Vacusera 1.8 ml coagulation 3.2 % Sodium Citrate - DT | Kanın hemoliz olmasını önlemek amacıyla kullanılmıştır. |
| Yara Paneli | Qiagen RT ² Profiler PCR Array | Gerçek zamanlı PCR reaksiyonlarında kullanılmıştır. |

Tablo 3.2 (devam): Kullanılan ticari kit ve sarf malzeme listesi.

| | | |
|-------------|---------------------|---|
| Crio tüpler | NEST Cryogenic Vial | Biyopsi örneklerinin – 80 °C de saklanması amacıyla kullanılmıştır. |
|-------------|---------------------|---|

3.1.3 Kimyasallar

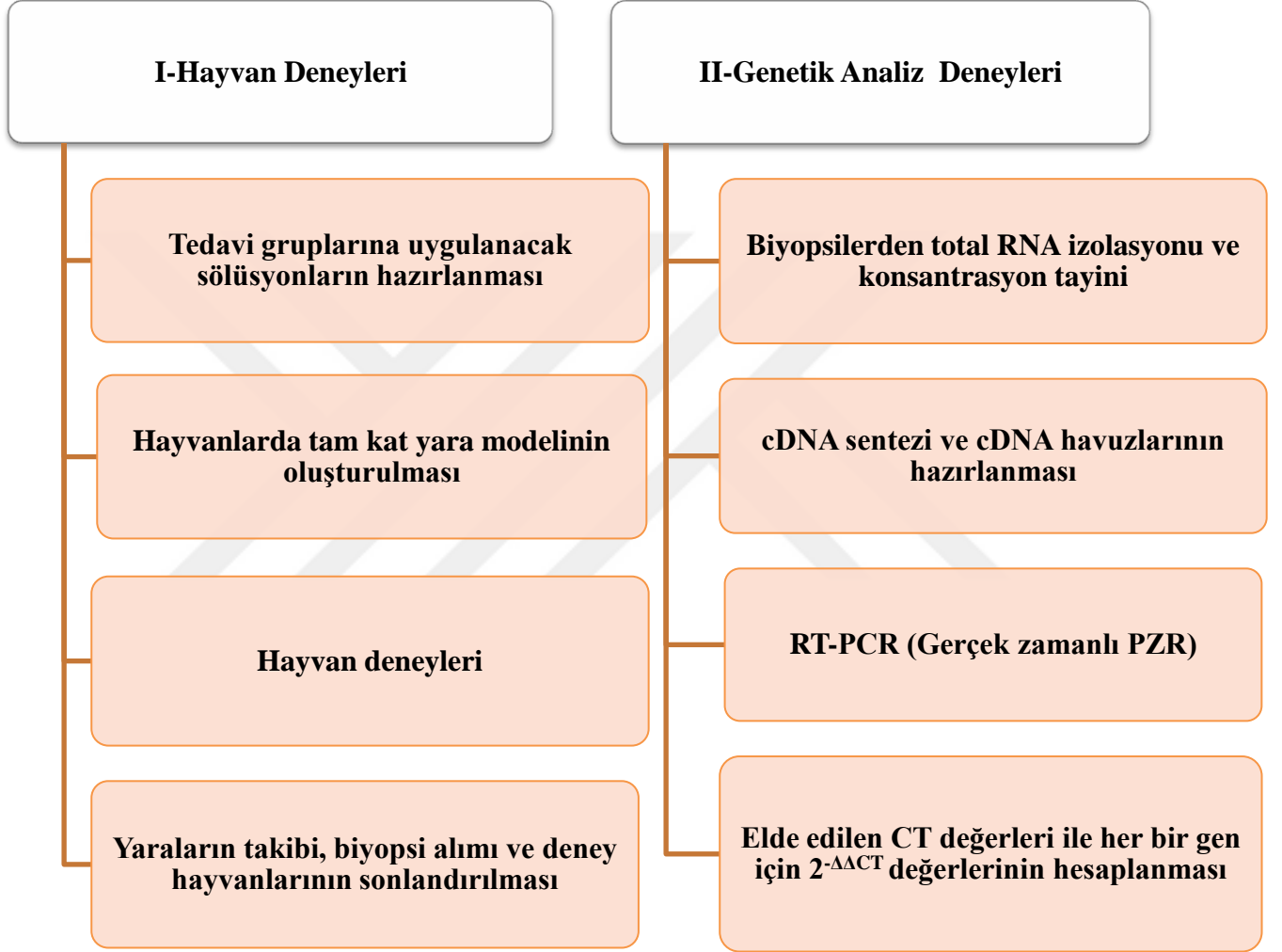
Tez aşamasında kullanılan kimyasallar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.3: Kullanılan kimyasallar listesi.

| Kimyasal Adı | Marka | Kullanım Amacı |
|--------------------------------------|--------------------------------|---|
| Etanol | Emsure | Benç ve malzeme temizliği de kullanılmıştır. |
| CaCl ₂ | Santa Cruz | Trombositleri aktive etmek için kullanılmıştır. |
| Trombin Multifibren U | Siemens Healthcare Diagnostics | Trombositleri aktive etmek için kullanılmıştır. |
| Absolute Etanol | Emsure | Moleküler çalışmalar da kullanılmıştır. |
| PBS (Fosfat tamponlu tuz) | Applichem | Hücre yıkama solüsyonu olarak kullanılmıştır. |
| DMSO | Santa Cruz | Lipid fraksiyonunun çözmek amacıyla kullanılmıştır. |
| Ketamin | Ketasol % 10 Richer Pharma | Deney hayvanları için anestezi olarak kullanılmıştır. |
| Ksilazin | Rompun %2 Bayer | Deney hayvanları için anestezi olarak kullanılmıştır. |
| Steril aprotin İzotonik NaCl çözelti | Medifleks Eczacıbaşı | Biyopsi dokularının yıkanmasında kullanılmıştır. |

3.2. YÖNTEM

Çalışma için gerekli gereçler temin edildikten sonra deneysel çalışmalar boyunca izlenen protokol de yer alan diyagramda gösterilmiştir (Şekil 3.1)



Şekil 3.1: Çalışmamıza ait diyagram.

3.2.1 Tampon solüsyonlar ve çözeltiler

○ CaCl₂ çözeltisi

1,1 gr CaCl₂ ve 10 ml dH₂ O karıştırılarak 10 mM CaCl₂ solüsyonu elde edildi. PRP bileşenlerinden trombositlerin aktifleştirilmesinde kullanıldı.

○ Trombin hazırlanması

2 ml Multifibren U Trombin, 2 ml dH₂ O ile sulandırılmıştır. PRP bileşenlerinden trombositlerin aktifleştirilmesinde kullanıldı.

- **PBS (Phospahte Buffered Saline) (pH 7,2)**
Hücre kültürü aplikasyonlarında kullanılan dengeli tuz solüsyonudur. Potasyum fosfat monobazik, NaCl ve sodyum fosfat dibazik içerir. PRP ve lipid fraksiyonunun tedavi amaçlı hazırlanması sırasında kullanıldı.
- **% 25 lik DMSO (Dimethyl sulfoxide) çözeltisinin hazırlanması**
3 ml PBS + 1 ml DMSO karıştırılarak hazırlanan seyreltik DMSO çözeltisi lipidlerin çözülmesinde kullanıldı.

3.2.2 PRP ve PRP'den Elde Edilen Lipid Fraksiyonu

3.2.2.1 PRP' nin hazırlanması

- Rastgele seçilen sıçanlardan bir tanesinin literatüre uygun şekilde anestezikler enjekte edildikten sonra, kalbinden yaklaşık 10 ml tam kan (periferik kan) hemoliz olmaması için 3.2 % 1.2 ml (0.109 M) sodyum sitrat içeren tüplere alındı.
- 18 °C de 750 rpm de 15 dk santrifüj yapıldı.
- Şekil 2.4' de gösterildiği şekilde santrifüj sonrasında oluşan şeffaf renkli plazma kısmı ayrı bir tüpe toplanır. Elde edilen bu kısım plateletten zengin plazmadır [82].

3.2.2.1 Lipid fraksiyonunun hazırlanması

- İlk santrifüjden elde edilen PRP' nin trombositlerinin uyarılması amacıyla inkübasyonu yapıldı ; 0,5 ml PRP + 5 µl (10mM) CaCl₂ + 5 µl (1 U / ml) Trombin aynı ependorfta birleştirilerek 30 dk 37 °C de inkübe edildi.
- İnkübasyon tamamlandıktan sonra 3000 rpm hızda 15 dk 21 °C' de santrifüj yapıldı ve üst faz (supernatant) alındı; 200 µl supernatant + 1000 µl saf (%100) etanol eklendi.
- Karışım 10 dk sonikasyon ve 5 dk vorteks yapıldıktan sonra -20 °C' ye overnight (16 saat) bırakıldı [7].
- Overnight inkübasyondan sonra 12.000g/ 14.000 rpm hızda +4 °C' de 30 dk santrifüj yapıldı. Elde edilen supernatant lipid fraksiyonu içeren kısımdır.
- Azot gazı kullanarak lipid fraksiyonunun içerdiği alkol uçuruldu. Tüpün alt kenarlarında kalan beyaz çökeltiler PRP'den elde edilen lipid fraksiyonudur.

- Lipid fraksiyonu tedavi için kullanılmadan önce % 25 lik DMSO içerisinde çözdürüldü.

3.2.2.3 Lipid fraksiyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi

- Elde edilen lipid fraksiyonu için spektrometre cihazıyla 200-240 dalga boyları arasında spektrum taraması yapılarak 204-208 nm arasında beklenen pik eğrisi 206,9 nm dalga boyunda (1,138 ABS) gözlemlendi.

3.2.2.4 PRP için trombosit sayımı

- Hemogram cihazıyla yapılan trombosit sayımı için elde edilen PRP 4 kat sulandırıldıktan sonra cihaza verildi ve yaklaşık $222,5 \times 10^3$ trombosit sayıldı.
- Literatüre göre 1 yaraya uygulanacak toplam trombosit sayısı 280×10^7 (28 milyon) olacak şekilde PRP ve lipid fraksiyonu içeriğinde bulunan trombosit miktarları hesaplandı ve her yara için 50 µl (280 milyon trombosit içerecek şekilde) hazırlandı [83].

3.2.3 Hayvan Deneyleri

Çalışmamız Bezmi-Âlem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2016 / 251 No' lu kararla onaylanmıştır. Bezmi- Âlem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından 25 tane sağlıklı Sprague-Dawley türü yetişkin, dişi, 200-240 gr ağırlığında sıçanlar temin edilmiştir. Bezmi- Âlem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında bakımları yapılmıştır ve hayvan deneyleri 31 Ocak 2017 - 21 Şubat 2017 tarihleri arasında yürütülmüştür. Sıçanlar 21-24 °C' de 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık fotoperiyodunda polikarbon yapılı sıçan kafeslerinde bireysel olarak % 18-20 protein içeren pelet sıçan yemi ve su ad-libitum olacak şekilde muhafaza edilmiştir.

3.2.3.1 Grupların oluşturulması

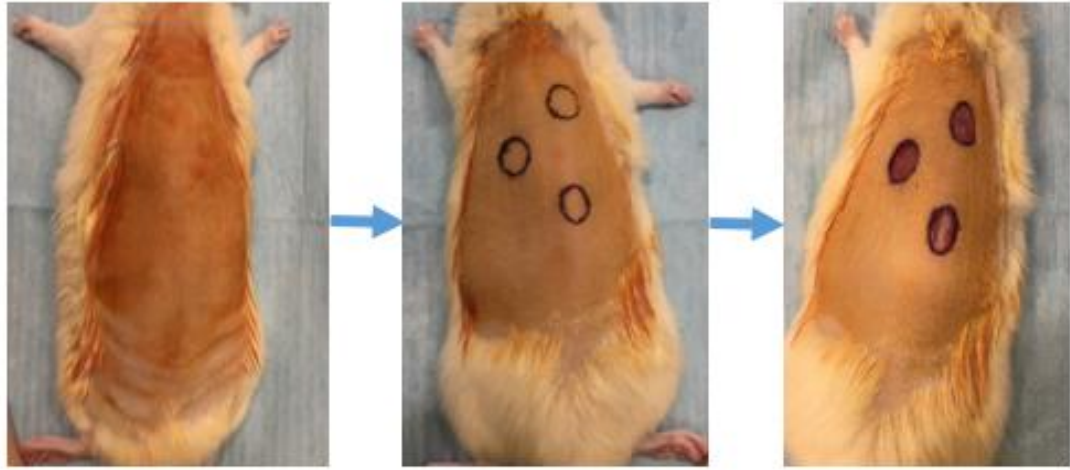
İki grupta 6'şar, iki grupta 4' er olmak üzere sıçanlar rastgele olarak; lipid fraksiyonu, PRP, DMSO ve kontrol grubu şeklinde 20 hayvan 4 gruba ayrılmıştır.

3.2.3.2 Modellerin oluşturulması

Gruplar belirlendikten sonra literatüre dayalı olarak anesteziğin etki süreleri de göz önünde bulundurulduğunda yara açılması esnasında ve her biyopsi alınımından 10 dakika önce sıçanlara 10 mg/kg (intraperitoneal) dozda ksilazin HCl ve 50 mg/kg

(intraperitoneal) dozda ketamin HCl anestezisi uygulanmıştır [84 ,85 ,86]. Literatüre dayalı olarak hayvanın yarasına ulaşmaması için sırt bölgesi tıraş edildikten sonra % 70 lik alkolle dezenfeksiyon işlemi yapılmıştır.

Hayvanların sırt bölgelerinde oluşturulan yaraların konumu gösterilmektedir (**Şekil 3.2**). Oluşturulan yaraların ilk alanlarının standart olması için öncelikle kalıp bir levha oluşturulup yara şekilleri doku kalemi ile tüysüz deriye çizilmiştir. Daha sonra punch biyopsi tekniği ile 1,2 cm çapında sirküler 3 tane tam kat yara açılarak yara modeli oluşturulmuştur. Yaraların iki tanesi orta hattın sağ tarafında, bir tanesi sol tarafında birbirine yaklaşık eşit uzaklıklarda olacak şekilde açılmıştır.



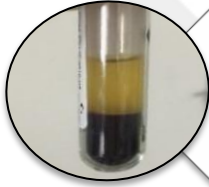
Şekil 3.2: Yara alanlarının oluşturulması ve konumu.

3.2.3.3 Tedavi ve biyopsi alımı

Yara modeli resim 1' deki gibi oluşturulduktan sonra, her gruptan cerrahi makasla kesilen deri parçası 0. Gün biyopsisi kabul edildi ve 0. Gün tedavileri yapıldı. Yaralar açık bırakıldı ve hayvanlar kafeslerine yerleştirildi. Yaralanmanın 3 gün sonra tüm hayvanların 3. gün yaralarından biyopsi alındı ve geriye kalan 2 yaraya da tedavi grubuna göre uygulandı. Yaralanmadan 7 gün sonra aynı saatlerde 7. gün biyopsileri alındı ve kalan son yaraya tedaviler grubuna göre tedavi uygulandı. Yaralanmadan 14 gün sonra aynı saatlerde 14.gün biyopsileri alındı ve tüm hayvanlar etİge uygun bir şekilde yüksek dozda anestezik madde verilerek sonlandırıldı. Tedavilerde kullanılan PRP 0. ,3. ve 7. Günlerde taze hazırlandı ve uygulandı. Lipid fraksiyonu ve DMSO ise hayvan deneylerinden önce hazırlandı. Tedavi çözeltileri ve içerikleri gösterilmiştir (**Şekil 3.3**).

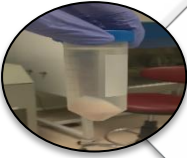
Tablo 3.4: Günlere göre tedavi ve biyopsi alımı.

| Grup | Gün | Biyopsi | Uygulanan Tedavi / Miktar | Fotoğraf |
|--|-----|---------|---------------------------|----------|
| PRP 6 Hayvan | 0. | ✓ | PRP / 50 ml | ✓ |
| | 3. | ✓ | PRP / 50 ml | ✓ |
| | 7. | ✓ | PRP / 50 ml | ✓ |
| | 14. | ✓ | PRP / 50 ml | ✓ |
| Lipid Fraksiyonu 6 Hayvan | 0. | ✓ | Lipid fraksiyonu / 50 ml | ✓ |
| | 3. | ✓ | Lipid fraksiyonu / 50 ml | ✓ |
| | 7. | ✓ | Lipid fraksiyonu / 50 ml | ✓ |
| | 14. | ✓ | Lipid fraksiyonu / 50 ml | ✓ |
| DMSO 4 Hayvan | 0. | ✓ | DMSO / 50 ml | ✓ |
| | 3. | ✓ | DMSO / 50 ml | ✓ |
| | 7. | ✓ | DMSO / 50 ml | ✓ |
| | 14. | ✓ | DMSO / 50 ml | ✓ |
| SHAM 4 Hayvan | 0. | ✓ | Tedavi Yok | ✓ |
| | 3. | ✓ | Tedavi Yok | ✓ |
| | 7. | ✓ | Tedavi Yok | ✓ |
| | 14. | ✓ | Tedavi Yok | ✓ |



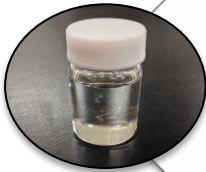
PRP (6 Hayvan)

- Trombosit sayımı
- Trombosit sayısına göre PBS ile seyreltme yapıldı veya 3500 rpm de 5 dk santrifüj ile çöktürülüp yoğunlaştırıldı.
- 280×10^7 (trombosit)/50 ml olacak şekilde yaralara uygulandı.



Lipid Fraksiyonu (6 Hayvan)

- Trombosit sayımı ve Spektrum taraması (ABS ölçümü)
- 0,5 ml alkolü uçurulmuş lipid fraksiyonu % 25 lik 80 ml DMSO ile çözdürüldü.
- 280×10^7 (trombosit)/50 ml olacak şekilde yaralara uygulandı.



DMSO (4 Hayvan)

- % 25 lik olacak şekilde hazırlandı ve bir yara için 50 ml uygulandı.

SHAM GRUBU

SHAM -Plasebo-kontrol (4 Hayvan)

- Hiçbir tedavi uygulanmadı.

Şekil 3.3: Gruplara ait tedavi planı (Resimler deneyler sırasında çekilmiştir.).

3.2.3.4 Yaraların makroskopik olarak izlenmesi ve fotoğraflanması

- Yaralanma ve biyopsi günlerinde tüm gruplara ait hayvanların yaraları makroskopik olarak incelendi. 0. , 3. , 7. ve 14. günlerde tüm yaraların fotoğrafları yaradan 20 cm uzaklıkta yukarıdan, sabit ayarlar ve ışık altında cetvel yerleştirilerek çekildi.

3.2.3.5 Yaralara ait alanların takibi

- Yara modeli oluşturulmasını takiben ve biyopsi günlerinde yaraların boyutları milimetrik asetat kâğıdına S ölçülü kalıcı marker kalemi kullanılarak çizilmiştir. Çizilen yara bölgesinin içindeki alan Bluebeam® programı ile hesaplanmış ve yara iyileşmesi süresi takip edilmiştir. Kontraksiyon (yara kapanma) yüzdelik oranı literatürde kullanılan aşağıdaki formülle hesaplanmıştır [87 ,88].

$$\text{Yara kontraksiyon yüzdesi} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

- A_0 ; yaraya ait hesaplanan ilk alan
- A_t ; yaraya ait hesaplanan son alan

3.2.3.6 Biyopsilerin saklanması

- Alınan yara biyopsileri ivedi bir şekilde izotonik NaCl ile temizlendikten sonra parçalanıp krio tüplere konuldu ve -80°C ' de saklandı. Toplam biyopsi örneği sayısı 61 tane dir. 60 tanesi 3., 7. ve 14. günlerde alınan yara biyopsi örnekleri olup 1 tanesi ise 0. güne ait deri örnekleridir hepsi aynı crio tüpte toplanmıştır.

3.2.4 Genetik Analiz Deneyleri

- Deney hayvanları sonlandırıldıktan sonra çalışmamızın ikinci kısmı olan genetik analiz deneyleri aşağıdaki şekilde tamamlanmıştır.

3.2.4.1 Total RNA izolasyonu

- RNA izolasyonu sırasında RNAase aktivitesini inhibe edebilmek tüm aşamalar buz üzerinde yapıldı. Direct-zol™ RNA MiniPrep kiti kullanılarak tamamlanmıştır. İzolasyon basamakları:

- -80 °C' de bulunan biyopsi örnekleri buz üzerinde parçalanarak 40-50 mg olacak şekilde tartıldı ve ticari olarak satın alınan Bashing Bead Lizis tüplerinin içerisine yerleştirildi.
- Tüp içerisindeki biyopsi örneklerinin üzerine 700 µl kit içerisinde bulunan Reagent - Trizol eklendi ve homojenizatörde 30* 1 /s frekansta 3-6 dk parçalandı.
- 14.000 rpm hızda 5 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı ve üst faz yeni toplama tüplerine alınarak üzerine bire bir oranında saf (%100 lük) etanol pipetaj yapılarak eklendi. Tüpler kolonlara yerleştirildi ve 14.000 rpm hızda 30 sn +4 °C' de santrifüj yapıldı.
- Kolonlara DNA ları parçalamak için 75 µl DNAase Tamponu ve 5 µl DNAase ile hazırlanan reaksiyon karışımı eklendi ardından 15 dk inkübasyon edildi. İnkübasyon sonrasında 14.000 rpm hızda, 15-30 sn, +4 °C'de santrifüj yapıldı.
- Kolonlara 400 µl Pre-Wash solüsyonu eklendi ve 14.000 rpm hızda 30 sn +4 °C'de santrifüj yapıldı. Bu step tekrarlandı.
- Kolonlara 700 µl Wash solüsyonu eklendi ve 14.000 rpm hızda 30 sn +4 °C'de santrifüj yapıldı. Yıkama işlemlerinin sonunda kolonlar boş ve steril toplama tüplerine yerleştirildi.
- Kolonlara 50 µl elüsyon solüsyonu (nükleazsız su) emdirildi ve 14.000 rpm hızda 2 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı ve tüm total RNA örnekleri -20 °C' de saklanmıştır.

3.2.4.2 Total RNA miktarlarının tayini

- Nanodrop cihazı kullanılarak 260 nm dalgaboyunda RNA konsantrasyonlarının ölçümü yapıldı ve kaydedildi.

3.2.4.3 cDNA sentezi

- Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit kullanılarak total RNA içeriğindeki mRNA'dan cDNA elde edildi.

Tablo 3.5: cDNA sentezi reaksiyon karışımı.

| İçerik/ Reaksiyon | 1 X Reaksiyon | 65 X Reaksiyon |
|----------------------------|---------------|----------------|
| 10 X RT Buffer | 1,5 ml | 97,5 ml |
| dNTP Mix | 0,6 ml | 39 ml |
| Random primerler | 0,7 ml | 45,5 ml |
| Reverse transkriptaz enzim | 1,5 ml | 97,5 ml |
| dH ₂ O | 7,7 ml | 500,5 ml |
| RNA | 3 ml | ----- |
| Toplam | 15 ml | 780 ml |

- Reaksiyon karışımı 8 tane stripli tüpte 61 tane kuyucuğa 12 ml gelecek şekilde dağıtıldı daha sonra 3 ml total RNA eklendi. Karışım PZR cihazında aşağıdaki koşullarda inkübasyona bırakıldı.
 - 25 °C de 10.00 dakika,
 - 37 °C de 2.00.00 saat,
 - 85 °C d 0.05 saniye,
 - +4 °C de ∞ .

3.2.4.4 GAPDH housekeeping gen primeri

- Çalışmamızda RT-PZR verim testinde ve elde edilen cDNA ların kontrol RT-PZR reaksiyonlarında kullanılan GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gen primerleri ratlar için housekeeping bir gene ait primerlerdir [89]. GAPDH ürünü enzimler solunumda görev alan yaşamsal öneme sahip glikolitik enzimlerdir.

Tablo 3.6: GAPDH gen primerleri.

| | |
|------------------------------|--------------------------------|
| (F) İleri (forward) primer | 5'-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' |
| (R) Tersine (reverse) primer | 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3' |

3.2.4.5 Housekeeping gen ile kontrol RT- PZR

- Housekeeping bir gen olan GAPDH gen primerleri kullanılarak elde edilen tüm cDNA lar için RT-PZR yapıldı. cDNA lardan hazırlanacak gen havuzlarının oluşturulması için sonuçlar değerlendirildi.

Tablo 3.7: Kontrol RT-PCR reaksiyon karışımı.

| RT-PCR içeriği | 1 X Reaksiyon | 75 X Reaksiyon |
|--------------------------|---------------|----------------|
| Syber green mix | 10 µl | 750 µl |
| R ve F primerler (GAPDH) | 1 µl + 1 µl | 75 µl + 75 µl |
| Kalıp cDNA | 5 µl | --- |
| dH ₂ O | 3 µl | 225 µl |
| Toplam | 20 µl | 1215 µl |

- Hazırlanan RT-PZR karışımından 15 µl, 61 PZR tüpüne paylaştırıldı ve üzerine 5 µl cDNA eklendi. RT-PZR aşağıdaki koşullarda gerçekleşti.



- Elde edilen RT-PCR sonuçları kaydedildi ve cDNA havuzlarının hazırlanması aşamasında kullanıldı.

3.2.4.6 cDNA havuzlarının hazırlanışı

- 4 farklı gruba ait hayvanların biyopsileri günlerine göre gruplandırılarak havuzlar belirlendi ve bir havuzda 3000 ng / 60 µl olacak şekilde bütün örnekler için havuza koyulacak miktarlar hesaplandı. Toplam 13 tane havuz oluşturuldu.
- Oluşturulan cDNA havuzları -20 °C de PZR array (yara paneli) kullanılmak üzere saklandı.

Tablo 3.8: Biyopsi günlerine göre oluşturulan cDNA havuzları.

| Grup/ Havuzlar | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 | P9 | P10 | P11 | P12 | P13 |
|---------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| PRP | 3. gün | 7. gün | 14. gün | | | | | | | | | | |
| Lipid Fraksiyonu | | | | 3. gün | 7. gün | 14. gün | | | | | | | |
| DMSO | | | | | | | 3. gün | 7. gün | 14. gün | | | | |
| SHAM | | | | | | | | | | 3. gün | 7. gün | 14. gün | |
| Sıfırıncı gün | | | | | | | | | | | | | 0. gün |

3.2.4.7 Yara panelinin hazırlanması

Ticari olarak sunulan (Qiagen, Rat Wound Healing PCR Array) yara iyileşmesi çalışmalarında kullanılmak amacıyla hazırlanmış olduğu PCR array panelinde bulunan genler dikkate alınarak yara paneli hazırlanmıştır. Hazırlanan panel içeriği (Tablo 3.9) nükleazsız su ile sulandırıldıktan sonra kuyucuklarda bulunan genlere ait primerler her kuyucukta 5 er µl primer olacak şekilde 96 kuyucuklu well platelere (kuyucuklu plaka) dağıtıldı. Bu şekilde 13 havuz için birbirinin aynı olan 15 tane panel hazırlandı.

Tablo 3.9: Yara iyileşmesi panelinin plate üzerinde gen-primer dağılımı.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|---------|--------|--------|--------|--------|
| A | Acta2 | Actc1 | Angpt1 | Ccl12 | Ccl7 | Cd40lg | Cdh1 | Coll4a1 | Colla1 | Colla2 | Col3a1 | Col4a1 |
| B | Col4a3 | Col5a1 | Col5a2 | Col5a3 | Csf2 | Csf3 | Ctgf | Ctnnb1 | Ctsg | Ctsk | Ctsll | Cxcll |
| C | Cxcll1 | Cxcl3 | Cxcl5 | Egf | Egfr | F13a1 | F3 | Fga | Fgf10 | Fgf2 | Fgf7 | Hbegf |
| D | Hgf | Ifng | Igfl | Il10 | Il1b | Il2 | Il4 | Il6 | Il6st | Itga1 | Itga2 | Itga3 |
| E | Itga4 | Itga5 | Itga6 | Itgav | Itgb1 | Itgb3 | Itgb5 | Itgb6 | Mapk1 | Mapk3 | Mif | Mmpla |
| F | Mmp2 | Mmp7 | Mmp9 | Pdgfa | Plat | Plau | Plaur | Plg | Pten | Ptgs2 | Rac1 | Rhoa |
| G | Serpine1 | Stat3 | Tagln | Tgfa | Tgfb1 | Tgfb3 | Timp1 | Tnf | Vegfa | Vtn | Wispl | Wnt5a |
| H | Actb | B2m | Hprt1 | Ldha | Rplp1 | | | | | | | |

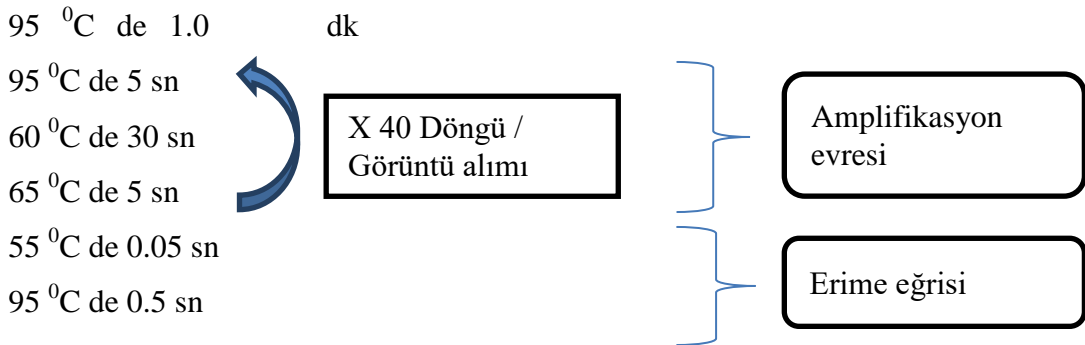
3.2.4.8 Paneller ile kantitatif PCR (qPCR)

- Önceden hazırlanan 13 tane cDNA havuzu primerleri içersinde bulunduran yara panelleriyle qPCR yapıldı. Tüm qPCR reaksiyonları aynı kit kullanılarak aynı koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 3.10: Bir cDNA havuzu için hazırlanan qPCR reaksiyon karışımı.

| RT-PCR İçeriği | 1 x Reaksiyon | 100 x Reaksiyon |
|-------------------|---------------|-----------------|
| SYBER GREEN MİX | 10 µl | 1000 µl |
| cDNA (Havuz) | 0,3 µl | 30 µl |
| dH ₂ O | 4,7 µl | 470 µl |
| Primerler | 5 µl | --- |
| TOPLAM | 20 µl | 1500 µl |

- -20 °C saklanan yara panelleri qPCR dan önce santrifüj yapıldı ve hazırlanan 100X' lük qPCR karışımı 96 kuyucuğa 15 µl olacak şekilde dağıtıldı.
- Well plate in üzeri film ile kapatılıp santrifüj yapıldı ve qPCR cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki koşullarda tüm cDNA havuzları için yara paneli çalıştırıldı.



3.2.5 İstatistiksel analizler

Elde edilen yara kapanması yüzdeleri ile kontrol ve tedavi grupları arasındaki farkın anlamlılığı Student t testi ile hesaplanmıştır.

Hazırlanan tüm yara panellerinin RT-PZR ile çalışılmasından elde edilen veriler Livak ve Schmittgen'in (2008) tanımladığı şekilde $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak analiz edildi [90]. RT-PZR çalışmasının sonuçları değerlendirildiğinde her gen için eşik değerde yoğunluğa ulaşıp sinyal verdiği döngü sayısı (Ct) değeri olarak ifade edilmektedir. Bu değer PZR cihazı tarafından kalibratör olarak tanımlanan genlerin

referans alınması ile hesaplanmaktadır. Çalıştırılan her bir gen için elde edilen Ct değeri referans olarak kullanılan housekeeping gene ait Ct değeri ile karşılaştırılarak ΔCt değeri hesaplanır. Çalışmamızda 5 tane housekeeping gen bulunmakta olup birden fazla housekeeping kullanma durumunda bu genlere ait Ct değerleri normalize edilir ve tek bir Ct değeri olarak hesaplandıktan sonra ΔCt değerleri bulunur. Yapılan normalizasyon işlemlerinden sonra aşağıda yer alan denklemler kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplanmıştır.

- K: Kontrol grubu, T:Tedavi grubu, R:Housekeeping gen X: İlgili gen olmak üzere ;
- $\Delta Ct_{Kx} = Ct_{Kx} - Ct_R$, $\Delta Ct_{Tx} = Ct_{Tx} - Ct_R$
- $\Delta\Delta Ct_x = \Delta Ct_{Tx} - \Delta Ct_{Kx}$
- Kat değişimi = $2^{-\Delta\Delta Ct_x}$

Bu işlemler sonucunda çıkan değer eğer 1'den büyükse ekstra işlem yapmadan gen ifadesi kontrole göre o kadar kat artmış diyebiliriz. Ancak işlemler sonucunda çıkan değer 1'den küçükse şu işlem uygulanır; $1/\text{Kat değişimi}$ ($1/2^{-\Delta\Delta Ct_x}$) işlemi yapılır ve çıkan değer 1'den büyük olacaktır ancak bu defa genin ifadesi için arttığını değil azaldığını söyleyebiliriz. Değer kaç ise gen ifadesi kontrole göre o kadar kat azalmış demektir. Elde edilen tüm sonuçlara ait veriler çalışmamızın bulgular kısmında açıklanmıştır.

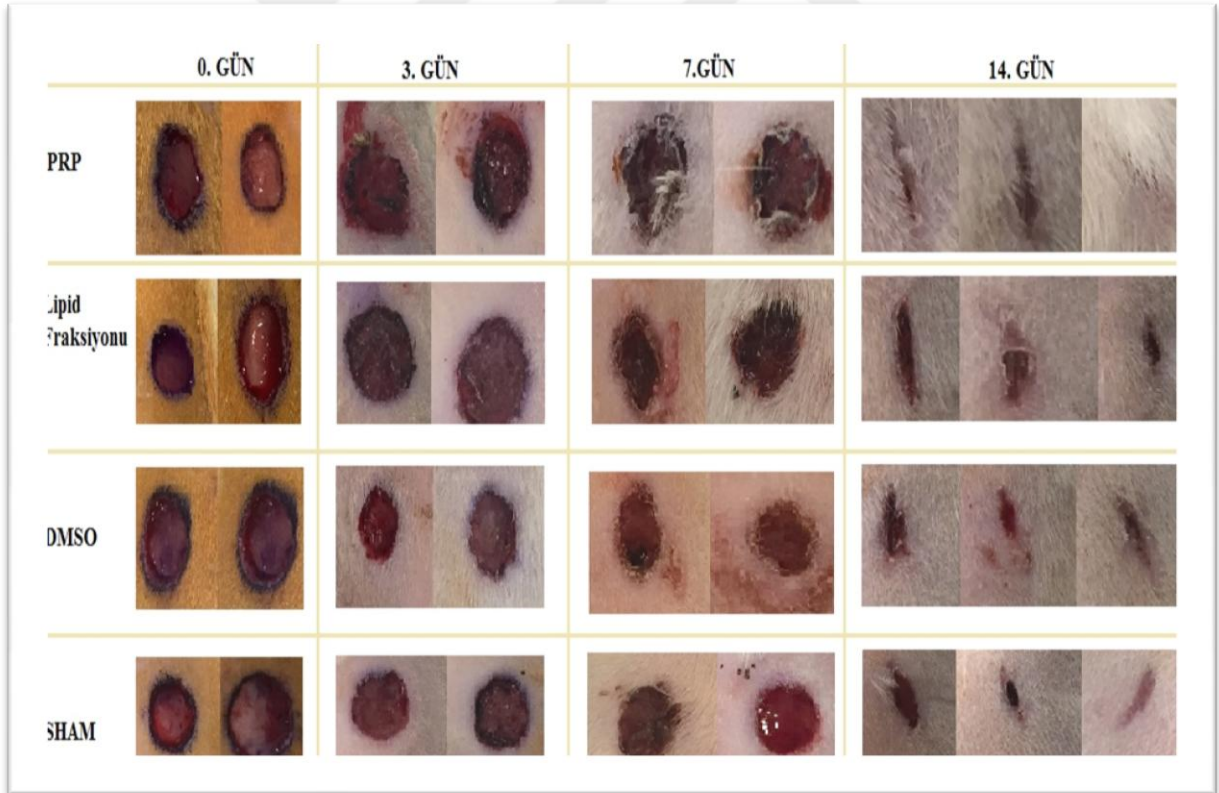
Kontrol ve tedavi gruplarının ΔCt değerleri arasındaki farkın anlamlılığı Student t testi ile hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Makroskopik Bulgular

Gruplara ait tüm hayvanlar biyopsi günlerinde makroskopik incelemeye tabi tutulup yaraların fotoğrafları çekildi. 15 günlük hayvan deneylerimiz süresince denek kaybı meydana gelmedi ve komplikasyonsuz iyileşme görüldü (Şekil 4.1).

PRP tedavisi uygulanan grup hayvanlarının yaralarında diğerlerine oranla inflamasyon ve anjiyogenезin daha erken başladığı buna bağlı olarak kapanma hızında ve epitelizasyon hızında da artış gözlemlenmiştir. Oluşturulan bazı yaraların sırt üzerindeki pozisyona bağlı olarak genişlemiştir. Bu sebeple aynı pozisyonadaki yaralar kendi içlerinde karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.1: Hayvan deneyleri süresince izlenen yaralara ait fotoğraflar.

PRP tedavi grubunda yara iyileşmesinin diğer gruplara oranla daha hızlı gerçekleştiği gözlemlenmektedir. Özellikle 14. gün iyileşmenin son evrelerinde yaralar PRP grubunda tüylerle kaplanmış ve tamamen kapanmıştır.

Lipid Fraksiyonu grubunda ise 3. ve 7. günlerde kabuklanma daha fazla olduğu tespit edilmiştir ancak 14. günde yara hala açıktır. DMSO ile lipid fraksiyonu grupları yaralara makroskopik olarak hemen hemen aynı etkiyi göstermiştir ancak moleküler seviyedeki farklılıkları çalışmamızın ilerleyen kısımlarında gösterilecektir.

SHAM grubu hiçbir tedavi uygulanmayan grup olup yaranın doğal koşullarda nasıl kapandığını ve yara iyileşme hızını gözlemlemek için incelenmiştir. Diğer gruplara oranla 7. Günde yarasının hala kabuk tutmadığı görülmektedir.

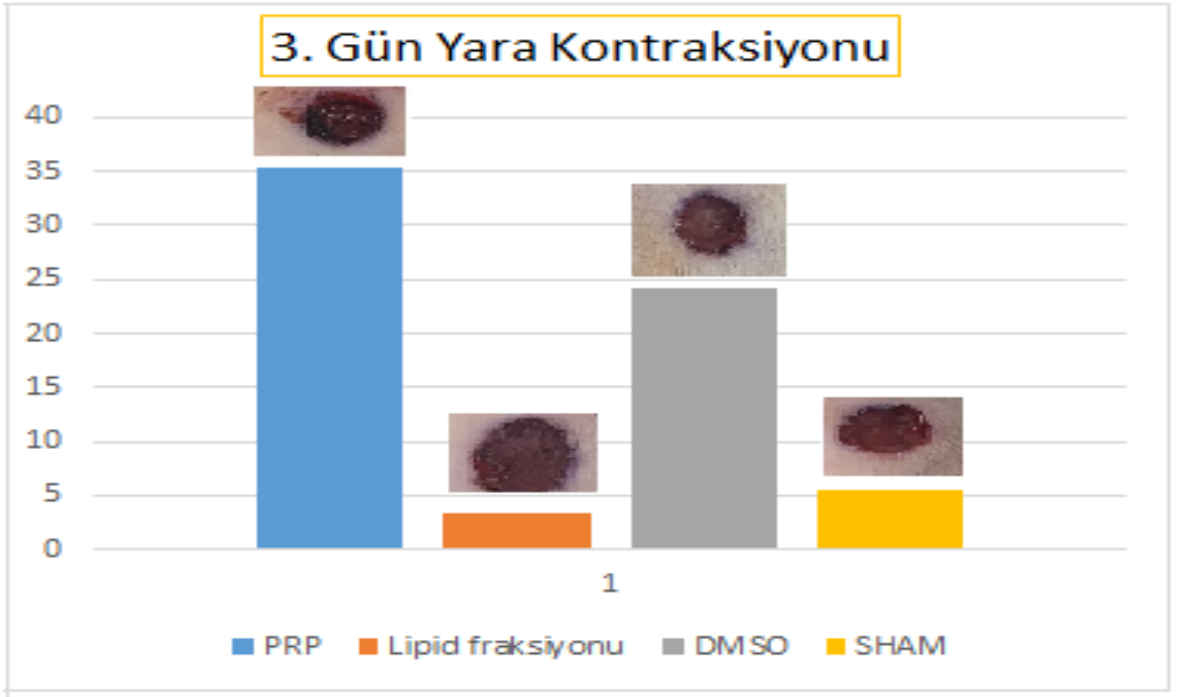
4.1.1 Yara alanlarına ait bulgular

Çalışmamızın hayvan deneyleri süresince tüm grupların yaralanma ve biyopsi alım günlerine ait yaraların alanları çizilmiş ve hesaplanmıştır. Hesaplanan alan değerleri ile yara kontraksiyon (yara kapanma) yüzdesi aşağıda yer alan formülle hesaplanmıştır [88].

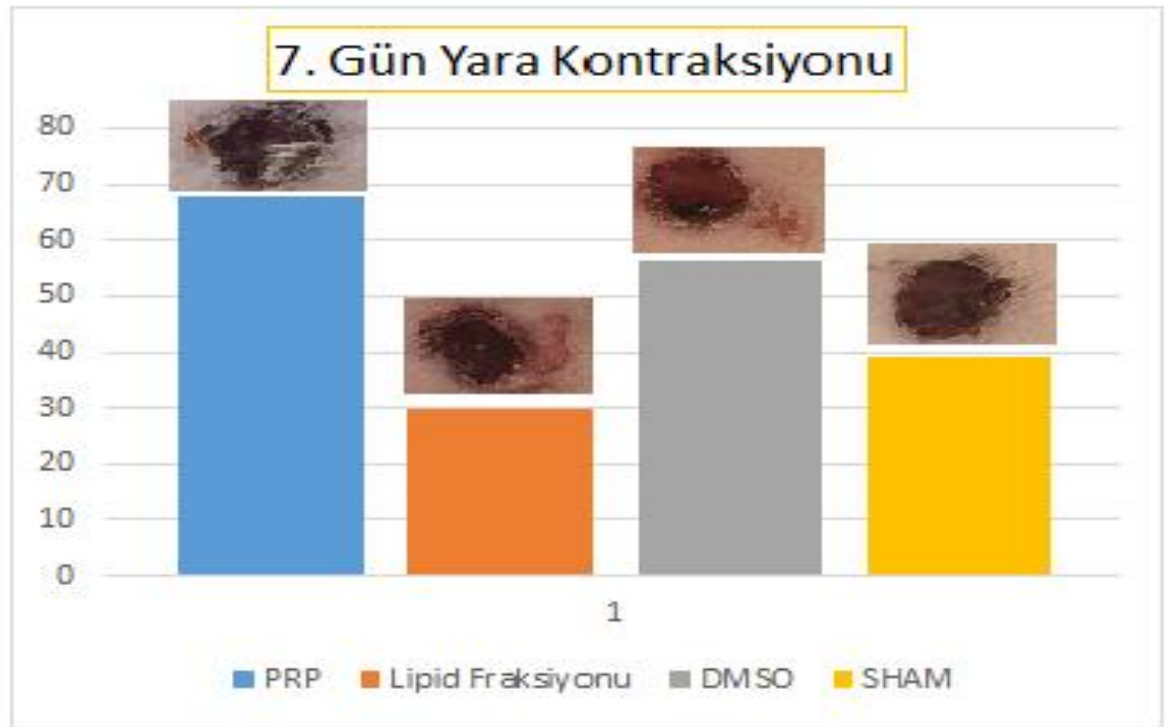
Yara kontraksiyonu (%) = $(A_0 - A_t) / A_0 \times 100$ formülü ile kapanma yüzdesi, Microsoft Excel programı kullanılarak ise standart sapma hesaplandı. Elde edilen bulgular tablo ve grafikler yardımıyla gösterilmektedir. (Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4)

Tablo 4.1: 3., 7. ve 14. günlerde yara kontraksiyon yüzdelikleri (\pm standart sapma).

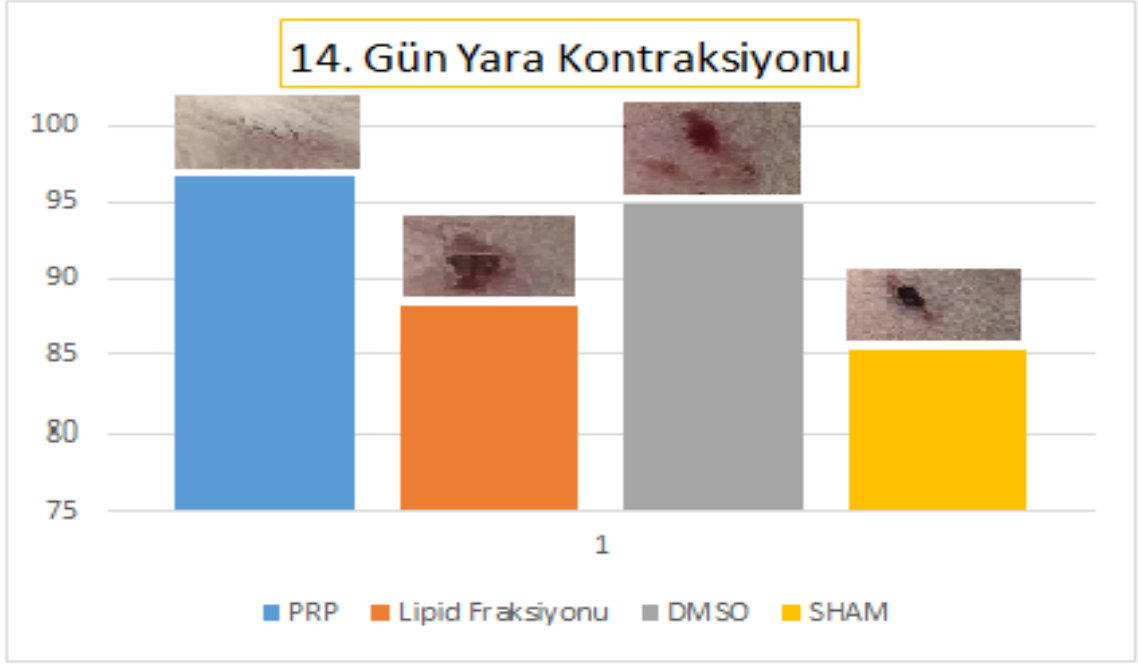
| Günler/ Gruplar | 3 | 7 | 14 |
|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| PRP | 35,40 \pm 8,02 | 67,74 \pm 5,99 | 96,70 \pm 2,14 |
| Lipid Fraksiyonu | 3,27 \pm 24,56 | 29,97 \pm 15,86 | 88,44 \pm 8,01 |
| DMSO | 24,28 \pm 7,22 | 56,56 \pm 12,46 | 94,91 \pm 2,33 |
| SHAM | 5,52 \pm 6,14 | 38,96 \pm 11,92 | 85,29 \pm 9,26 |



Şekil 4.2: 3. Güne ait yara kontraksiyon verileri.



Şekil 4.3: 7. Güne ait yara kontraksiyon verileri.



Şekil 4.4: 14. Güne ait yara kontraksiyon verileri.

4.1.2 Yara kontraksiyonlarına bağlı istatistiksel bulgular

Elde edilen yara kapanma yüzdeliklerine bağlı “p” değeri “T Test” ile hesaplanmıştır. Gruplar arasındaki karşılaştırmalara bağlı p değerleri Tablo 4.2’ de gösterilmiştir.

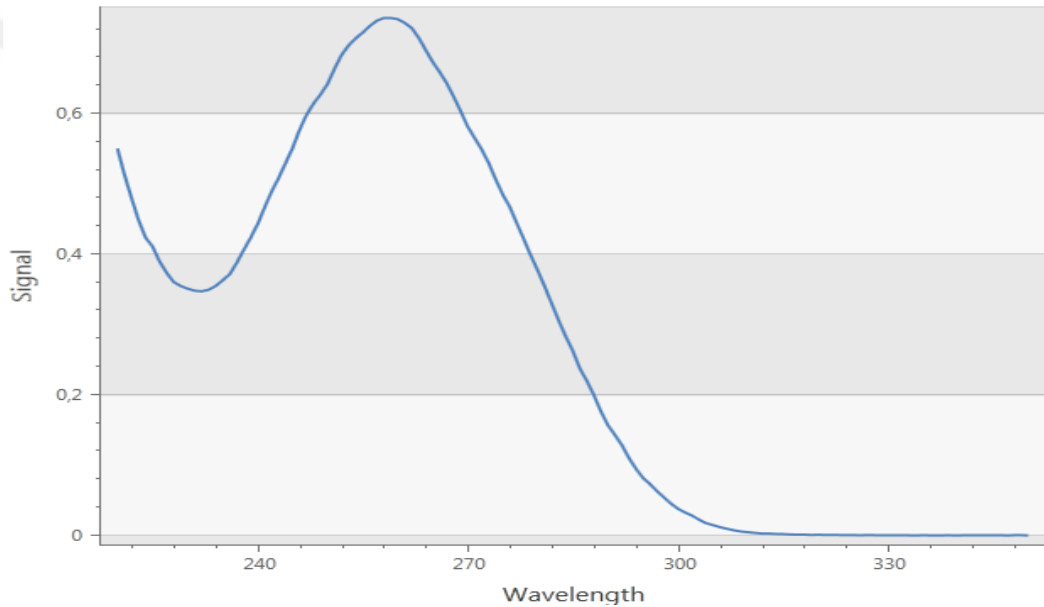
Tablo 4.2: Hesaplanan “p” değerleri.

| Gruplar / Günler | 3 | 7 | 14 |
|------------------|---------|---------|--------|
| PRP-SHAM | 0,0182* | 0,0066* | 0,4525 |
| Lipid F. –SHAM | 0,0329* | 0,4942 | 0,7219 |
| DMSO- SHAM | 0,1105 | 0,0697 | 0,3666 |
| Lipid F. – PRP | 0,0002* | 0,0174* | 0,1290 |
| Lipid - DMSO | 0,0097* | 0,0689 | 0,2155 |

- * $p \leq 0,05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlıdır.

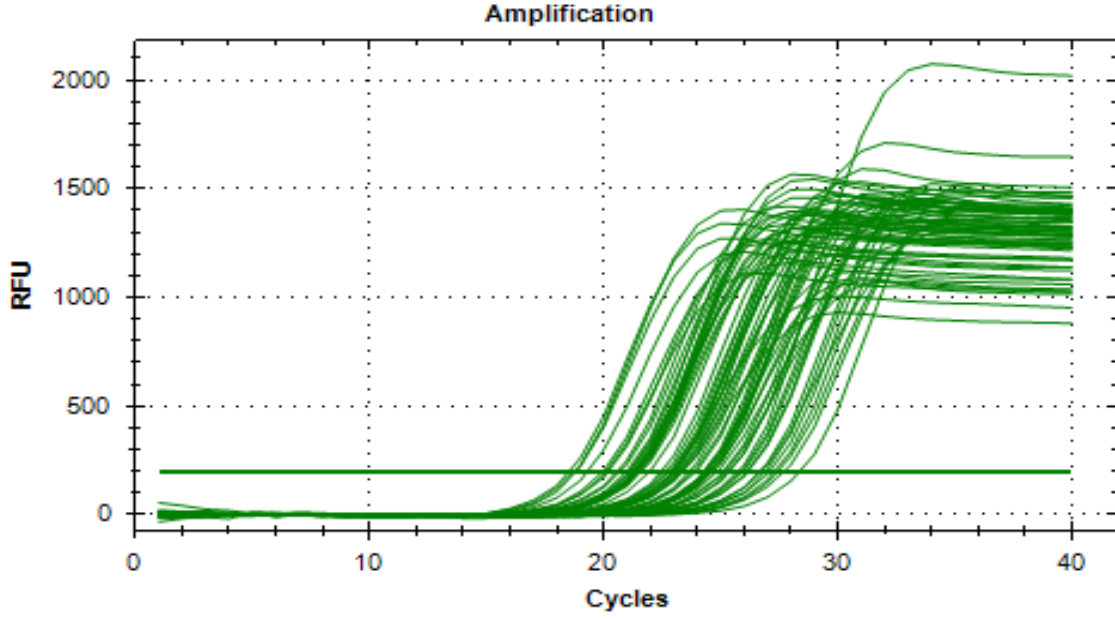
4.2 Moleküler Bulgular

Çalışmamızda daha önceki çalışmalarda yara iyileşmesi sürecine katıldığı bilinen ve tespit edilmiş 84 adet gen ve 5 adet kalibratör gen (house keeping) primerlerini içeren, ticari olarak yara paneli adı verdiğimiz plate kullanılmıştır. Alınan yara biyopsi örneklerinden toplam RNA izolasyonu tüm örnekler için başarılı bir şekilde yapıldı ve mRNA hedefli cDNA elde edildi. 260 nm de beklenen ve görülen pik seviyesi izole edilen toplam RNA lara ait eğrilerden birini göstermektedir (Şekil 4.5). Tüm örnekler için toplam RNA izolasyonu verileri ekler kısmında (Ek A) yer almaktadır.



Şekil 4.5: Toplam RNA izolasyonuna ait spektrometrik ölçümde absorpsiyon eğrisi (260 nm).

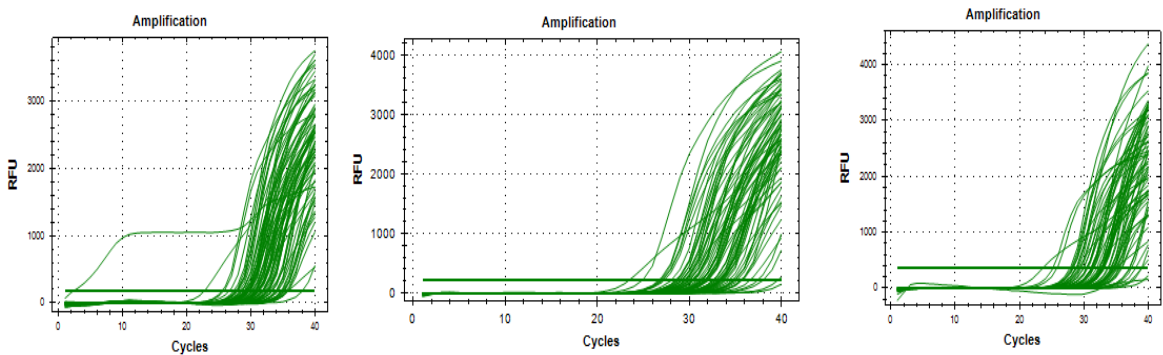
Elde edilen cDNA'ların varlığı ile housekeeping gen olan GAPDH primerleri kullanılarak yapılan kontrol gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) ile doğrulanmıştır (Şekil 4.6). Yapılan kontrol RT-PCR ile elde edilen veriler değerlendirildi. Aynı grupta bulunan ve aynı gün biyosileri alınan hayvanlara ait cDNA' lar bir havuzda 3000 ng / 60 µl olacak şekilde havuzlar hazırlandı ve toplam 13 cDNA havuzu ile RT-PCR yapıldı. RT-PCR sonucunda elde edilen CT değerleri ekler kısmında (Ek B) yer almaktadır.



Şekil 4.6: cDNA' lar ile yapılan kontrol RT-PCR'ına ait amplifikasyon eğrisi.

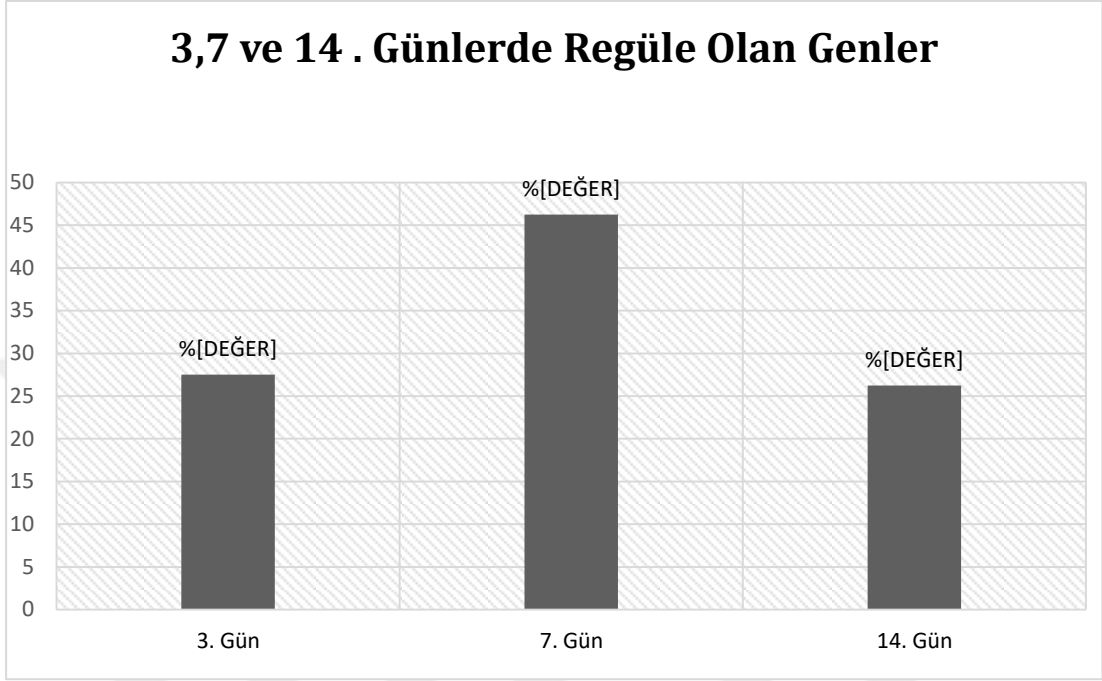
Yara panelinde yer alan genlerden bazıları yara iyileşmesinin erken evrelerinde (3. gün) bazıları orta evrelerinde (7. gün), bazıları son evrelerinde (14. gün), bazıları ise birden fazla evrede regülasyona uğramıştır.

Bütün cDNA havuzlarının RT-PCR ları yapıldıktan sonra elde edilen veriler Livak ve Schmittgen'in (2008) tanımladığı şekilde $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak değerlendirildi [90]. Biyopsi günleri baz alınarak yapılan değerlendirmelere ait bulgular yara iyileşmesinin erken (3.gün), orta (7.gün) ve geç (14.gün) evreleri olmak üzere analiz edildi (Şekil 4.7)



Şekil 4.7: RT-PCR'ı yapılan 2., 7. ve 11. cDNA havuzlarına ait amplifikasyon eğrilerine örnek.

3. 7. ve 14. günlerde belirli oranlarda ($\Delta\Delta CT \geq 8$ ve $\Delta\Delta CT \leq -8$) regülasyon gösteren gen sayıları sırasıyla 22, 37 ve 21 olup, en fazla gen regülasyonu orta evrede görülmektedir. Erken ve geç evreleri regüle olan gen sayısı bakımından birbirine çok yakındır (Şekil 4.8).



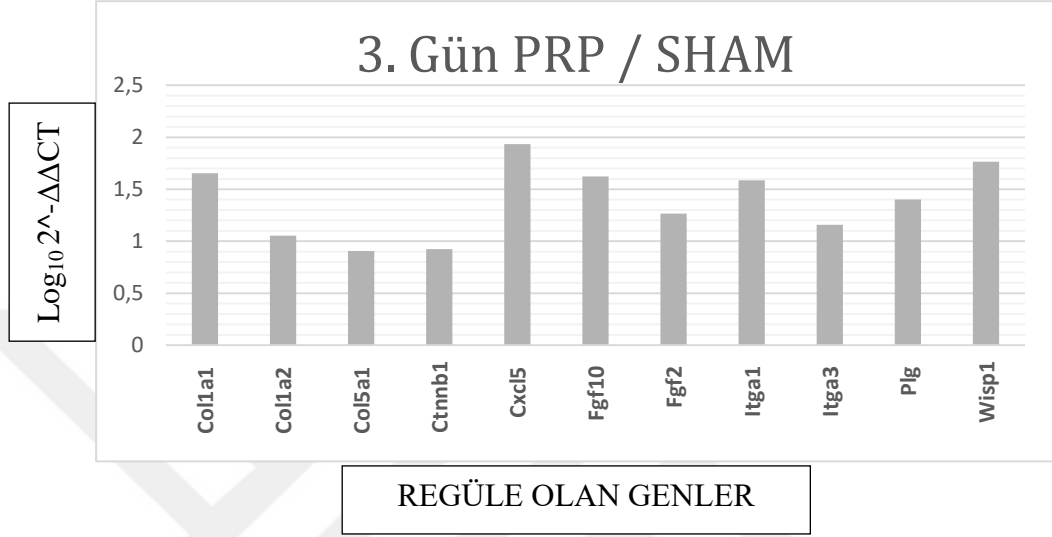
Şekil 4.8: Biyopsi günlerinde görülen moleküler gen regülasyonlarının yüzdelikleri.

Çalışmamızda bulunan 3 tedavi (PRP, Lipid fraksiyonu, DMSO) ve 1 kontrol (SHAM) grubu için kendi aralarında 6 farklı karşılaştırma parametresi oluşturuldu. Parametreler tedavi solüsyonlarının kontrol grubuna ve birbirlerine kıyasla moleküler olarak nasıl regülasyon yaptıklarını tespit edebilme ve anlamlı çıkarımlarda bulunabilme amacıyla belirlendi. Oluşturulan değerlendirme parametrelerine ait eğriler 3. 7. ve 14. güne ait moleküler bulgular kısımlarında gösterilmiştir.

4.2.1 Yara iyileşmesinin erken (3. gün) evresine ait moleküler bulgular

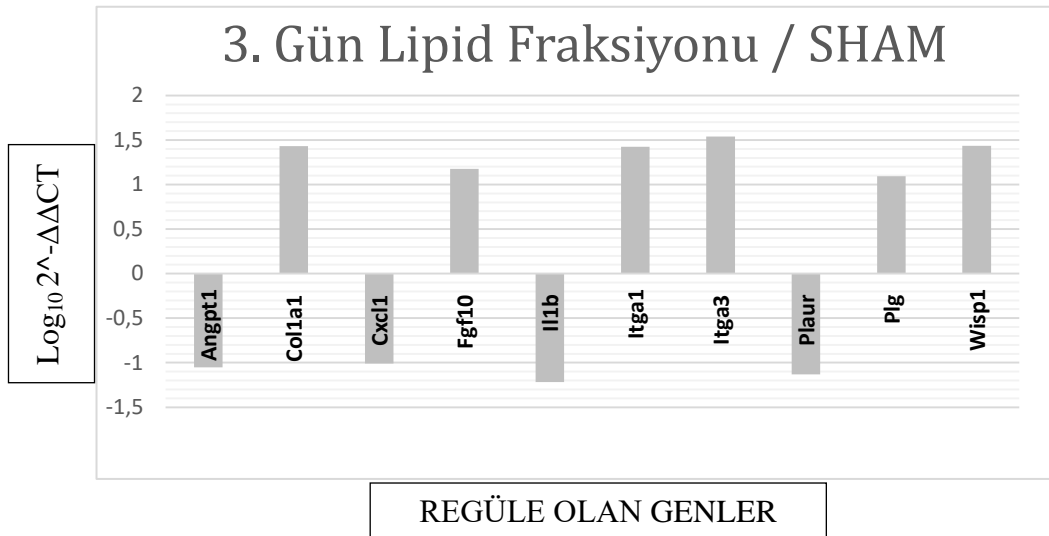
3. güne ait moleküler bulgular oluşturulan parametreler ışığında değerlendirildi ve elde edilen veriler grafikler ile gösterilmiştir. Tüm kat değişimleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 8 kat ve üzeri / -8 kat ve üzeri olanlar dikkate alınarak grafikler oluşturulmuştur. Bu değerlerin dışındaki kat değişimleri elenmiştir.

PRP tedavi grubunda 3. güne ait kat değişimlerine bakıldığında SHAM grubuna oranla Col1a1, Col1a2, Col5a1, Ctnnb1, Cxcl5, Fgf10, Fgf2, Itga1, Itga3, Plg ve Wisp1 genlerinin ekspresyonunda artış meydana gelmiştir. Bu genler ekstrasellüler matriks, sitokinler ve büyüme faktörleri mekanizmalarını etkileyen genlerdir (Şekil 4.9).



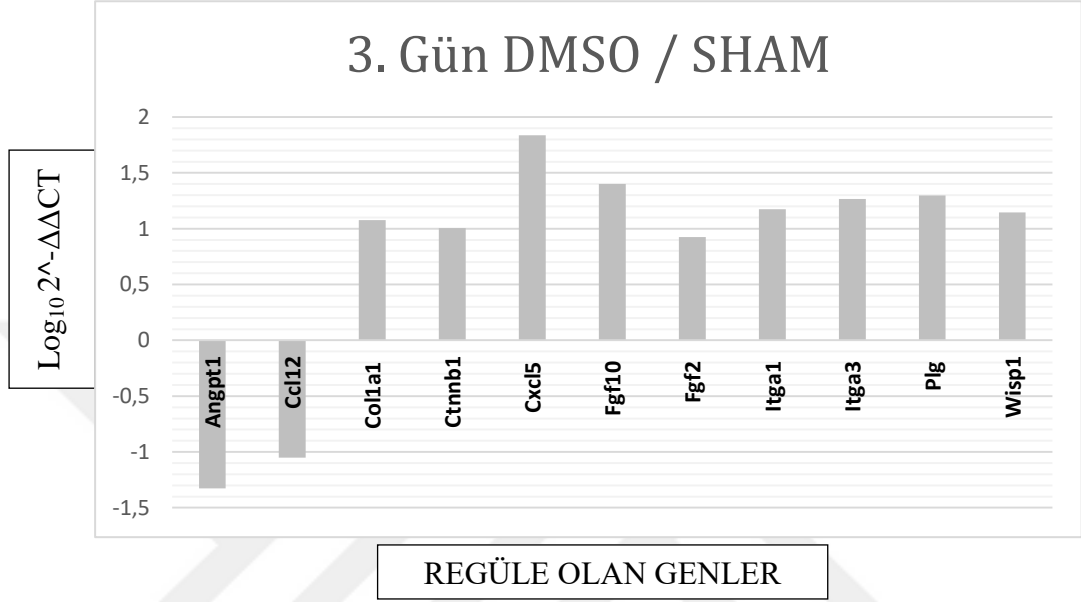
Şekil 4.9: 3. Gün PRP tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği.

Lipid fraksiyonu tedavi grubunda 3. güne ait veriler SHAM grubuna göre değerlendirildiğinde Col1a1, Fgf10, Itga1, Itga3, Plg ve Wisp1 genlerinde artış görülürken Angpt1, Cxcl1, Il1b ve Plaur genlerinde ise azalış görülmektedir (Şekil 4.10).



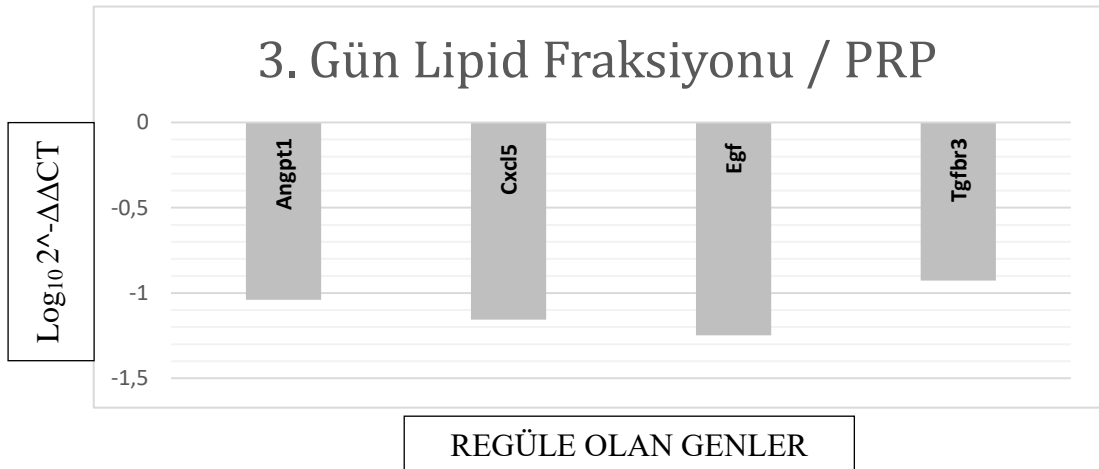
Şekil 4.10: 3. Gün LF tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği.

DMSO tedavi grubundaki 3. Güne ait gen değişimleri incelendiğinde SHAM grubuna oranla *Col1a1*, *Ctnnb1*, *Cxcl5*, *Fgf10*, *Fgf2*, *Itga1*, *Itga3*, *Plg* ve *Wisp1* genlerinde artış görülürken *Angpt1* ve *Ccl12* tanesinde azalış görülmektedir (Şekil 4.11).



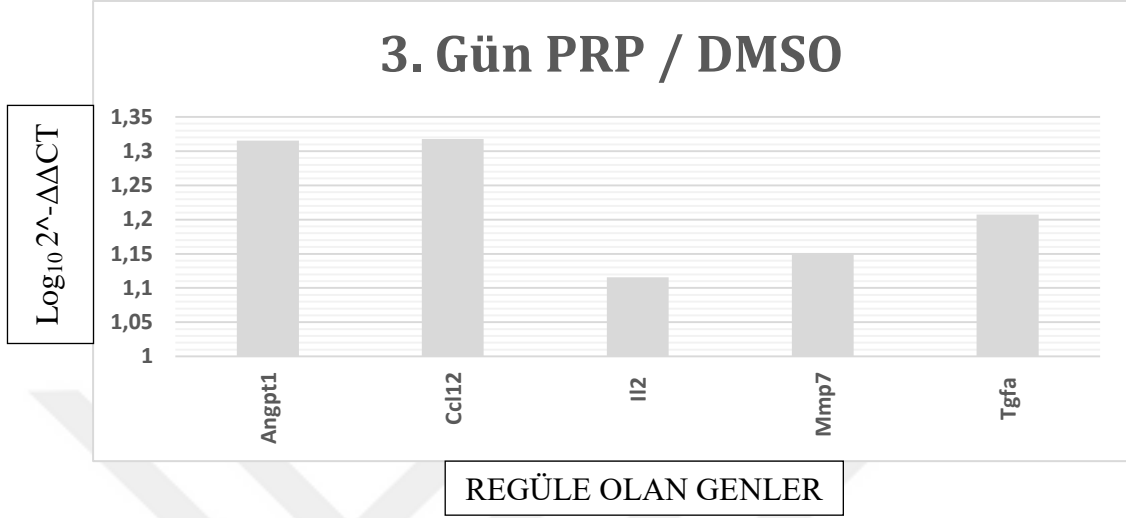
Şekil 4.11: 3. Gün DMSO tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği.

3. günde lipid fraksiyonu tedavi grubunda PRP grubuna göre *Angpt1*, *Cxcl5*, *Egf* ve *Tgfbr3* genlerinde azalış görülmektedir. Bu genler büyüme faktörleri ve sitokin mekanizmalarına ilişkin genlerdir (Şekil 4.12).



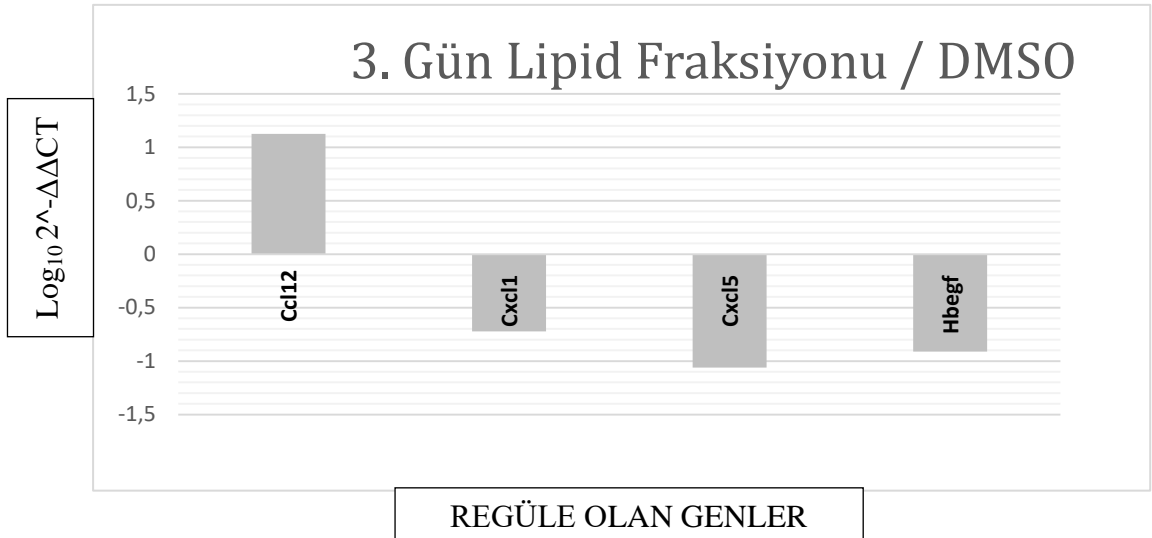
Şekil 4.12: 3. Güne ait LF tedavi grubunda PRP grubuna göre gen regülasyon grafiği.

3. gün PRP grubunda Angpt1, Ccl12, Il2, Mmp7 ve Tgfa genlerinde DMSO tedavi grubuna göre artış meydana gelmiştir. PRP tedavisi yara iyileşmesinde görev alan büyüme faktörleri, sitokinler ve matriks metalloproteinaz mekanizmalarına ait bu genlerin ekspresyonunu arttırmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: 3. Gün PRP tedavi grubunun DMSO grubuna göre gen regülasyon grafiği

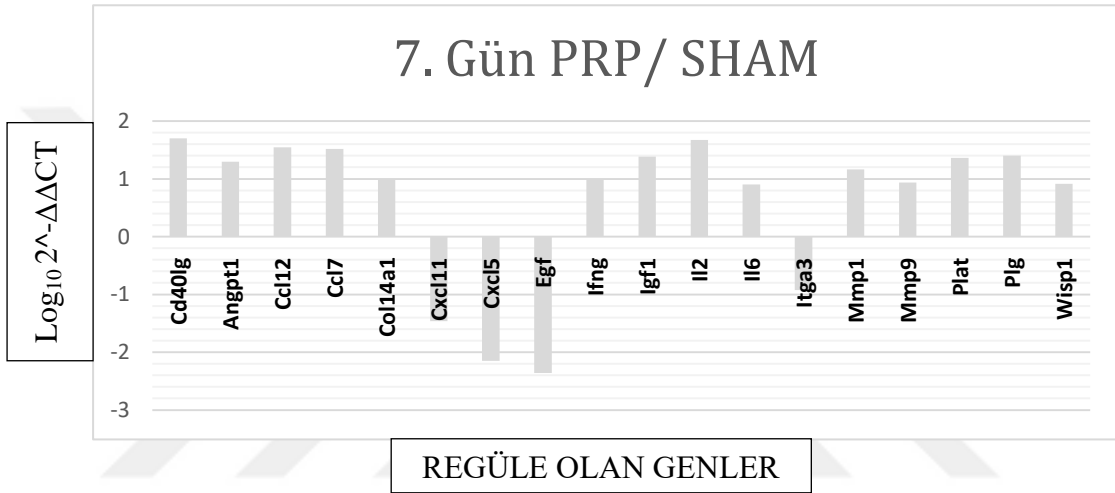
3. gün lipid fraksiyonu tedavi grubunda DMSO grubuna oranla Ccl12 geninde artış meydana gelirken; Cxcl, Cxcl5 ve Hbegf genlerinde ise azalış görülmektedir. Bu genler büyüme faktörleri ve sitokinlerin moleküler mekanizmalarında görev alır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: 3. Gün LF tedavi grubunun DMSO grubuna göre gen regülasyon grafiği.

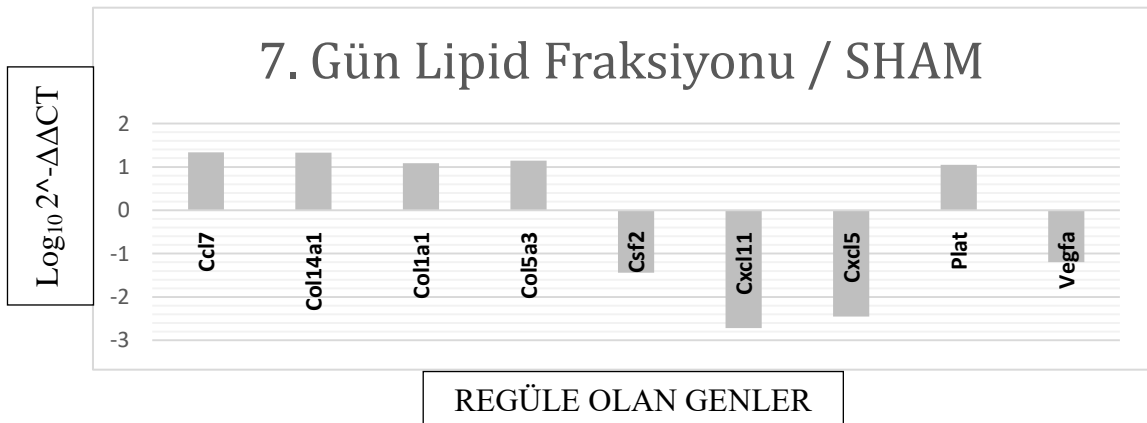
4.2.2 Yara iyileşmesinin orta (7. gün) evresine ait moleküler bulgular

Yara iyileşmesinin orta evresi olan 7. günde diğer evrelere oranla daha fazla gen regülasyonu tespit edilmiştir. RT-PCR sonucunda elde edilen veriler ile kat değişimleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 8 kat ve üzeri / -8 kat ve üzeri olan genler dikkate alınarak parametrelere ait grafikler oluşturulmuştur. 7. Gün PRP grubundaki yara bölgesinde SHAM grubuna oranlar Cd40lg, Angpt1, Ccl12, Ccl7, Col14a1, Ifng, Igf1, Il2, Il6, Mmp1, Mmp9, Plat, Plg ve Wisp1 genlerinde artış görülürken; Cxcl11, Cxcl5, Egf ve Itga3 genlerinde azalış görülmektedir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: 7. Gün PRP tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği.

Lipid fraksiyonu tedavisiyle SHAM (kontrol) grubuna oranla Ccl7, Col14a1, Col1a1, Col5a3 ve Plat genlerinde artış görülürken; Csf2, Cxcl11, Cxcl5 ve Vegfa genlerinde ise azalış görülmektedir (Şekil 4.16).



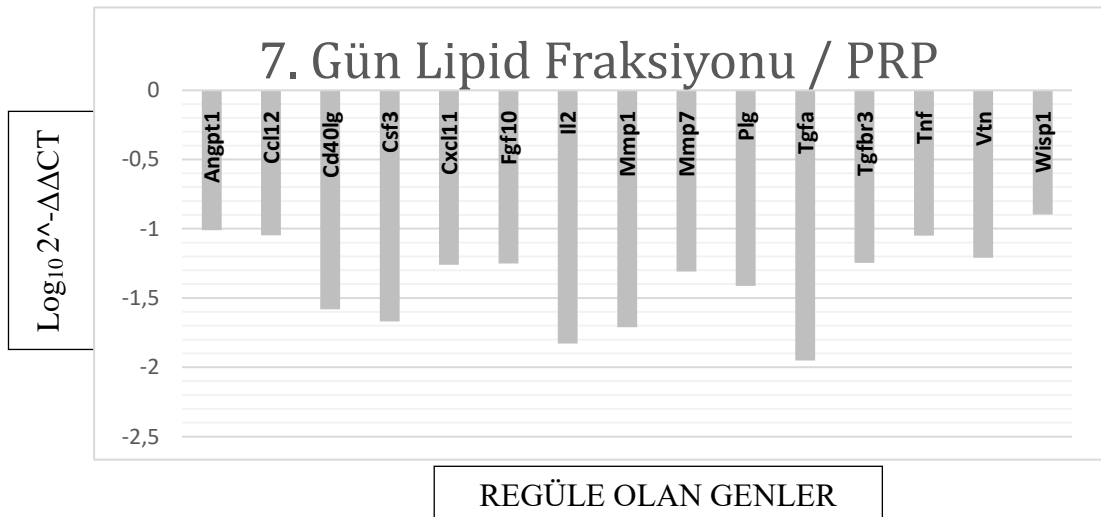
Şekil 4.16: 7. Gün LF tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği.

DMSO tedavisi uygulanan gruplarda SHAM grubuna oranla Col14a1, Ifng, Cxcl3 ve Timp1 genlerinde artış gözlemlenirken; Col1a1, Plat, Cxcl1, Vtn, Csf2, Cxcl5 ve Cxcl11 genlerinde azalış görülmektedir (Şekil 4.17).



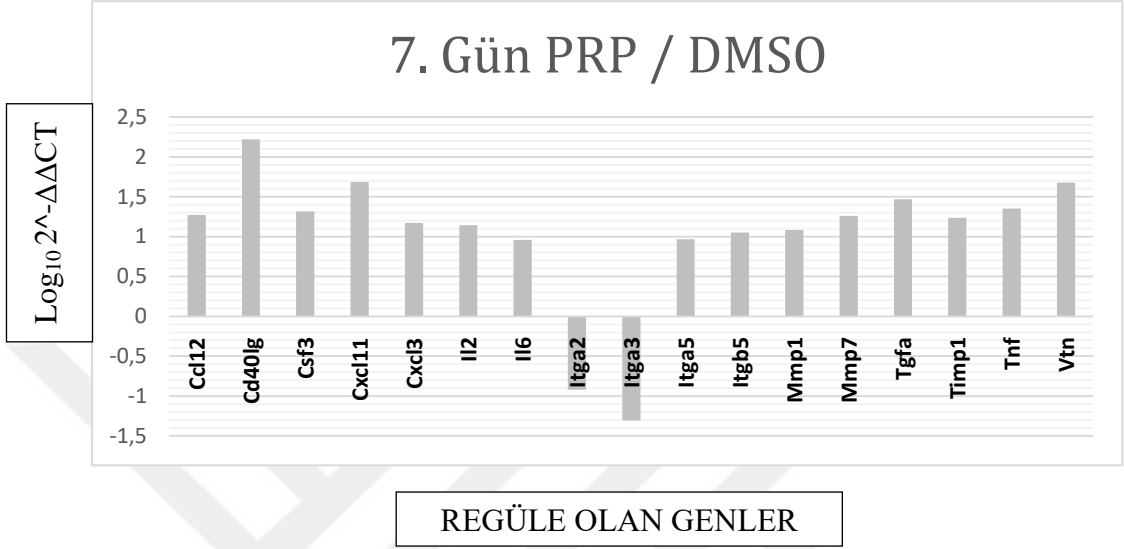
Şekil 4.17: 7. Gün DMSO tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği.

7. gün lipid fraksiyonu ve PRP tedavi grupları arasında yapılan bir değerlendirme olup lipid fraksiyonu grubunda PRP grubuna oranla Angpt1, Ccl12, Csf3, Cxcl11, Fgf10, Il2, Mmp1, Mmp7, Plg, Tgfa, Tgfbr3, Tnf, Vtn ve Wisp1 genlerinde azalış görülmektedir (Şekil 4.18).



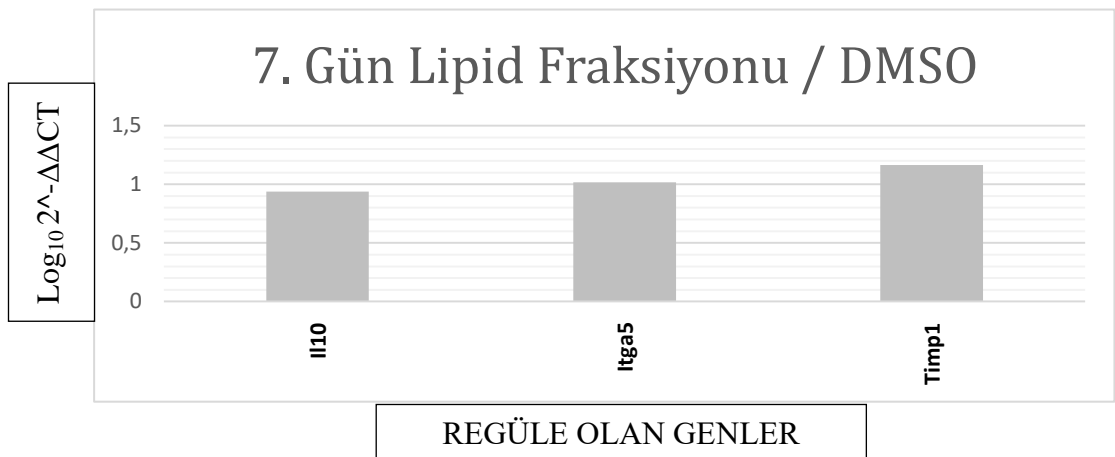
Şekil 4.18: 7. Gün LF tedavi grubunun PRP grubuna göre gen regülasyon grafiği.

7. günde PRP tedavi grubunda DMSO grubuna oranla Ccl12, Cd40lg, Csf3, Cxcl11, Cxcl3, Il2, Il6, Itga5 Itgb5, Mmp1, Mmp7, Tgfa, Timp1, Tnf ve Vtn genlerinde artış görülürken Itga2 ve Itga3 genlerinde azalış olmuştur (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: 7. Gün PRP grubunun DMSO grubuna göre gen regülasyon grafiği.

7. günde lipid fraksiyonu tedavi grubunda DMSO' ya oranla Il10, Itga5 ve Timp1 genlerinde artış görülmüştür (Şekil 4.20).

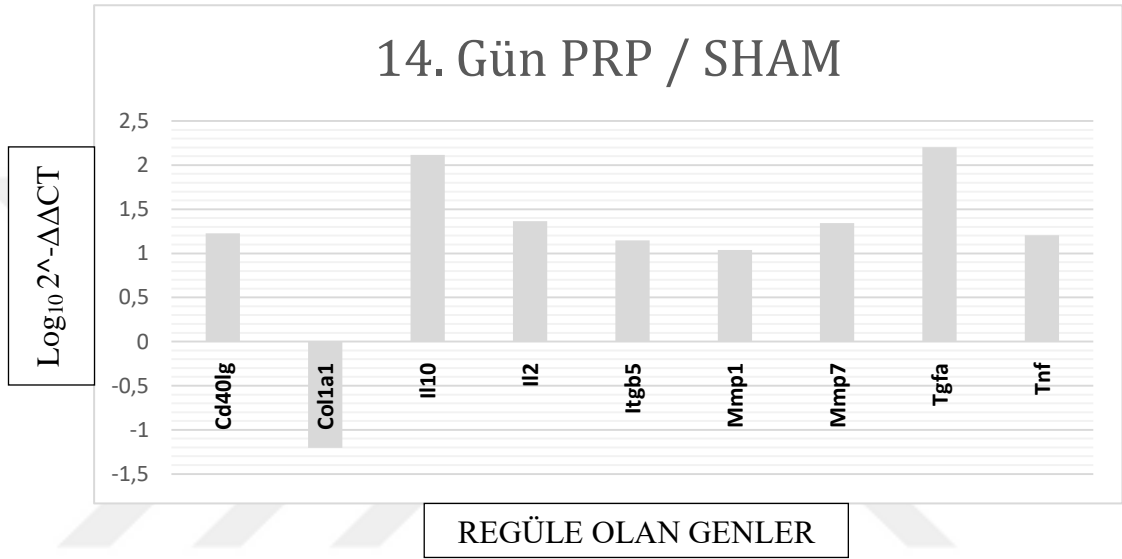


Şekil 4.20: 7. Gün LF tedavi grubunun DMSO grubuna göre gen regülasyon grafiği.

4.2.3 Yara iyileşmesinin geç (14. gün) evresine ait moleküler bulgular

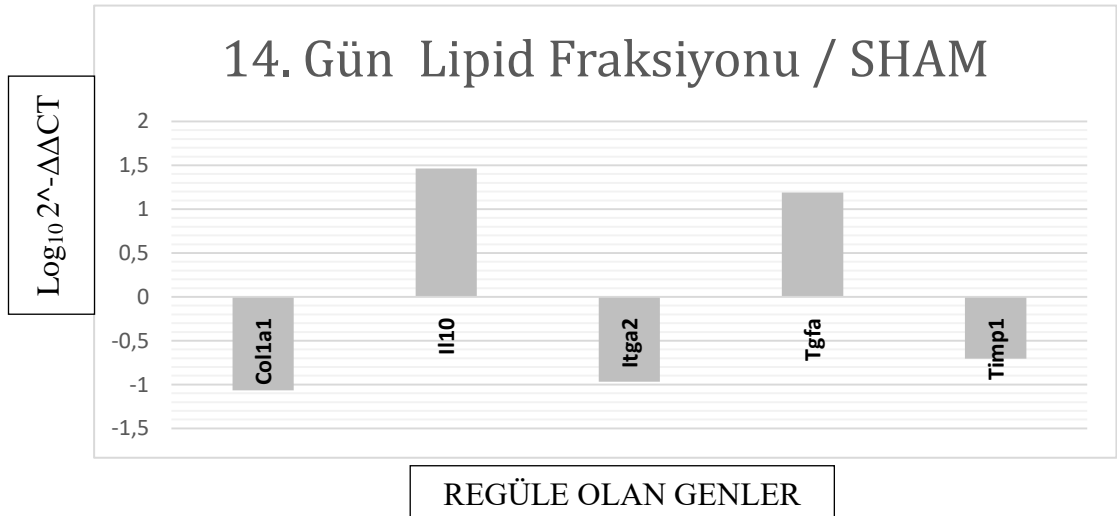
Yara iyileşmesinin son evresi olan 14. Güne ait veriler değerlendirilirken kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 8 kat ve üzeri / -8 kat ve üzeri olanlar dikkate alınmıştır. 3. ve 7. günlerde incelenen parametreler ile analiz edildi ve grafikler oluşturuldu.

14. gün PRP grubunda SHAM grubuna oranla Cd40lg, Il10, Il2, Itgb5, Mmp1, Mmp7, Tgfa ve Tnf genlerinde artış görülürken; Col1a1 geninde azalış görülmektedir (Şekil 4.21).



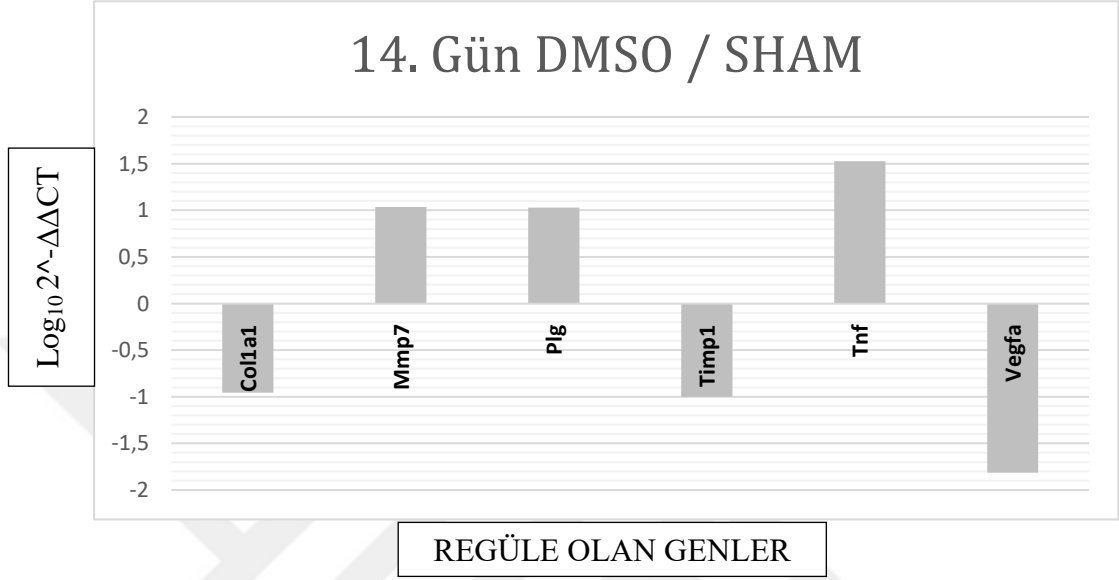
Şekil 4.21: 14. Gün PRP tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyonu.

14. günde lipid fraksiyonu grubunda SHAM grubuna oranla Il10 ve Tgfa genlerinde artış, Col1a1, Itga2 ve Timp 1 genlerinde ise azalış görülmektedir (Şekil 4.22).



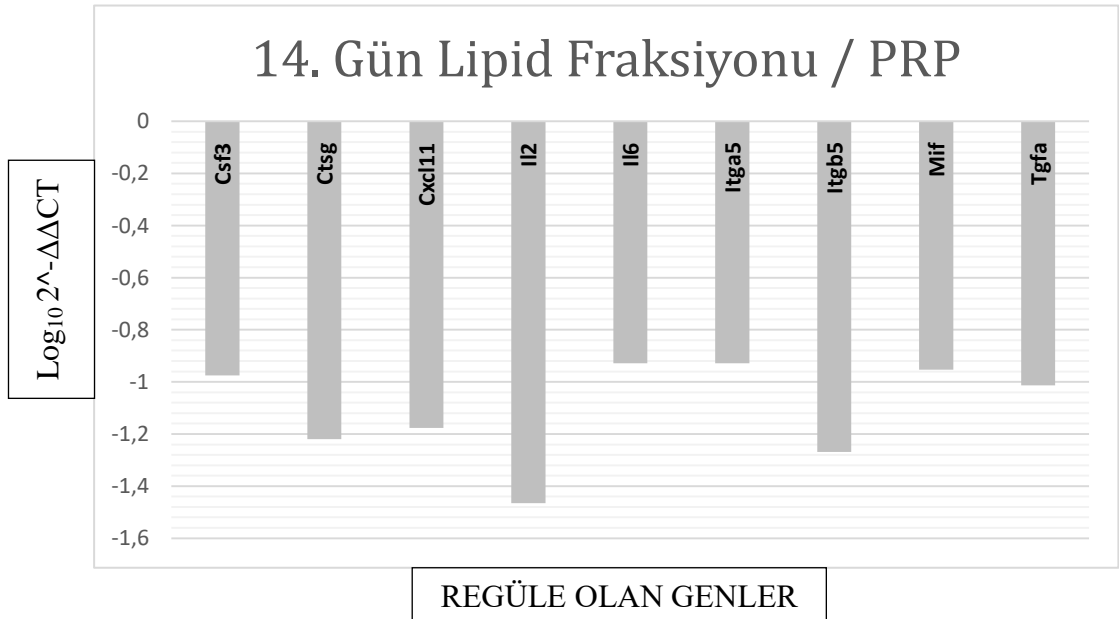
Şekil 4.22: 14. Günde LF tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği.

14. günde DMSO grubunda SHAM (kontrol) grubuna oranla Mmp7, Plg ve Tnf genlerinde artış görülürken; Col1a1, Timp1 ve Vegfa genlerinde ise azalış görülmektedir (Şekil 4.23).



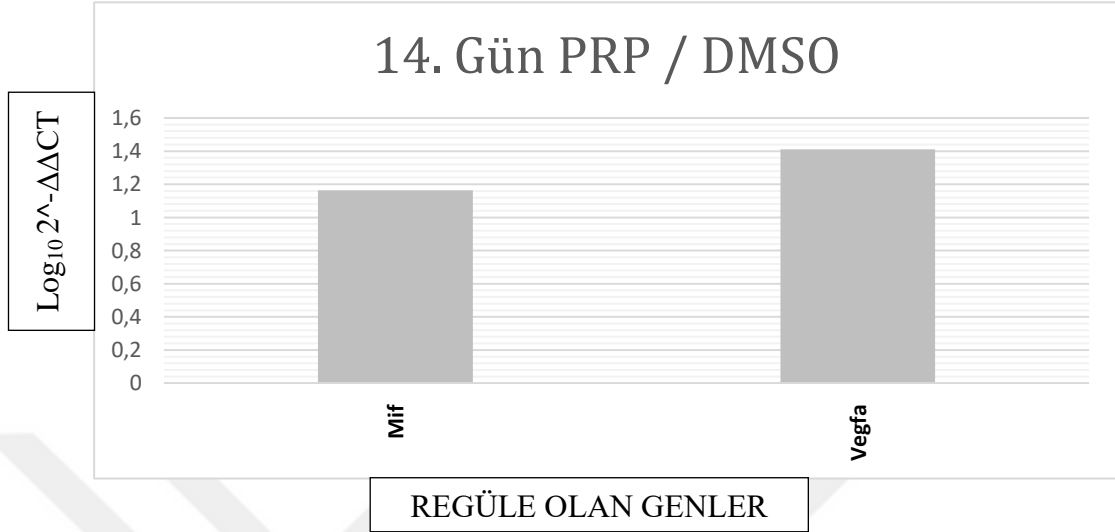
Şekil 4.23: 14. Gün DMSO tedavi grubunun SHAM grubuna göre gen regülasyon grafiği.

14. gün lipid fraksiyonu tedavisi uygulanan grupta PRP uygulanan gruba oranla Csf3, Ctsg, Cxcl11, Il2, Il6, Itga4, Itgab5, Mif ve Tgfa genlerinde azalış görülmektedir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24: 14. Gün LF tedavi grubunun PRP grubuna göre gen regülasyon grafiği.

14. günde PRP tedavi grubunda DMSO grubuna oranla Mif ve Vegfa genlerinde artış görülmüştür. Büyüme faktörleri genleri olup yara kapanmasıyla ilişkili genlerdir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25: 14. Gün PRP tedavi grubunun DMSO grubuna göre gen regülasyon grafiği.

14. gün lipid fraksiyonu uygulanan grupta DMSO uygulanan gruba kıyasla Vegfa geninde artış gözlenirken; Cdh1, Il2, Itga2 ve Plau genlerinde azalış görülmektedir (Şekil 4.26).

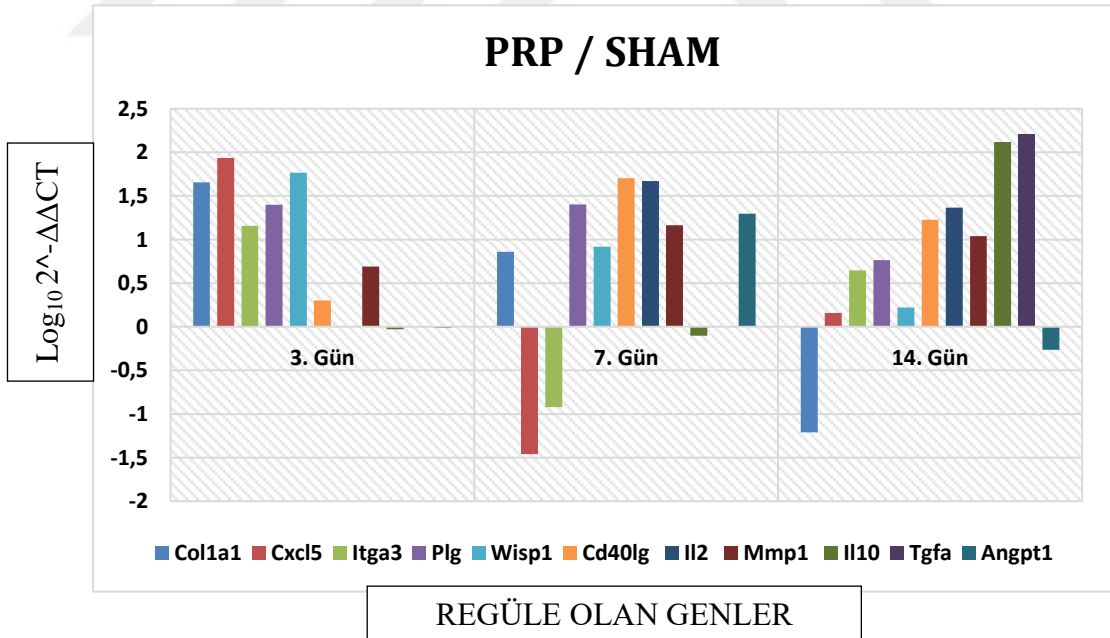


Şekil 4.26: 14. Gün LF tedavi grubunun DMSO grubuna göre gen regülasyon grafiği.

Geç evre olarak nitelendirilen 14. gün yara kapanması ve yeniden şekillenmesi mekanizmalarını kapsar ve 7. Güne kıyasla daha az sayıda gende regülasyon gözlenir. Gruplarda birbirine yakın sonuçlar vermektedir çünkü tüm yaralar kapanma evresinde olup yara bölgelerinde birbirlerine benzer düzenlemeler görülür.

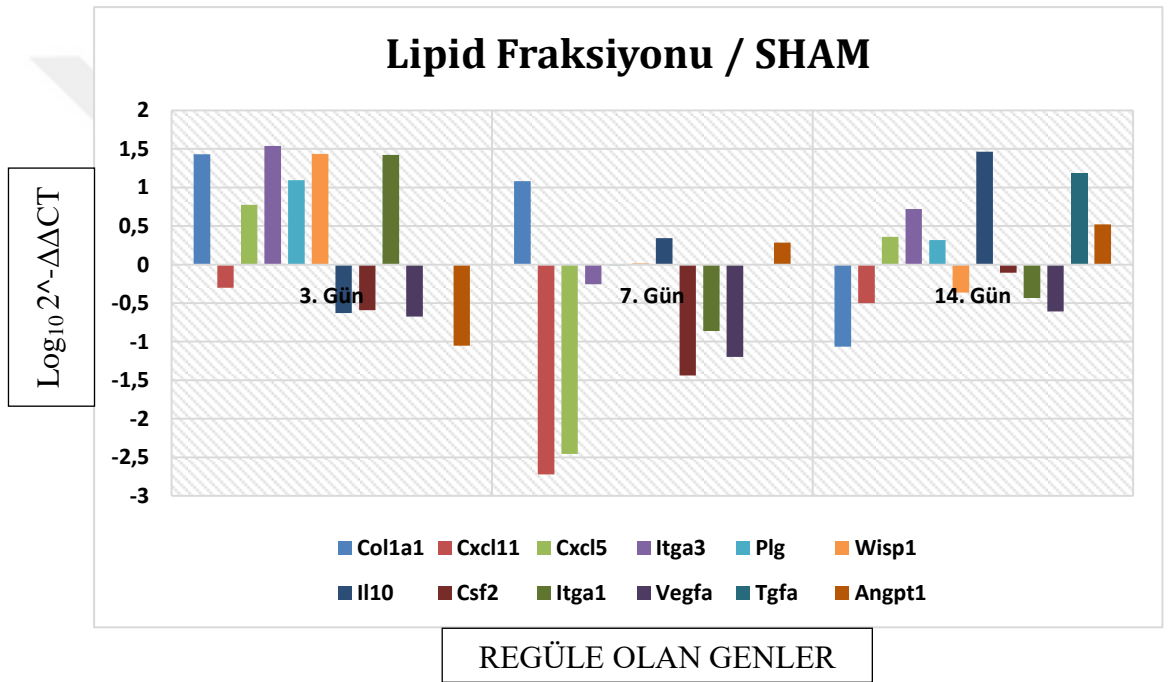
4.2.4 PRP ve LF tedavi gruplarına özgü bulgular

Çalışmamızda PRP ve PRP'den elde edilen lipid fraksiyonu tedavi gruplarına ait moleküler sonuçlar incelendiğinde 3., 7. ve 14. günlerinde Col1a1 (Kollejen, Tip I, alfa1), Cxcl5 (Kemokin (C-X-C motif) ligand 5), Itga3 (İntegrin alfa 3), Plg (Plasminojen), Wisp1 (WNT1 uyarılabilen sinyal yolak proteini 1), Il10 (İnterlökin 10), Tgfa (Transforming büyüme faktörü alfa) ve Angpt1 (Anjiyopoetin 1) genlerinde benzer regülasyon eğrileri görülmektedir. Bu genler yara iyileşmesinde etkin rol alan ekstraselüler matriks, hücre adhezyonu, sitokinler ve büyüme faktörleri mekanizmaları ile ilişkilidir. Col1a1 (Kollejen tip I, alfa 1) , Cxcl5 (Kemokin (C-X-C motif) ligand 5), Itga3 (İntegrin alfa 3), Plg (Plasminojen), Wisp1(WNT1 uyarılabilen sinyal yolak proteini 1) , Cd40lg (CD40 ligand), Il2 (İnterlökin 2), Mmp1 (Matriks metallopeptidaz 1), Il10 (İnterlökin 10), Tgfa (Transforming büyüme faktörü alfa) ve Angpt1 (Anjiyopoetin 1) genlerinin yara iyileşmesinin erken, orta ve geç evrelerinde ki regülasyonu gösterilmektedir. Yara iyileşmesinin son evresinde Il10 ve Tgfa genleri ciddi artış göstermiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27: 3. 7. ve 14. günlerde PRP tedavi grubunun SHAM grubuna oranla bazı genlerdeki regülasyon grafiği.

Lipid fraksiyonu grubunda SHAM grubuna göre Col1a1 (Kollejen, Tip I, alfa1), Cxcl11 (Kemokin (C-X-C motif) ligand 11), Cxcl5 (Kemokin (C-X-C motif) ligand 5), Itga3 (Integrin, alfa 3), Plg (Plasminojen), Wisp1 (WNT1 uyarılabilen sinyal yolak proteini 1), Il10 (İnterlökin 10), Csf2 (Koloni uyarıcı faktör 2 (granülosit/makrofaj)), Itga1 (İntegrin alfa 1), Vegfa (Vasküler endothelyal büyüme faktörü A), Tgfa (Transforming büyüme faktörü alfa) ve Angpt1 (Anjiyopoetin 1) genlerinde meydana gelen regülasyon değişimleri gösterilmektedir. Yara iyileşmesinin orta evresinde Cxcl5 ve Cxcl11 genlerinde ciddi miktarda azalış görülmüştür (Şekil 4.28).



Şekil 4.28: 3. 7. ve 14. günlerde LF tedavi grubunun SHAM grubuna oranla bazı genlerdeki regülasyon grafiği.

5.TARTIŞMA

Yara iyileşmesi bir dizi moleküler seviyede hücresel ve biyokimsal olayların muntazam bir şekilde biyolojik makina gibi işlediği, insanlar ve çoğu hayvanların yaşamları boyunca gerçekleşen en kompleks biyolojik süreçlerden biridir. Hasar gören dokunun tamirinin kalitesi, en az yara izi oluşumu, acı hissini azaltılması ve iyileşmenin hızlandırılması gibi amaçlarla yapılan çalışmalar yara iyileşmesi tedavilerine alternatif tedavi yöntemleri kazandırmayı hedeflemektedir.

Yara iyileşmesinin yaraya sebep olan travmadan hemen sonra başlayan evreleri inflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma olup bu süreçler birbirleri içine geçerek moleküler anlamda karmaşık ancak düzenli bir yara tamiri gerçekleştirirler. Doğal olarak gelişen yara iyileşmesine destek olmak amacıyla dışardan uygulanan tedaviler arasında bulunan büyüme faktörlerinin yara iyileşmesine olan olumlu katkısı bilinmektedir. Kemotaksis, hücre proliferasyonu ve iyileşmeye özgü proteinlerin üretiminin uyarılması gibi etkilerinin yanında ECM sentezinin yapımı, planlı hücre ölümü ve matriks değişimlerine karar verici rolleri-de bulunmaktadır. Proliferasyon evresinde hızlı ve dramatik şekilde gerçekleşen hücresel aktivitenin amplifikasyonu büyüme faktörlerinin salındıkları hücreleri uyarmasıyla gerçekleşir [91]. Bu sebeple özellikle iyileşmeyen kronik yaralarda büyüme faktörleri uygulanması tedavisi ön plana çıkmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda trombosit bakımından zengin olan PRP de bulunan büyüme faktörlerinin α - granüller tarafından salınmasıyla birlikte yara üzerindeki iyileştirici etkisi tespit edilmiştir [50 ,52].

PRP tedavisi ile ilgili çok çeşitli alanlarda çalışmalar yapılmış olup dermatoloji, diş hekimliği ve ortopedi gibi tıbbi alanlarda kullanımı yaygınlaşmıştır. Hayvanlarda oluşturulan deneysel modeller üzerinde yapılan çalışmalar ile yara iyileşmesinin makroskopik ve moleküler düzeydeki gerçekleşen olaylar incelenmektedir. PRP ve içeriğinin anlaşılması, büyüme faktörlerinin moleküler mekanizmalarının anlaşılması amacıyla yapılan çalışmalar PRP tedavisinin klinik uygulamalardaki kullanımına dair yeni fikirler ortaya çıkarmaktadır.

Çalışmamız PRP'nin içeriğinde bulunan lipid fraksiyonunu PRP ile karşılaştırmak amacıyla yapılmış olup kısa vadede hedefi literatüre bu konuda yeni bilgiler katmak iken, uzun vadede hedefi ise PRP nin klinikteki kullanımına kolaylık ve yenilik getirmektir. Bu konuda 2016 yılında yapılan *in vitro* bir çalışmada PRP'nin bileşenlerinden protein yapılı olanların yara bölgesindeki proteaz aktivitesinden dolayı parçalandığı ancak lipid porsiyonunun iyileştirici etkiyi sürdürdüğü öne sürülmüştür [7]. Çalışmamız ise aynı hipotezi *in vivo* olarak test etmek üzere yapılmış olup orijinalliğini bu noktadan almaktadır. Çalışmamızın sonucunda yapılan makroskopik hesaplamalardan ve moleküler analizlerden elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

Yaralanma ve biyopsi alım günlerinde kaydedilen yara alanlarına ait veriler ile yara kontraksiyonu yüzdeliği literatürde yer alan formül yardımıyla hesaplanmış ve 3., 7. ve 14. gün bazında yara iyileşmesi aşamaları karşılaştırılmıştır [88].

Hesaplanan yara kontraksiyonu yüzdelikleri ile elde edilen bulgular incelendiğinde 3. günde PRP ve lipid fraksiyonu grubunda SHAM grubuna göre anlamlı bir fark ile birlikte DMSO ve lipid fraksiyonu arasında da anlamlı farklılık görülmektedir. Yara iyileşmesinin inflamasyon aşaması olan 3. günde yaralarda kızarıklık ve hafif kabuklanma izlenmiştir. Lipid fraksiyonu grubundaki tüm yaralarda 0.-3. gün aralığında alansal olarak artış olmuştur. Yara bölgesinde yaralanmadan sonraki 72 saat boyunca devam eden gerilme, yara alanında artışa sebep olabilmektedir [18]. Söz konusu gerilme bütün gruplar için geçerlidir ancak lipid fraksiyonu grubunda yara alanında artış diğer gruplara oranla daha fazla gözlenmiştir. Bu sebeple yara kapanması en azdır.

Yara iyileşmesinin proliferasyon evresi olan 7. güne ait makroskopik bulgular incelendiğinde ise SHAM grubu ile karşılaştırıldığında sadece PRP tedavi grubu anlamlı bir fark göstermiştir. Bu aşamada gerçekleşen yoğun hücre göçü ile meydana gelen iyileşme belirtileri ve yaranın küçülmesi, en fazla PRP tedavi grubunda gözlenmiştir. İyileşmenin habercisi olan kabuklanma durumu incelendiğinde ise diğer gruplara oranla lipid fraksiyonunda daha fazla kabuk oluşumu izlenmiştir.

Yara iyileşmesinin son evresi olan 14. güne ait sonuçlar incelendiğinde, hiçbir tedavi grubunda SHAM grubuna göre anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Çünkü yara iyileşmesinin son aşaması olan maturasyonda tüm gruplarda yaralar tamamen

kapanmaya başlamıştır bu sebeple benzer sonuçlar elde edilmiştir. İlk 3 gün yara alanındaki genişlemeye rağmen yara kontraksiyon yüzdeleri karşılaştırıldığında lipid fraksiyonu grubuna ait yaralar 14. gün SHAM grubundan daha fazla kapanma göstermiştir. PRP grubu yaraları ise % 96 oranında kapanarak makroskopik anlamda en iyi sonucu vermiştir.

PRP'den elde edilen yağ asitleri DMSO içerisinde çözündürülmesi sebebiyle DMSO tedavi grubu lipid fraksiyonu grubuna kontrol olması amacıyla gruplara eklenmiştir. Literatür bilgisi incelendiğinde belirli oranlarda çözdürücü olarak kullanılan DMSO zararlı etkiye sahip olmayıp SHAM ile benzer sonuçları verdiği ve hatta SHAM grubu gibi kontrol grubu olarak çalışıldığı tespit edilmiştir [92 ,93]. Makroskopik anlamda ise DMSO, 3. gün SHAM grubuna göre anlamlı görülmektedir. Sebebi ise yara bölgesini nemli tutarak iyileşmeye yardımcı olmasıdır.

Lipid fraksiyonu tedavisinin içeriği ve fonksiyonu açısından makroskopik anlamda PRP tedavi grubuna yakın iyileştirici etkiye sahip olması beklenmiştir ancak yara iyileşmesinin erken ve orta evrelerinde bu etki gözlenememiştir. Bunun sebebi ise yaralanmadan sonraki ilk alanların hayvandan hayvana çok az dahi de olsa değişmesi ve gerilme kuvvetinin lipid fraksiyonu grubunda daha fazla olmasıdır.

Sonuç olarak çalışmamızda makroskopik anlamda PRP yara iyileşmesinin ilk ve orta evresinde yara kapanması ve yara izi oluşumu ile ilgili en fazla iyileştirici etkiye sahip olduğu görülmüştür. Lipid fraksiyonu ile tedavi grubu ise PRP kadar etkili olmamıştır fakat kontrol grubundan daha hızlı bir kapanma göstermiştir.

Herhangi bir biyolojik yolağın mRNA profilinin incelenmesi o süreçte biyogenezi yapılan proteinler hakkında bizlere bilgi vermektedir. Yara iyileşmesiyle ilgili bilinen 100 den fazla gen ifadesine bağlı protein bulunmakla birlikte çalışmamızda bu genlerden 84 tanesinin ekspresyonlarında 3., 7. ve 14. gün meydana gelen moleküler düzenlemeler incelenmiştir. Realtime PCR'da 3 CT'ye denk gelen sekiz kat ve üzeri farklı ekspresyonlar dikkate alınarak genlerin kat değişimleri analiz edilmiştir.

Ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişikliğe uğrayan genler sayı bakımında değerlendirildiğinde % 46,25'i (37 tanesi) yara iyileşmesinin orta evresi olan 3. günde meydana gelmiştir. Hücre göçü, hücre proliferasyonu, fibroblazia, granülasyon dokusunun oluşması ve anjiyogenezis gibi biyolojik süreçlerden dolayı

en fazla sayıda gen ekspresyonu bu evrede gerçekleşmiştir. En az sayıda gen regülasyonu ise yara iyileşmesinin neredeyse tamamlanmasından ötürü son evre olan 14. günde meydana gelmiştir.

Yara iyileşmesinin inflamasyon evresine denk gelen 3. güne ait moleküler bulgular incelendiğinde PRP, lipid fraksiyonu ve DMSO grubunda SHAM grubuna göre karşılaştırılmasında 6 ortakgenin ekspresyonunda artış görülmektedir. Gruplardaki kat değişimleri incelendiğinde bu genlerde en fazla artış PRP, lipid fraksiyonu ve DMSO sırasıyla olmuştur. Bu genler kollejen tip 1 alfa1, fibroblast büyüme faktörü 10, integrin alfa1, integrin alfa 3, plazminojen ve WNT1 uyarabilen sinyal yolak proteini 1 genleridir. Yaralanmanın ardından başlayan inflamasyon evresinde aktifleşen bu genlerin her biri, yara iyileşmesi sürecinde oldukça önemlidir. Col1a1, kollejen tip 1 alfa1, hasar gören ekstraselular matriksin tamiri açısından önemli olup inflamasyon evresinde tüm gruplarda ekspresyonunda artış görülmüştür [94]. Fgf10, fibroblast büyüme faktörü 10, doku tamiri sırasında fibroblast hücrelerinin mutajenik aktivitelerini artırıcı role sahiptir. Yara iyileşmesinde etkin bir genidir [95]. Itga1 ve Itga 3 genleri integrin kodlayan genler olup hücre adhezyonu ve sitoskeleti oluşturmada görev alırlar. Son olarak Wisp1 geni, WNT1 uyarabilen sinyal yolak proteini 1 geni, acil durum geni olup töröpatik stratejilerin oluşturulmasında etkin rolü vardır. Hücresel göç, anjiyogenesis, apoptozis ve kök hücre proliferasyonunda görev almaktadır [96]. İnflamasyon evresinin başarısı doku tamirinin kalitesini belirler bu sebeple bu aşama yara iyileşmesi için önemlidir.

PRP grubunda SHAM grubuna göre diğer gruplarda farklı olarak Col1a2 (Kollajen, tip I, alfa 2) ve Col5a1 (Kollajen, tip V, alfa 1) genlerinde artış meydana gelmiştir. Söz konusu bu genler yara bölgelerinde ECM tamir mekanizmasında görev alan genlerdir. ECM yapımında diğer gruplara oranla PRP grubunda daha fazla aktivasyon görülmektedir.

Lipid fraksiyonu grubunda SHAM grubuna göre meydana gelen regülasyonlar incelendiğinde artış görülen tüm genler PRP tedavi grubu ile ortak iken, PRP'den farklı olarak 4 tane gende azalış görülmektedir. Azalış gösteren genler Angpt1, Cxcl1, Il1b ve Plaur' dır. Anjiyopoetin 1 geni, anjiyopoetin ailesine bağlı glikoproteinlerin üretilmesini sağlayan gen olup kılcal gelişimi ve anjiogeneizde görev alırlar [97]. İnflamasyon evresinde yara bölgesinde kılcal oluşumunu durdurucu bir etki göstermiştir. Cxcl5 ve Il1b (kemokin C-X-C motif ligand 3 ve

interlökin 1 beta) genleri ise inflamatuvar sitokin-kemokin genleridir. Yara bölgesini iyileşme yolunda uyarıcı etkilerde bulunur. Son olarak Plaur, plasminojen aktivatör ürokinaz reseptör , geni plasminojen aktivasyonunu sağlayan reseptör protein genidir. Bu gende meydana gelen azalış lipid fraksiyonunun inflamasyon evresinde plasminojen aktivasyonunu düşürmeye yönelik etkisi olduğu anlamına gelebilir.

DMSO grubunun SHAM grubuna göre 3. güne ait moleküler bulguları incelendiğinde, artış gösteren tüm genler PRP grubu ile ortaktır. Ancak kat değişimleri açısından PRP daha fazla artış göstermiştir. Cxcl5 geninde DMSO grubunda 68 kat PRP grubunda ise 85 kat artış görülmesi dikkat çeken tek gen olmuştur. Lipid fraksiyonu ve DMSO grupları SHAM grubuna göre karşılaştırıldığında, Angpt1 geni için DMSO grubunda 21 kat, lipid fraksiyonu grubunda ise 11 kat azalış görülmektedir. Bu genin ifadesi de PRP grubunda anlamlı bir değişim göstermemiştir. Buna göre anjiyogenezin baskılanması en az PRP grubunda daha sonra lipid fraksiyonunda gerçekleşmiştir.

İnflamasyon aşaması olan 3. günde PRP, lipid fraksiyonu ve DMSO tedavi grupları kendi aralarında gen ifadesi bakımından benzer etkiye sahip olsalar da özellikle kollejen yapımından sorumlu (Coll1a1 ve Coll1a2) genlerde ve anjiyogenezin baskılanmasından sorumlu (Angpt1) genler bakımından PRP'nin diğer gruplara göre daha iyileştirici olduğu tespit edilmiştir. Bu konuda PRP grubunu lipid fraksiyonu ve DMSO grubu takip etmektedir.

Yara iyileşmesinin orta evresi olan proliferasyon aşaması çalışmamızda, 7. güne denk gelmektedir ve bu evreye ait moleküler bulgular analiz edildiğinde yoğun gen regülasyonu gözlenmektedir. Tüm tedavi gruplarında benzer yönde ekspresyon gösteren Ccl7, Col14a1, Cxcl11, Cxcl5 ve Plat genleri dikkat çekmektedir. Ccl7 geninde artış görülürken bu gen (kemokin C-C motif ligand 7) inflamasyon ve metastaz sürecinde makrofajları harekete geçirir. Bu gende en fazla artış 32 kat ile PRP grubunda olmuştur. 21 kat lipid fraksiyonunda ve 6 kat DMSO grubunda artış göstermiştir. Proliferasyon evresinin en belirgin özelliği olan hücre göçü ve hücre olgunlaşması genleri PRP grubunda daha sonra lipid fraksiyonunda en fazladır. Artış görülen Coll14a1 geni (kollejen tip 14 alfa1) fibrillogenesis oluşumunda rol alarak ECM yapımına katkıda bulunur. Bu gen ise en fazla artışı lipid fraksiyonunda 21 kat ile göstermiştir. En fazla dikkat çeken gen ekspresyonu Cxcl11 (kemokin C-X-C motif ligand 11) geninde olmuştur. DMSO tedavi grubunda yaklaşık 1396 kat, lipid fraksiyonunda 526 kat ve PRP grubunda ise 28 kat azalış göstermiştir. Cxcl11 geni

yara iyileşmesinin anahtar regülatörü konumunda olup ECM ve membrane bileşenlerinin yapımının yönlendirilmesinde kollejen matriksin tekrar organize edilmesinde görev alır [98 ,99]. Cxcl11 kemokinleri yara iyileşmesi sırasında fibroblast ve endotel hücre migrasyonunu inhibe ederken keratinositlerin göçünü sağlar [100]. Bu genin ekspresyonu aktif lezonlarda artış gösterdiği insanlar üzerinde yapılan çalışma ile literature katılmıştır. Bizim çalışmamızda ise bu gen proliferasyon aşamasında azalış göstermiştir [101]. Cxcl5 geni de Cxcl11 ile benzer bir regülasyon göstermiştir; DMSO tedavi grubunda 302, lipid fraksiyonu tedavi grubunda 285 ve PRP grubunda ise 140 kat azalış göstermektedir. Cxcl5 gen ifadesi (kemokin C-X-C motif ligand 5) inflamasyon ve anjiyogenez arasında anahtar regülatör olarak görev yapar [102]. Cxcl5 geni üzerine yapılan bir çalışmada Cxcl5 geninin azalış göstermesiyle inflamator sitokinlerin üretimi de azalış göstermiştir. Buna bağlı olarak inflamasyon aşamasından proliferasyona geçiş için bu gen ifadesindeki azalış oldukça önemlidir [103]. Cxcl11 ve Cxcl5 genleri için en fazla azalış DMSO grubunda daha sonra lipid fraksiyonu grubu son olarak en az azalış ise PRP de görülmüştür. DMSO grubu bu gen ifadesi bakımından proliferasyona daha hızlı geçmiştir. Plat geninde ise artış görülmüştür ve en fazla artışın 23 kat ile PRP grubunda daha sonra 11 kat ile lipid fraksiyonunda olması da iki grubun benzer etkileri açısından önemlidir. Bu gen (plasminojen aktivatör doku) plazminojeni plasmine çevirerek fibrinolitik etkiye sebep olur. Bu etki fibrin birikimlerinin parçalanmasını sağlayarak hemaostozda katkıda bulunur ve dolaşımdaki dengeye yardımcı olur. Yara iyileşmesinin orta evresi olan proliferasyon aşamasında PRP ve lipid fraksiyonu tedavisinin bu genlerdeki regülasyonu benzerdir. Bu bulgular lipid fraksiyonunun da yara iyileşmesi tedavilerinde kullanılabilecek bir tedavi olma potansiyelini destekler niteliktedir.

PRP grubunda SHAM grubuna göre Egf (Epidermal büyüme faktör) gen ekspresyonunda 227 kat azalış ve yine PRP grubunda lipid fraksiyonuna göre Tgf- α (Transforming büyüme faktör α) geninde 90 kat artış görülmüştür. Efg bir büyüme faktörü olup hücre büyümesi, hücre proliferasyonu ve doku tamirinde görev alır. Literatürde yer alan çalışmalarda Egf'nin akut oluşan yara bölgesinde ekspresyonun artış göstererek epitelizasyonu arttırdığı, kronik yaralarda ise azalış göstererek epitelizasyonu geciktirdiği test edilmiştir [104]. PRP tedavi grubunda Egf gen ekspresyonu diğer gruplara oranla azalış göstermiştir. Bu bakımından literatürden farklı bir sonuç elde edilmiştir. Tgf- α proteini mitojenik bir polipeptid olup

epidermal büyüme faktörleri ailesindedir. Tgf- α epidermal büyüme faktör reseptörüne bağlandığında hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve gelişmesini sağlayan sinyaller üretir. Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan bu genin ekspresyonu lipid fraksiyonu grubunda PRP grubuna göre daha az ekspresyon göstermiştir.

Proliferasyon aşaması olan 7. günde gerçekleşen gen ekspresyon regülasyonlarına göre sonuç olarak Egf ve Tgf- α genleri dışında çoğu gende PRP tedavi grubu ile lipid fraksiyonu tedavi grubu benzer etkiyi göstermişlerdir. Yara iyileşmesinin kritik dönemlerinden olan orta evrede PRP ile aynı doğrultuda gen regülasyonu sağlamış olması, lipid fraksiyonu ile ilgili hipotezimizi güçlendirmiştir.

Yara iyileşmesinin son evresi olan olgunlaşma ve yeniden şekillenme aşaması çalışmamızda 14. güne tekabül etmektedir. Bu güne ait veriler analiz edildiğinde PRP, lipid fraksiyonu ve DMSO tedavi gruplarında ortak olarak Colla1 gen ekspresyonunda azalma görülmektedir. Bu azalış PRP'de 16 kat, lipid fraksiyonunda 11 son olarak DMSO da 9 kat şeklinde olup en fazla azalış PRP'de tespit edilmiştir. Colla1 geninin yara kapanmaya başlamasıyla azalması doku tamirinin tamamlandığının doğal bir sonucudur ve en hızlı kapanan PRP grubunda en fazla azalış görülmüş olup lipid fraksiyonu takip etmiştir.

Bu evrede en çok dikkat çeken iki gen Il10 ile Tgfa olmuştur. Söz konusu genler PRP ve lipid fraksiyonu tedavi gruplarında ortak bir şekilde artış göstermiştir. PRP grubunda Il10 geni 130 kat lipid fraksiyonunda ise 30 kat iken, Tgfa geni PRP grubunda 158 kat lipid fraksiyonunda ise 15 kat artış göstermiştir. IL10 gen ifadesi yara bölgesinde yara izi oluşumunu indirgenmesinde rol oynar [105]. Söz konusu bu genler yara iyileşmesinin son evresinde en az skar izi oluşturmaya yönelik genler olup PRP ve lipid fraksiyonunda artışı gözlenmiştir.

PRP tedavi grubunda, lipid fraksiyonu grubundan farklı olarak MMP1 ve MMP7 gen ifadelerinde SHAM grubuna göre 10 ve 22 kat artış görülmüştür. Bu genler matriks metallopeptidaz 2 ve 7 enzimlerinin sentezlenmesini sağlayan genlerdir. Matriks metallopeptidaz enzimleri (MMPs) metal bağımlı enzim ailesine mensup olup ECM bileşenlerinin katabolizmasında görev alırlar [106]. MMPs enzimleri, embriyogenesiz ve doku tamiri gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alırlar [107]. Proteaz aktivitesi ile yara iyileşmesinin son evresinde ortamda bulunan hasarlı yara

bölgesinden uzaklaştırılmasına yardımcı olurken hücre proliferasyonu, göçü, farklılaşması, apoptoz ve anjiyogenesis gibi metabolik olaylarda görev alırlar.

Olgunlaşma ve yeniden şekillenme evresi olan son evrede (14. gün) PRP ve lipid fraksiyonu tedavi grupları yara üzerinde benzer etkiler göstermiştir. Bazı genler özellikle MMP'ler açısından PRP daha efektiftir. Ancak lipid fraksiyonu da yara izi oluşumunun indirgenmesi açısından PRP ile benzer regülasyon göstermiştir. 14. gün için makroskopik bulgular ile moleküler bulgular kolerasyon içindedir.

Yara iyileşmesinin inflamasyon, proliferasyon ve olgunlaşma evrelerine ait PRP ve lipid fraksiyonu, tedavi gruplarında SHAM grubuna göre bazı genlerde gerçekleşen regülasyon takip edilmiştir. PRP tedavi grubu için 11 tane genin 3. 7. ve 14. gün kat değişimleri (şekil 4.27) gösterilmektedir. Colla1 geni yara iyileşmesi boyunca önce artmış daha sonra azalmıştır, çünkü onarımla birlikte kollejen birikimi tamamlanmış ve ihtiyaç kalmamıştır. Benzer etki lipid fraksiyonu tedavi grubunda da gözlenmiştir (şekil 4.28). Cxcl5 geni PRP ve lipid fraksiyonu gruplarında 3. gün artış gösterirken 7. gün azalma eğilimindedir, çünkü inflamasyonda lökositleri aktifleştirmiştir ve inflamasyonun bitmesiyle azalmıştır. Itga3 geni Cxcl5 ile benzer bir regülasyon göstermiştir. Yara iyileşmesi sürecinde hasar sebebiyle yıkılan sitoskelet ve adhezyonun tamiri için gerekli olan Integrin alfa 3 proteinleri inflamasyonda sayıca artarken sonrasında azalmıştır. Il10 (interlökin 10) geninde ise PRP ve lipid fraksiyonu tedavi gruplarında benzer regülasyon görülmüştür ve 14. gün artış gözlenmiştir. Tgf- α geni se 3. ve 7. günlerde anlamlı bir regülasyon göstermezken, PRP ve lipid fraksiyonu tedavi gruplarında 14. gün artış göstermiştir. Tgf- α epidermal hücrelerin proliferasyonunu uyarıcı rolü vardır ve makrofaj, fibroblast, keratinsit ve trombositler tarafından üretilirler. Kendilerine spesifik reseptörlere bağlanarak inflamasyon hücrelerinin aktivasyonunu artırırlar [108 ,109].

Şekil 4.27 ve 4.28 incelendiğinde PRP ve lipid fraksiyonu tedavi gruplarının aynı günlerde bazı genler üzerinde benzer regülasyon gösterdikleri görülmektedir. PRP'den elde edilen lipid fraksiyonu moleküler seviyede bazı genler üzerinde PRP'nin sahip olduğu iyileştirici etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak makroskopik anlamda PRP tedavi grubunun yaraları daha hızlı bir kapanma göstermiştir.

Çalışmamızın sonuçlarını etkileyen bazı sınırlayıcı yönler de bulunmaktadır. Öncelikle kontrol grubu olan SHAM grubu yaralarına diğer gruplarda olduğu gibi

nemli bölge oluşturulmamış ve kuru halde bırakılmıştır. Literatüre göre yaranın nemli olması proliferasyon aşamasına geçişte rol oynayarak yaraların kapanma hızını etkiler. Çalışmanın standardize olması açısından SHAM grubu yaraları PBS veya saf su ile nemlendirilmesi gerekirdi. Ayrıca literatürde yer alan PRP'den elde edilen lipid fraksiyonu tedavisinin yara iyileşmesine olan etkisinin araştırıldığı çalışma kronik yaralar üzerinde yapılmıştır [17]. Çalışmamızda ise sağlıklı hayvanlarda oluşturulan eksizyon yara modeli olup yara iyileşmesinin son aşamasında SHAM grubunda % 85 kapanma görülmüştür. PRP'den elde edilen lipid fraksiyonu tedavisinin yara iyileşmesine olan etkilerine ait daha kapsamlı ve net sonuçlar elde etmek için kronik yara modeli üzerinde çalışılmalıdır. Son olarak ise çalışmamızda sadece lipid fraksiyonunun yara iyileşmesine olan etkisi moleküler olarak mRNA profillerinin incelenmesiyle yapılmıştır ancak miRNA profilleri bakılmamıştır. Bazı miRNA'ların yara iyileşmesinin ECM yapımı, hücre proliferasyonu ve göçü, anjiyogenez ve inflamasyon süreçleriyle ilgili olduğu bilinmektedir. miRNA profilleri incelenerek PRP'den elde edilen lipid fraksiyonunun yara iyileşmesine bağlı gen ekspresyon profili çalışmaları mekanizmanın daha iyi anlaşılması için gerekli görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamız yara iyileşmesi tedavilerinden biri olan PRP tedavisinin içerik bakımından yaraya olan etki mekanizmasının anlaşılması amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla moleküler seviyede PRP'den elde lipid fraksiyonunun uygulandığı yaralarda 84 gene ait ekspresyon verileri analiz edilmiş ve PRP tedavisi uygulanan yaralar ile bazı genlerde benzer ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak yara kontraksiyonu anlamında PRP tedavisinin yara üzerinde daha fazla iyileştirici etkisi olduğu gözlenmiştir. PRP tedavi grubu ve lipid fraksiyonu tedavi grubunun yara iyileşmesi sürecinde ekspresyonunda artış beklenen bazı genlerde her iki grupta artış görülürken PRP tedavisinde daha fazla artış görülmüştür . Bu sebeple yara kapanması PRP uygulanan yaralarda daha hızlı olmuştur.

Literatürde PRP'den elde edilen lipid fraksiyonu tedavisi ile ilgili çalışmalar hücre kültüründe in vitro yapılmıştır. Tez çalışmamız in vivo olması açısından özgün olup moleküler seviyede çalışılması açısından da literatüre yeni bilgiler katacaktır.

PRP tedavisi uygulamalarında, PRP'nin otolog ve taze hazırlanması gerekmektedir. Çünkü PRP eldesinden sonra ki 1 saat içerisinde trombositlerin %100 e yakını salınır ve bu durum zamanla PRP'nin etkinliğini azaltır. Ancak PRP'den elde edilen lipid fraksiyonu, tedavi için allojenik olarak hazırlanabilir ve uzun süre saklanabilir. Bu yönüyle PRP'den elde edilen lipid fraksiyonu gelecekte PRP'den daha ucuz ve daha kolay uygulanabilir özelliindedir.

Tüm bu bilgilerin ışığında, PRP'nin iyileştirici etkisinde lipid fraksiyonunun öneminin daha da iyi anlaşılması için histolojik çalışmalar yapılarak elde edilen sonuçlar desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Nayak, B. S., & Pinto Pereira, L. M. (2006). Catharanthus roseus flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. *BMC Complement Altern Med*, 6, 41.
- [2] Grazul-Bilska, A. T., Johnson, M. L., Bilski, J. J., Redmer, D. A., Reynolds, L. P., Abdullah, A., & Abdullah, K. M. (2003). Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc)*, 39(10), 787-800.
- [3] Polat, E., Aksoz, I., Arkan, H., Coskunpinar, E., Akbas, F., & Onaran, I. (2014). Gene expression profiling of *Lucilia sericata* larvae extraction/secretion-treated skin wounds. *Gene*, 550(2), 223-229.
- [4] Feistritzer N.R.: Ed: Rothrock J.C. (2003). Wound Healing, dressing and Drains. 290-295.
- [5] Kimura, A., Ogata, H., Yazawa, M., Watanabe, N., Mori, T., & Nakajima, T. (2005). The effects of platelet-rich plasma on cutaneous incisional wound healing in rats. *J Dermatol Sci*, 40(3), 205-208.
- [6] Yılmaz B., K. S. (2013). Platelet-Rich Plasma Applications. *Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 59(4).
- [7] Hoeflerlin, L. A., Huynh, Q. K., Mietla, J. A., Sell, S. A., Tucker, J., Chalfant, C. E., & Wijesinghe, D. S. (2015). The Lipid Portion of Activated Platelet-Rich Plasma Significantly Contributes to Its Wound Healing Properties. *Advances in Wound Care*, 4(2), 100-109.
- [8] *Skin: Facts, Diseases & Conditions*. (2016). Retrieved from <http://www.livescience.com/27115-skin-facts-diseases-conditions.html>
- [9] R., T. (1975). Duyu Fizyolojisi. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, 32 29-34.
- [10] Menon, G. K. (2002). New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev*, 54 Suppl 1, S3-17.
- [11] *The skin structure & Function*. Retrieved from <https://www.dermacaredirect.co.uk/advice/the-skin-structure-function>
- [12] *Derinin Katmanları*. Retrieved from <http://www.hayatisaglik.com/saglik-bilgiler/derinin-katmanlari-nelerdir.html>
- [13] Zaidi, Z., Lanigan, S.W. (2010). *Dermatology in Clinical Practice*.
- [14] Sezgin, S. Ö., Saraç, G., Şamdancı, E., & Şenol, M. (2015). Hemostatik ajan Ankaferd'in yara iyileşmesi üzerine etkileri. *TURKDERM*, 49((3)), 218-221.
- [15] Metcalfe, A. D., & Ferguson, M. W. (2007). Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials*, 28(34), 5100-5113.
- [16] Sevinç, A. (1987). *Dermatoloji Ders Kitabı*: Medial.
- [17] Shah, J. B. (2011). The History of Wound Care. *The Journal of the American College of Certified Wound Specialists*, 3(3), 65-66.
- [18] Karasu, A., & Bakır, B. (2008). Yara ve Yara İyileşmesi. *Veteriner Cerrahi Dergisi*, 14 (1), 36-43.

- [19] *Yara İyileşmesinde Aşamalar.* (2014). Retrieved from <https://doktorbul.wordpress.com/2014/03/27/yara-iyileşmesinde-asmalar-nelerdir/>
- [20] **Atilla Engin, İ. S.** (1993). *Yara İyileşmesi*: Güneş Yayıncılık.
- [21] **Adnan, A., Vahap, O., Mustafa, E., & Mustafa, Ş.** (2015). Yara iyileşmesi. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 1(2).
- [22] **Adelmann-Grill, B. C., Wach, F., Cully, Z., Hein, R., & Krieg, T.** (1990). Chemotactic migration of normal dermal fibroblasts towards epidermal growth factor and its modulation by platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Eur J Cell Biol*, 51(2), 322-326.
- [23] **Schultz, G., Rotatori, D. S., & Clark, W.** (1991). EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. *J Cell Biochem*, 45(4), 346-352.
- [24] **Baum, C. L., & Arpey, C. J.** (2005). Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*, 31(6), 674-686; discussion 686.
- [25] **Paul M. Glat, M. T. L., Grabb And Smith's Plastic Surgery.** (1998). *Wound Healing*.
- [26] **Calvin, M.** (1998). Cutaneous wound healing. *Wounds*, 10(1), 12-32.
- [27] **Kirsner, R. S., & Eaglstein, W. H.** (1993). The wound healing process. *Dermatol Clin*, 11(4), 629-640.
- [28] **Theoret, C. L.** (2004). Update on wound repair. *Clin. Tech. Equine. Pract.*, 3, 110-122.
- [29] **Engin, A.** (2009). *Temel Cerrahi*. Ankara: Güneş Kitabevi.
- [30] **Deodhar, A. K., & Rana, R. E.** (1997). Surgical physiology of wound healing: a review. *J Postgrad Med*, 43(2), 52-56.
- [31] **Swaim, S. F., Henderson, R.A.** . (1990). *Wound healing. In: Small Animal Wound Management*. Pennsylvania.
- [32] **J.R., P.** (1991). *Wound healing. In: Atlas of Smal Animal Surgery*. New York: Gower Medical.
- [33] **M.C. Regan, A. B.** (1994). The Cellular Biology of Wound Healing. 1, 3-17
- [34] **Wilmink, J. M., & van Weeren, P. R.** (2004). Differences in wound healing between horses and ponies: Application of research results to the clinical approach of equine wounds. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 3(2), 123-133.
- [35] **Hedlund, C. S.** (2002). *Surgey of the integumentary system*: Elsevier.
- [36] **Stashak, T. S.** (1991). Principles of wound healing. *Equine Wound Management*, 1-15.
- [37] **Heinze, C. D., Clem, M.F.** (1988). *Wound healing and tissue repair*. USA: Williams & Wilkins.
- [38] **D.J., R.** (1997). *Inflammation and repair*. Pennsylvania: Williams & Wilkins.
- [39] **Broughton, G., 2nd, Janis, J. E., & Attinger, C. E.** (2006). Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*, 117(7 Suppl), 1e-S-32e-S.
- [40] **Barbul, A., Lazarou, S. A., Efron, D. T., Wasserkrug, H. L., & Efron, G.** (1990). Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery*, 108(2), 331-336; discussion 336-337.
- [41] **Greenwald, D. P., Sharzer, L. A., Padawer, J., Levenson, S. M., & Seifter, E.** (1990). Zone II flexor tendon repair: effects of vitamins A, E, beta-carotene. *J Surg Res*, 49(1), 98-102.

- [42] Greenwald, D., Mass, D., Gottlieb, L., & Tuel, R. (1991). Biomechanical analysis of intrinsic tendon healing in vitro and the effects of vitamins A and E. *Plast Reconstr Surg*, 87(5), 925-930; discussion 931-922.
- [43] Ahn, S. T., & Mustoe, T. A. (1990). Effects of ischemia on ulcer wound healing: a new model in the rabbit ear. *Ann Plast Surg*, 24(1), 17-23.
- [44] Tobin, G. R. (1984). An improved method of delayed primary closure. An aggressive management approach to unfavorable wounds. *Surg Clin North Am*, 64(4), 659-666.
- [45] Carrico, T. J., Mehrhof, A. I., Jr., & Cohen, I. K. (1984). Biology of wound healing. *Surg Clin North Am*, 64(4), 721-733.
- [46] White RR, L. D., Verheyden CN, Mc Connell BG. (1984). Management of wounds in diabetic foot. *Surg Clin North Am*, 64 (4), 735-742.
- [47] Harding, K. G., Morris, H. L., & Patel, G. K. (2002). Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *Bmj*, 324(7330), 160-163.
- [48] Varol, Y. (2008). *Nigella sativa Yağının Sıçanlarda Oluşturulan Yara Modeli Üzerinde Etkisinin İncelenmesi*. (Yüksek Lisans), Marmara Üniversitesi, İstanbul.
- [49] Enoch, S., Grey, J. E., & Harding, K. G. (2006). Recent advances and emerging treatments. *Bmj*, 332(7547), 962-965.
- [50] Foster, T. E., Puskas, B. L., Mandelbaum, B. R., Gerhardt, M. B., & Rodeo, S. A. (2009). Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*, 37(11), 2259-2272.
- [51] Cheena Langer, V. M. (2014). Platelet-Rich Plasma in Dermatology. *JK Science*, 16(4).
- [52] Gary B. Clark, M., MPA, It's A Wide Wide World, Volume 1 : Issue 3 : August 2009. (2009). Platelet Rich Plasma (PRP) Therapy Literature Reviews. *Journal of Prolotherapy*, 1(3), 185-191.
- [53] Gholami, G., Mohammadi, M., & Abrishami, M. (2014). Platelet Rich Plasma: Review of Literature. *Journal of Dental School Shahid Beheshti University of Medical Sciences*, 32(3), 176-186.
- [54] *Platelet-Rich Regenerative Therapy*. (2017). Retrieved from <http://www.melsmon.co.kr/front/product/device?langCd=en>
- [55] Marx, R. E. (2001). Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*, 10(4), 225-228.
- [56] Dr. Joyce P. Sequeria¹, D. S. J. S. J. e. a. (2015). Platelet Rich Plasma: Clinical Applications in Dentistry. *Sch. J. Dent. Sci*, 2(6), 355-362.
- [57] Everts, P. A., Knape, J. T., Weibrich, G., Schonberger, J. P., Hoffmann, J., Overdevest, E. P., . . . van Zundert, A. (2006). Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol*, 38(2), 174-187.
- [58] Eppley, B. L., Woodell, J. E., & Higgins, J. (2004). Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 114(6), 1502-1508.
- [59] Engebretsen, L., Steffen, K., Alsousou, J., Anitua, E., Bachl, N., Devilee, R., . . . Verrall, G. (2010). IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. *Br J Sports Med*, 44(15), 1072-1081.
- [60] Ferrari M, Z. S., Valbonesi M, Henriquet F, Venere G, Spagnolo S, Grasso MA, Panzani I. (1987). A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs*, 10(1), 47-50.

- [61] Dhillon, R. S., Schwarz, E. M., & Maloney, M. D. (2012). Platelet-rich plasma therapy - future or trend? *Arthritis Research & Therapy*, 14(4), 219-219.
- [62] *Is Platelet-Rich Plasma an Effective Healing Therapy?* (2009). Retrieved from <https://www.scientificamerican.com/article/platelet-rich-plasma-therapy-dennis-cardone-sports-medicine-injury/>
- [63] Sampson, S., Gerhardt, M., & Mandelbaum, B. (2008). Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 1(3-4), 165-174.
- [64] Pallua, N., Wolter, T., & Markowicz, M. (2010). Platelet-rich plasma in burns. *Burns*, 36(1), 4-8.
- [65] Shashikiran, N. D., Reddy, V. V., Yavagal, C. M., & Zakirulla, M. (2006). Applications of platelet-rich plasma (PRP) in contemporary pediatric dentistry. *J Clin Pediatr Dent*, 30(4), 283-286.
- [66] El-Sharkawy, H., Kantarci, A., Deady, J., Hasturk, H., Liu, H., Alshahat, M., & Van Dyke, T. E. (2007). Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol*, 78(4), 661-669.
- [67] Diegelmann, R. F. (2003). Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen*, 11(6), 490-495.
- [68] Yager DR, C. I., Crossland MC, Shawler LG, Sommer VL, Boykin JV. (2005). Neutrophil Enzymes in Pressure Ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 13(2).
- [69] Schwab, J. M., & Serhan, C. N. (2006). Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. *Curr Opin Pharmacol*, 6(4), 414-420.
- [70] Gronert, K. (2008). Lipid autacoids in inflammation and injury responses: a matter of privilege. *Mol Interv*, 8(1), 28-35.
- [71] Sevda, C. (2010). Yara İyileşmesi ve Büyüme Faktörleri.
- [72] Noronha, I. L., Niemir, Z., Stein, H., & Waldherr, R. (1995). Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 10(6), 775-786.
- [73] Oppenheim JJ, R. F., Faltynek (1994). Cytokines. *Basic and Clinical Immunology*, 105- 123.
- [74] Abbas, A. K., Lichtman, Andrew H, Pillai, Shiv. (2015). Cellular and molecular immunology. from Elsevier/Saunders <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101630458>
- [75] Güner, İ., Özmen, D. ve Bayındır, O. . (1997). Sitokinler. *T Klin J Med Sci*, 17, 65-74.
- [76] Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 83(3), 835-870.
- [77] Champe, P. C., Harvey, R.A. . (2005). Globular and fibrous proteins. *Lippincott's Lustrated Reviews: Biochemistry*, 2, 25-44.
- [78] Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2005). *The Three Dimensional Structure of Proteins*. New York: W.H.Freeman & Co.
- [79] Aksöz, İ. (2013). *DeneySEL Siçan Yara Modelinde Lucilia Sericata Larvalarının Kullanımı İle İyileşen Yaralarda Mrna Profillerinin İncelenmesi*. (Yüksek Lisans), İstanbul Üniversitesi.
- [80] Leong M, P. L. (2004). *Sabiston Textbook of Surgery* USA Elsevier.
- [81] Bellayr, I. H., Mu, X., & Li, Y. (2009). Biochemical insights into the role of matrix metalloproteinases in regeneration: challenges and recent developments. *Future Med Chem*, 1(6), 1095-1111.
- [82] Guzel, Y., Karalezli, N., Bilge, O., Kacira, B. K., Esen, H., Karadag, H., . . . Doral, M. N. (2015). The biomechanical and histological effects of

platelet-rich plasma on fracture healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 23(5), 1378-1383.

- [83] Takikawa, M., Ishihara, M., Takabayashi, Y., Sumi, Y., Takikawa, M., Yoshida, R., . . . Kiyosawa, T. (2015). Enhanced healing of mitomycin C-treated healing-impaired wounds in rats with PRP-containing fragmin/protamine microparticles (PRP&F/P MPs). *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*, 49(5), 268-274.
- [84] Saydam İ, Y. S., Seven E. (2005). Topikal olarak uygulanan Nitrofurazon ve Rifamisin'in tam kalınlıkta yara iyileşmesi üzerine etkileri. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 27(3), 113-120.
- [85] Stuart, K., Paderi, J., Snyder, P. W., Freeman, L., & Panitch, A. (2011). Collagen-binding peptidoglycans inhibit MMP mediated collagen degradation and reduce dermal scarring. *PLoS One*, 6(7), e22139.
- [86] Sumitra, M., Manikandan, P., & Suguna, L. (2005). Efficacy of Butea monosperma on dermal wound healing in rats. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(3), 566-573.
- [87] Mohammadi, R., Mehrtash, M., Mehrtash, M., Hassani, N., & Hassanpour, A. (2016). Effect of Platelet Rich Plasma Combined with Chitosan Biodegradable Film on Full-Thickness Wound Healing in Rat Model. *Bulletin of Emergency & Trauma*, 4(1), 29-37.
- [88] Yates, C. C., Whaley, D., Babu, R., Zhang, J., Krishna, P., Beckman, E., . . . Wells, A. (2007). The effect of multifunctional polymer-based gels on wound healing in full thickness bacteria-contaminated mouse skin wound models. *Biomaterials*, 28(27), 3977-3986.
- [89] Langnaese, K., John, R., Schweizer, H., Ebmeyer, U., & Keilhoff, G. (2008). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Molecular Biology*, 9(53).
- [90] Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protocols*, 3(6), 1101-1108.
- [91] Cross, K. J., & Mustoe, T. A. Growth factors in wound healing. *Surgical Clinics*, 83(3), 531-545.
- [92] Albaayit, S. F., Abba, Y., Rasedee, A., & Abdullah, N. (2015). Effect of Clausena excavata Burm. f. (Rutaceae) leaf extract on wound healing and antioxidant activity in rats. *Drug Des Devel Ther*, 9, 3507-3518.
- [93] Shen, H. M., Chen, C., Jiang, J. Y., Zheng, Y. L., Cai, W. F., Wang, B., . . . Shi, G. G. (2017). The N-butyl alcohol extract from Hibiscus rosa-sinensis L. flowers enhances healing potential on rat excisional wounds. *J Ethnopharmacol*, 198, 291-301.
- [94] Wang, J. F., Olson, M. E., Reno, C. R., Kulyk, W., Wright, J. B., & Hart, D. A. (2000). Molecular and cell biology of skin wound healing in a pig model. *Connect Tissue Res*, 41(3), 195-211.
- [95] Emoto H, T. S., Mattei MG, Yamasaki M, Hashimoto G, Katsumata T, Negoro T, Nakatsuka M, Birnbaum D, Coulier F, Itoh N (1997). Structure and expression of human fibroblast growth factor-10. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(37).
- [96] Maiese, K. (2014). WISP1: Clinical Insights for a Proliferative and Restorative Member of the CCN Family. *Current neurovascular research*, 11(4), 378-389.

- [97] *ANGPT1 angiopoietin 1, Homo sapiens (human)* (9 April 2017). Retrieved <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=284>
- [98] 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.
- [99] Yates, C. C., Whaley, D., Hooda, S., Hebda, P. A., Bodnar, R. J., & Wells, A. (2009). Delayed reepithelialization and basement membrane regeneration after wounding in mice lacking CXCR3. *Wound Repair Regen*, 17(1), 34-41.
- [100] Satish, L., Yager, D., & Wells, A. (2003). Glu-Leu-Arg-negative CXC chemokine interferon gamma inducible protein-9 as a mediator of epidermal-dermal communication during wound repair. *J Invest Dermatol*, 120(6), 1110-1117.
- [101] Garlet, G. P., Horwat, R., Ray, H. L., Jr., Garlet, T. P., Silveira, E. M., Campanelli, A. P., . . . Silva, R. M. Expression Analysis of Wound Healing Genes in Human Periapical Granulomas of Progressive and Stable Nature. *Journal of Endodontics*, 38(2), 185-190.
- [102] Romagnani, P., Lasagni, L., Annunziato, F., Serio, M., & Romagnani, S. (2004). CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol*, 25(4), 201-209.
- [103] Yip, H. Y., Poh, M. S. W., & Chia, Y. Y. (2016). The effects of glycyrrhizic acid and glabridin in the regulation of CXCL5 inflammation gene on acceleration of wound healing. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(2), 108-113.
- [104] Zeng, F., & Harris, R. C. (2014). Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Seminars in cell & developmental biology*, 0, 2-11.
- [105] King, A., Balaji, S., Le, L. D., Crombleholme, T. M., & Keswani, S. G. (2014). Regenerative Wound Healing: The Role of Interleukin-10. *Advances in Wound Care*, 3(4), 315-323.
- [106] Lievre, A., Milet, J., Carayol, J., Le Corre, D., Milan, C., Pariente, A., . . . Laurent-Puig, P. (2006). Genetic polymorphisms of MMP1, MMP3 and MMP7 gene promoter and risk of colorectal adenoma. *BMC Cancer*, 6, 270.
- [107] Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92(8), 827-839.
- [108] Singer, A. J., & Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 341(10), 738-746.
- [109] Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276(5309), 75-81.

EKLER

EK A: Toplam RNA izolasyonunda elde edilen konsantrasyon verileri

EK B: cDNA havuzları ile yapılan RT-PCR sonucu elde edilen Ct değerleri

EK C: Etik Kurul Onay Belgesi



EK A:

| Grup | Grup no | Toplam RNA konsantrasyonu (ng/ml) |
|-------------|----------------|--|
| PRP | 1_3 | 410,4 |
| PRP | 2_3 | 269,2 |
| PRP | 3_3 | 628,2 |
| PRP | 4_3 | 450,6 |
| PRP | 5_3 | 359,5 |
| PRP | 6_3 | 59,69 |
| PRP | 1_7 | 697,3 |
| PRP | 2_7 | 338,2 |
| PRP | 3_7 | 634,9 |
| PRP | 4_7 | 291,4 |
| PRP | 5_7 | 39,15 |
| PRP | 6_7 | 20,85 |
| PRP | 1_14 | 627,2 |
| PRP | 2_14 | 149,6 |
| PRP | 3_14 | 75,92 |
| PRP | 4_14 | 300,9 |
| PRP | 5_14 | 206 |
| PRP | 6_14 | 218,5 |
| LF | 1_3 | 163,6 |
| LF | 2_3 | 256,3 |
| LF | 3_3 | 307,9 |
| LF | 4_3 | 160,9 |
| LF | 5_3 | 240,4 |
| LF | 6_3 | 99,69 |
| LF | 1_7 | 350,7 |
| LF | 2_7 | 132,4 |
| LF | 3_7 | 7,846 |
| LF | 4_7 | 42,08 |
| LF | 5_7 | 51,15 |
| LF | 6_7 | 116,6 |
| LF | 1_14 | 509,1 |
| LF | 2_14 | 93,85 |
| LF | 3_14 | 284,3 |
| LF | 4_14 | 218,4 |
| LF | 5_14 | 156,8 |
| LF | 6_14 | 146,2 |
| DMSO | 1_3 | 227,1 |
| DMSO | 2_3 | 556,7 |
| DMSO | 3_3 | 89,92 |
| DMSO | 4_3 | 58,08 |
| DMSO | 1_7 | 248,5 |
| DMSO | 2_7 | 231,3 |
| DMSO | 3_7 | 78,08 |

| | | |
|------|------|-------|
| DMSO | 4_7 | 251,7 |
| DMSO | 1_14 | 440,8 |
| DMSO | 2_14 | 78,85 |
| DMSO | 3_14 | 161,6 |
| DMSO | 4_14 | 296,9 |
| SHAM | 1_3 | 69,38 |
| SHAM | 2_3 | 349,3 |
| SHAM | 3_3 | 86,15 |
| SHAM | 4_3 | 35,77 |
| SHAM | 1_7 | 223,2 |
| SHAM | 2_7 | 150,5 |
| SHAM | 3_7 | 63,69 |
| SHAM | 4_7 | 38,54 |
| SHAM | 1_14 | 381,7 |
| SHAM | 2_14 | 374,8 |
| SHAM | 3_14 | 113,0 |
| SHAM | 4_14 | 267,8 |

Ek A: Gruplara ait hayvanlar 2 rakam ile numaralandırılmıştır. İlk rakam hayvanın bulunduğu gruptaki sıra numarasını, ikinci rakam biyopsi materyalinin alındığı günü temsil etmektedir. Ölçümler 260 nm dalgaboyunda yapılmıştır.

EK B:

| <u>GENLER</u> | <u>P1</u> | <u>P2</u> | <u>P3</u> | <u>P4</u> | <u>P5</u> | <u>P6</u> | <u>P7</u> | <u>P8</u> | <u>P9</u> | <u>P10</u> | <u>P11</u> | <u>P12</u> |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Acta2 | 30,69 | 31,08 | 35,11 | 30,14 | 31,85 | 32,54 | 32,94 | 31,19 | 34,77 | 33,69 | 33,14 | 32,02 |
| Acta2 | 29,71 | 30,75 | 32,15 | 28,98 | 30,65 | | 31,64 | 32,42 | 33,24 | | | 31,12 |
| Angpt1 | 29,28 | 30,62 | 33,18 | 31,11 | 32,20 | 29,42 | 35,60 | 32,55 | 35,30 | 30,70 | 35,37 | 31,10 |
| Ccl12 | 31,10 | 31,74 | 35,12 | 30,12 | 33,45 | 36,28 | 37,43 | 35,23 | 38,28 | 33,46 | 37,33 | 33,97 |
| Ccl7 | 28,52 | 30,40 | 30,89 | 27,15 | 29,22 | 31,59 | 31,09 | 32,10 | 35,25 | 29,24 | 35,90 | 30,61 |
| Cd40lg | 29,06 | 28,58 | 30,40 | 29,06 | 32,07 | 32,22 | 32,73 | 35,23 | 34,09 | 31,52 | 34,69 | 33,27 |
| Cdh1 | 27,78 | 29,56 | 30,57 | 28,58 | 30,47 | 30,41 | 30,35 | 30,45 | 30,84 | 32,16 | 32,99 | 30,08 |
| Col14a1 | 30,94 | 33,33 | 35,01 | 29,85 | 30,44 | 32,85 | 33,32 | 32,23 | 37,38 | 33,65 | 37,09 | 31,33 |
| Col1a1 | 25,29 | 28,05 | 28,21 | 24,41 | 25,53 | 26,60 | 29,16 | 26,85 | 29,80 | 32,25 | 31,36 | 23,00 |
| Col1a2 | 24,22 | 26,65 | 26,08 | 23,58 | 24,00 | 25,03 | 26,69 | 24,62 | 27,79 | 29,18 | 25,76 | 22,57 |
| Col3a1 | 23,58 | 25,51 | 25,47 | 22,54 | 22,52 | | 24,92 | 22,50 | 26,91 | 27,01 | 25,13 | 23,95 |
| Col4a1 | | 38,70 | | 37,86 | | | | | 39,28 | | | |
| Col4a3 | | | | | | 38,01 | | | | | | |
| Col5a1 | 28,54 | 31,16 | 31,14 | 27,68 | 28,00 | 30,37 | 31,27 | 29,69 | 33,76 | 33,01 | 31,50 | 29,10 |
| Col5a2 | 29,17 | 31,20 | 31,02 | 27,98 | 28,29 | 30,66 | 31,59 | 30,37 | 34,13 | 30,91 | 31,18 | 31,73 |
| Col5a3 | 30,66 | 34,22 | 32,95 | 29,56 | 30,46 | 32,77 | 31,95 | 33,01 | 36,81 | 32,04 | 36,49 | 33,07 |
| Csf2 | 32,63 | 34,68 | 35,10 | 32,06 | 35,18 | 35,45 | 34,66 | 35,24 | 37,25 | 33,19 | 32,63 | 35,03 |
| Csf3 | 31,94 | 32,46 | 34,23 | 32,52 | 36,23 | 36,33 | 33,25 | 36,09 | 37,37 | 34,92 | | 34,63 |
| Ctgf | 28,28 | 29,01 | 30,31 | 28,15 | 28,52 | 30,09 | 29,58 | 28,69 | 33,06 | 30,03 | 30,38 | 29,92 |
| Ctnnb1 | 28,38 | 29,55 | 30,37 | 27,30 | 28,89 | 29,49 | 30,07 | 29,48 | 33,19 | 32,92 | 30,37 | 28,50 |
| Ctsg | 35,21 | 35,86 | 32,70 | 33,33 | 32,81 | 35,61 | | | 37,64 | 37,82 | 34,98 | 33,96 |
| Ctsk | 39,57 | 38,08 | 39,30 | | | 36,45 | | 39,52 | | | | |
| Ctsl1 | 26,26 | 29,15 | 30,16 | 24,60 | | 28,40 | 28,85 | 27,75 | 32,81 | 28,09 | 28,27 | 27,61 |
| Cxcl1 | 29,00 | 31,29 | 32,78 | 28,87 | 28,83 | 32,39 | 30,05 | 31,41 | 34,90 | 28,60 | 29,23 | 31,65 |
| Cxcl11 | 33,36 | 32,69 | 34,11 | 34,03 | 35,10 | 36,88 | | 37,55 | 39,12 | 36,12 | | 35,16 |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Cxcl3 | 33,09 | 35,17 | 34,17 | 33,50 | 35,60 | | 35,22 | 38,33 | | 37,21 | 34,89 | |
| Cxcl5 | 32,06 | 34,97 | 34,63 | 34,28 | 34,22 | 32,82 | 34,33 | 35,34 | 35,33 | 39,95 | | 33,95 |
| Egf | 32,59 | 35,66 | 36,16 | 35,12 | | | | | | | | 35,59 |
| Egfr | 29,69 | 32,01 | 32,69 | 29,64 | 32,25 | 31,52 | 32,05 | 33,19 | 34,27 | 31,18 | 33,79 | 30,32 |
| F13a1 | 28,85 | 32,52 | 32,90 | 27,70 | 31,14 | 31,86 | 31,98 | 33,01 | | 30,66 | 33,04 | 31,83 |
| F3 | 28,25 | 32,07 | 32,25 | 27,77 | 30,31 | 31,33 | 30,03 | 31,08 | 33,53 | 29,18 | 32,75 | 31,06 |
| Fga | 38,47 | | | | | 39,44 | | 39,11 | | | | |
| Fgf10 | 29,88 | 30,69 | 32,17 | 29,73 | 33,07 | 33,34 | 32,57 | 32,12 | 34,89 | 36,73 | | 32,39 |
| Fgf2 | 30,58 | 31,16 | 33,05 | 30,59 | 32,38 | 32,70 | 33,66 | 33,03 | 36,55 | 36,25 | 34,57 | 34,39 |
| Fgf7 | 28,21 | 29,41 | 31,16 | 27,91 | 29,35 | 30,95 | 30,87 | 30,38 | 33,38 | 31,51 | 31,45 | 30,55 |
| Hbegf | 22,44 | 22,77 | 23,57 | 22,93 | 23,49 | 23,52 | 23,48 | 22,32 | 24,86 | 23,65 | 23,54 | 22,29 |
| Hgf | 34,13 | | | 35,02 | 35,19 | 36,16 | | | | | 37,06 | 36,38 |
| lfnf | 33,82 | 35,24 | 36,63 | 33,60 | 36,05 | 38,12 | 38,05 | 34,24 | | 35,98 | 38,98 | |
| Igf1 | 31,30 | 32,97 | 34,78 | 31,34 | 33,75 | 34,28 | 33,47 | 34,56 | 35,69 | 33,46 | 38,02 | 34,03 |
| Il10 | 29,54 | 34,13 | 33,48 | 29,91 | 30,88 | 34,50 | 33,22 | 35,04 | | 30,91 | 34,24 | 39,30 |
| Il1b | 27,25 | 29,25 | 30,90 | 27,48 | 28,45 | 30,07 | 29,44 | 30,34 | 33,33 | 26,52 | 28,84 | 31,18 |
| Il2 | 29,31 | 29,75 | 32,18 | 30,28 | 34,06 | 35,90 | 34,96 | 32,82 | 36,26 | | 35,76 | 35,50 |
| Il4 | | | | | 38,13 | | 39,64 | | | | | |
| Il6 | 28,10 | 29,24 | 30,53 | 27,59 | 29,25 | 32,47 | 31,30 | 31,70 | 34,27 | 30,04 | 32,70 | 30,37 |
| Il6st | 28,85 | 30,26 | 31,42 | 27,57 | 29,34 | 30,22 | 30,51 | 30,09 | 33,17 | 30,00 | 31,08 | 29,18 |
| Itga1 | 32,33 | 35,48 | 35,13 | 31,24 | 35,21 | 34,54 | 35,64 | 33,54 | 38,23 | 39,06 | 34,58 | 33,04 |
| Itga2 | 31,54 | 34,86 | 34,01 | 31,00 | 32,26 | 35,59 | 34,03 | 31,07 | 35,61 | 32,51 | 32,89 | 32,31 |
| Itga3 | 33,38 | 37,08 | 33,95 | 30,49 | 33,09 | 32,56 | 34,97 | 32,01 | 36,15 | 38,69 | 34,47 | 34,89 |
| Itga4 | 30,92 | 33,34 | 34,40 | 29,38 | 31,32 | 33,94 | 33,40 | 32,07 | 34,56 | 34,06 | 35,50 | 32,39 |
| Itga5 | 30,58 | 33,22 | 32,66 | 30,19 | 31,28 | 34,60 | 32,61 | 35,70 | 35,43 | 33,73 | 34,41 | 33,16 |
| Itga6 | 30,08 | 31,10 | 32,96 | 29,80 | 31,49 | 31,45 | 31,79 | 30,67 | 33,59 | 30,80 | 32,35 | 31,23 |
| Itgav | 24,83 | 27,58 | 28,77 | 23,24 | 25,47 | 27,31 | 26,85 | 28,96 | 30,66 | 25,32 | 29,07 | 26,40 |

| | | | | | | | | | | | | |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Itgb1 | 26,89 | 29,49 | 30,54 | 26,24 | 27,91 | 29,19 | 28,62 | 28,83 | 31,33 | 28,57 | 30,55 | 29,28 |
| Itgb3 | 31,60 | 33,95 | 35,68 | 30,27 | 33,23 | 33,02 | | 34,89 | 36,49 | 32,40 | 33,08 | 32,67 |
| Itgb5 | 30,03 | 30,73 | 32,03 | 30,11 | 31,77 | 35,10 | 33,32 | 33,49 | 35,70 | 34,18 | | 34,63 |
| Itgb6 | | | | 33,85 | | | | 39,53 | 36,17 | | 35,04 | |
| Mapk1 | 28,53 | 30,44 | 31,32 | 28,15 | 30,07 | 30,20 | 30,42 | 29,62 | 32,11 | 31,92 | 31,15 | 28,86 |
| Mapk3 | 29,14 | 30,81 | 32,21 | 29,03 | 31,02 | 32,06 | 31,35 | 31,52 | 33,95 | 30,93 | 31,97 | 31,59 |
| Mif | 30,09 | 2,41 | 31,34 | 29,05 | 31,87 | 33,37 | 32,46 | 32,65 | 37,62 | 33,11 | | 33,06 |
| Mmp1 | 28,07 | 28,56 | 29,67 | 27,68 | 32,47 | 31,09 | 31,72 | 31,43 | 32,61 | 31,83 | 32,88 | 31,92 |
| Mmp2 | 27,79 | 29,00 | 28,51 | 26,50 | 26,35 | 27,41 | 29,57 | 27,28 | 30,14 | 29,80 | 28,67 | 28,47 |
| Mmp7 | 29,24 | 29,70 | 31,06 | 29,21 | 32,27 | | 35,01 | 33,15 | 34,49 | | | 34,31 |
| Mmp9 | 29,16 | 29,46 | 31,37 | 28,35 | 29,44 | 31,15 | 31,30 | 29,87 | 33,71 | 30,18 | 33,03 | 30,03 |
| Pdgfa | 30,16 | 31,74 | 32,18 | 30,35 | 31,67 | 31,17 | 32,08 | 33,07 | 34,24 | 32,27 | 32,62 | 30,45 |
| Plat | 27,60 | 29,21 | 30,51 | 27,08 | 28,47 | 29,27 | 29,50 | 29,91 | 32,78 | 28,82 | 34,19 | 29,14 |
| Plau | 31,64 | 33,93 | 33,35 | 30,13 | 31,22 | 34,69 | 33,88 | 34,89 | 34,55 | 33,25 | 33,63 | 34,12 |
| Plaur | 28,93 | 31,04 | 32,81 | 28,51 | 29,26 | 31,82 | 30,31 | 30,53 | 35,23 | 27,83 | 28,72 | 31,07 |
| Plg | 33,49 | 33,86 | 34,80 | 32,88 | 36,77 | 35,13 | 35,78 | 35,21 | 36,33 | 39,60 | 38,96 | 36,13 |
| Pten | 26,66 | 27,82 | 29,07 | 26,93 | 28,43 | 29,02 | 28,96 | 27,36 | 30,80 | 28,67 | 29,53 | 28,34 |
| Ptgs2 | 28,50 | 29,90 | 31,39 | 28,61 | 29,31 | 32,36 | 31,32 | 30,13 | 34,20 | 28,86 | 29,34 | 30,00 |
| Rac1 | 28,20 | 32,69 | 31,33 | 27,20 | 29,68 | 30,56 | 30,30 | 30,78 | 34,49 | 31,86 | 31,24 | 28,85 |
| Rhoa | 26,71 | 30,23 | 29,91 | 25,43 | 27,67 | 28,52 | 28,58 | 29,64 | 32,27 | 27,54 | 29,95 | 28,16 |
| Serpine1 | 27,74 | 29,83 | 30,89 | 26,79 | 28,08 | 30,83 | 29,22 | 29,79 | 32,85 | 30,24 | 32,25 | 30,99 |
| Stat3 | 30,31 | 32,51 | 32,10 | 29,27 | 30,24 | 31,57 | 31,31 | 30,20 | 33,18 | 31,30 | 32,89 | 31,90 |
| Tagln | 28,30 | 29,22 | 30,76 | 28,20 | 29,29 | 30,20 | 29,79 | 28,60 | 32,74 | 31,98 | 31,11 | 30,87 |
| Tgfa | 30,65 | 31,34 | 33,11 | 30,69 | 36,05 | 35,33 | 36,61 | 35,49 | | | | 39,22 |
| Tgfb1 | 30,43 | 35,14 | | 29,51 | 32,36 | 33,15 | 33,00 | 34,49 | | 32,02 | 35,15 | 32,75 |
| Tgfb3 | 31,16 | 32,54 | 33,71 | 32,62 | 34,91 | | 34,76 | 34,33 | 36,24 | | | 34,11 |
| Timp1 | 26,32 | 28,28 | 30,63 | 25,11 | 26,74 | 29,40 | 28,07 | 31,65 | 33,94 | 29,00 | 28,04 | 26,99 |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tnf | 30,24 | 30,14 | 33,11 | 29,56 | 31,85 | 33,51 | 32,64 | 33,89 | 34,45 | 32,75 | 32,39 | 35,90 |
| Vegfa | 29,34 | 32,25 | 32,74 | 29,30 | 31,69 | 32,28 | 31,29 | 30,96 | 39,83 | 30,15 | 29,94 | 30,19 |
| Vtn | 31,20 | 31,82 | 34,04 | 30,94 | 34,07 | 33,74 | 33,12 | 36,66 | 36,39 | | 34,13 | 33,16 |
| Wisp1 | 29,33 | 29,47 | 31,28 | 28,80 | 30,68 | 32,07 | 33,34 | 31,07 | 34,19 | 36,66 | 32,97 | 30,80 |
| Wnt5a | 34,12 | 31,33 | 33,21 | 32,40 | 31,76 | | 33,55 | 31,23 | 34,73 | 32,80 | 32,29 | 30,89 |
| Actb | 25,09 | 27,83 | 28,47 | 23,47 | 26,06 | 27,33 | 27,04 | 27,10 | 30,88 | 26,55 | 28,28 | 27,26 |

Ek B: cDNA havuzlarının oluşturulmasından sonra hazırlanan yara panelleri ile yapılan RT-PCR sonucunda elde edilen Ct değerleridir. dCt hesaplamalarında ACTB geni housekeeping gen olarak kabul edilmiştir.

EK C



T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2016/251
KONU: Sn. Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

26.10.2016

Sayın, Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

“PRP”den elde edilen lipid fraksiyonunun yara iyileşme tedavisinde etkisi ve ilişkili genlerin mRNA ekspresyon profillerinin değerlendirilmesi” başlıklı projenize ait başvurunuz 26.10.2016 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
Etik Kurul Başkanı
K.A.ILMAJ

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL
Üye

Yrd. Doç. Dr. Fatemeh BAHADORİ
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL
Üye
K.A.ILMAJ

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Harun SARIKAMIŞ
Üye

Şerife GÖNCÜ
Üye

- Etik kurumumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Büşra ÖZDEMİR
Doğum Tarihi ve Yeri : 22.06.1991 / Malatya
E-posta : busrayildizhan@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2014, Fatih Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
- **Yükseklisans** : 2017, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Biyoteknoloji ABD, Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2013 yılında Edinburgh Üniversitesi Hücre Biyolojisi Araştırma Laboratuvarında yaz dönemi Erasmus Stajyerliği yaptı.