

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**LUCILIA SERICATA LARVALARININ DENEYSEL SIÇAN YARA
MODELİNDE KULLANIMI İLE İYİLEŞEN YARALARDA MİKRORNA
PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ**

HÜLYA ARKAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. İLHAN ONARAN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2013

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Hülya ARKAN tarafından hazırlanan Deneysel Sıçan Yara Modelinde *Lucilia Sericata* Larvalarının Kullanımı İle İyileşen Yaralarda mRNA Profillerinin İncelenmesi başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

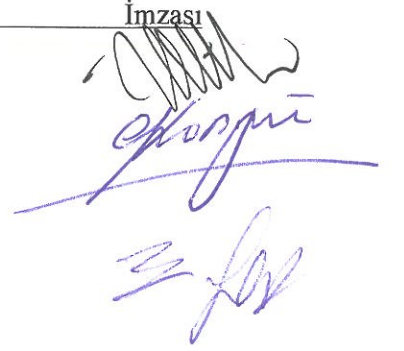
19 / 07 / 2013

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

1. Prof. Dr. İlhan ONARAN (DANIŞMAN)
2. Prof. Dr. Gönül KANIGÜR
3. Yard. Doç. Dr. Erdal POLAT
- 4.
- 5.

The image shows three handwritten signatures in blue ink. The top signature is the most prominent and appears to be 'İlhan Onaran'. Below it is another signature, and at the bottom is a third, smaller signature. The signatures are written over a horizontal line that separates the names from the titles.

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 çalışmayla 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 olmadığı beyan ederim.

Hülya ARKAN

(İmza)



İTHAF

Aileme ve Merhum Dedem Bayram Arkan'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve hoşgörülerini esirgemeyen Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve desteğini esirgemeyen, eğitim sürecimde çok büyük emeği geçen değerli danışman hocam Prof. Dr. İlhan Onaran'a,

Lucilia sericata ile ilgili bilgilerini ve tecrübelerini bizimle paylaşan ve laboratuvarını bize açan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Erdal Polat'a ve sorumlu olduğu laboratuvarın çalışanları MSc Serhat Sirekbasan'a,

Moleküler deneylerim esnasında bilgi birikiminden faydalandığım, laboratuvarlarını bize açan ve maddi desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Fahri Akbaş ve Dr. Ender Coşkunpınar'a ve deneyler esnasında yardımlarını esirgemeyen Doktora Öğrencisi Yasemin Müşteri ve Yüksek Lisans Öğrencisi Hülya Özdemir'e,

Hayvan deneyleri esnasında yardımlarını esirgemeyen Erdem Onaran'a ve Protein ve Hematoloji Laboratuvarı'ndaki değerli arkadaşlarıma,

Histopatolojik deneylerin yürütülmesi ve yorumlanmasında yardımını esirgemeyen PhD Gamze Tanrıverdi'ye,

Yüksek lisans eğitimine beraber başladığım ve beraber bitireceğim, tez deneylerini beraber yürüttüğüm değerli arkadaşım Yüksek Lisans Öğrencisi İlayda Aksöz'e,

İsmini sayamadığım ve desteklerini her zaman hissettiğim akrabalarıma, arkadaşlarıma ve lise hocalarıma,

Her zaman benimle birlikte olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme

Teşekkür etmeyi borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 19943

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Derinin Yapısı ve Görevleri.....	3
2.1.1. Epidermis	4
2.1.2. Dermis.....	5
2.1.3. Hipodermis.....	5
2.2. YARA İYİLEŞMESİ	6
2.2.1. İnflamasyon Evresi	6
2.2.2. Proliferasyon Evresi.....	8
2.2.3. Olgunlaşma Evresi	11
2.3. MİKRORNA.....	12
2.3.1. Tarihçe	13
2.3.2. MikroRNA Biyogenezi ve Fonksiyonu	13
2.3.3. MikroRNA ve Yara İyileşmesi	15
2.4. LUCİLİA SERİCATA	16
2.4.1. Yaşam Döngüsü	17
2.4.2. LDT	17
2.4.2.1. LDT'nin Tarihçesi.....	18
2.4.2.2. LDT'nin Etki Mekanizması	19
2.4.2.3. Larva Salgısı.....	19

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Hayvan Deneyi Planı	21
3.2. Deney Protokolü	21
3.3. Yara İyileşmesinin İzlenimi	23
3.4. Histopatolojik İnceleme	24
3.5. Moleküler Genetik Analizi	24
3.5.1. Mikrodizin Analizi ile miRNA Profilinin Taranması	24
3.5.1.1. RNA Hazırlanması	25
3.5.1.2. Poly(A) Kuyruğu eklenmesi	26
3.5.1.3. FlashTag™ Biotin HSR Ligasyon	27
3.5.1.4. Hibridizasyon	27
3.5.1.5. Yıkama-Boyama-Tarama	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Histopatolojik Değerlendirme.....	29
4.2. MikroRNA Mikrodizin Analizi	31
5. TARTIŞMA	38
KAYNAKLAR	45
ETİK KURUL KARARI	50
ÖZGEÇMİŞ	51

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Deri yara tamirinde olası rolleriyle miRNA'lar	16
Tablo 2-2: <i>Lucilia sericata</i> larva salgılarının içerdiği moleküller	20
Tablo 3-1: Hayvan Deneyleri Uygulamasının Özeti	23
Tablo 3-2: Poly (A) kuyruğu eklenmesinde kullanılan malzemelerin miktarı	27
Tablo 3-3: Ligasyon aşamasında kullanılan malzemelerin miktarı	27
Tablo 3-4: Hibridizasyon aşamasında kullanılan malzemeleri miktarı	27
Tablo 4-1: Yara iyileşmesinin 4. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda ekspresyonu anlamlı olarak artan miRNA'lar	31
Tablo 4-2: Yara iyileşmesinin 4. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda ekspresyonu anlamlı olarak azalan miRNA'lar	32
Tablo 4-3: Yara iyileşmesinin 7. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda ekspresyonu anlamlı olarak artan miRNA'lar	33
Tablo 4-4: Yara iyileşmesinin 7. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda ekspresyonu anlamlı olarak azalan miRNA'lar	33
Tablo 4-5: Yara iyileşmesinin 10. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda ekspresyonu anlamlı olarak artan miRNA'lar	34
Tablo 4-6: Yara iyileşmesinin 10. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda ekspresyonu anlamlı olarak azalan miRNA'lar	34
Tablo 4-7: Kontrol grubuna göre tedavi grubunda anlamlı değişen genlerin kat değişimine göre tüm gün birlikte gösterilmesi	35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Deri yapısı ve deri ekleri	3
Şekil 2-2: Epidermisin tabakaları	4
Şekil 2-3: Homeostaz.....	7
Şekil 2-4: İnflamasyon.....	8
Şekil 2-5: Proliferasyon	8
Şekil 2-6: Olgunlaşma	12
Şekil 2-7: MiRNA biyogenezi ve transkripsiyon sonrası susturma mekanizmasının şematik özeti.....	14
Şekil 2-8: a) <i>Lucilia sericata</i> , b) <i>Lucilia sericata</i> larvaları.....	17
Şekil 3-1: Sıçanın sırt bölgesi tıraşlandıktan sonra steril koşullarda yara alanının belirtilmesi.....	22
Şekil 3-2: Sıçanın sırt bölgesine steril koşullarda yara modelinin oluşturulması.....	22
Şekil 3-3: FlashTag™ HSR Protokolü	25
Şekil 3-4: Affymetrix GeneChip® Probe Array.....	28
Şekil 4-1: Sham grubuna ait deri kesiti.....	29
Şekil 4-2: Yara iyileşmesinin 4. gününe ait yara kesitleri	29
Şekil 4-3: Yara iyileşmesinin 7. gününe ait yara kesitleri	30
Şekil 4-4: Yara iyileşmesinin 10. gününe ait yara kesitleri	30

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ECM	:	Ekstrasellüler Matriks
PDGF	:	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
FGF	:	Fibroblast Büyüme Faktörü
TGF-β	:	Transforming Büyüme Faktörü β
CTGF	:	Bağ Doku Büyüme Faktörü
C5a	:	Komplement Elemanı 5a
MMP	:	Matriks Metalloproteinaz
EGF	:	Epidermal Büyüme Faktörü
IGF-1	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
VEGF	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
tRNA	:	Transfer RNA
rRNA	:	Ribozomal RNA
siRNA	:	Small İnterfering RNA
miRNA	:	Mikro RNA
mRNA	:	Mesajcı RNA
3'UTR	:	3'Çevrilmeyen Bölge
pri-miRNA	:	Birincil miRNA
pre-miRNA	:	Öncül miRNA
miR	:	Olgun miRNA
DGCR8	:	DiGeorge Kritik Bölgesi 8
RanGTP	:	Guanozin Trifosfat Bağlayan Ran
RISC	:	RNA ile İndüklenmiş Susturma Kompleksi
RNA Pol II	:	RNA Polimeraz II
TRBP	:	Transaktivasyondan Sorumlu RNA Bağlayıcı Protein
VCAM-1	:	Vaskular Hücre Adezyon Molekülü
ICAM-1	:	Hücrelerarası Adezyon Molekülü
EC	:	Endotelyal Hücre

TNF-α	: Tumor Nekrozis Faktörü- α
LDT	: Larva Debridman Tedavisi
MRSA	: Metiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
HCl	: Hidroklorik Asit
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
DNaz	: Deoksiribonükleaz
RNaz	: Ribonükleaz
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
PAP	: Poly-A Polimeraz
MnCl₂	: Manganez (II) Klorür
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
COX-2	: Siklooksijenaz-2
NF-KB	: Nükleer Faktör Kappa Beta
RAS	: Rat Sarkoma
PG	: Prostaglandin
Itgα8	: İntegrin Alfa 8
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homologu
FOXF2	: Forkhead Kutusu F2
ADAMTS9	: Trombospondin Motifleriyle Disintegrin ve Metalloproteinaz 9
TIMP2	: Metalloproteinazın Doku İnhibitörü 2

ÖZET

Arkan, H. *Lucilia sericata* Larvalarının Deneysel Sıçan Yara Modelinde Kullanımı ile İyileşen Yaralarda MikroRNA Profillerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2013.

Günümüzde yaraların iyileştirilmesinde çok sayıda etkili tedavi yöntemi uygulanmakla birlikte, hala bu yöntemlerin yeterli olmadığı vakalarla karşılaşılabilir. Larva debridman tedavisi (LDT) yara iyileşmesi patolojisinde etkili ancak kullanılabilirliği araştırılan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. LDT, yara bölgesine uygun sayıda yerleştirilen steril *Lucilia sericata* larvalarıyla biyodebridman esasına dayanan bir yöntemdir. LDT'yle larvaların iyileşmeyen/zor iyileşen yaraları nasıl iyileştirdiğini açıklamak üzere çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür. Larvaların bazı büyüme faktörlerinin seviyesini değiştirerek yaraları iyileştirdiğine dair bulgular olsa da mekanizma açık değildir. Karmaşık bir süreç olan yara iyileşmesinde rol alan genler tanımlanmakla birlikte bu süreç içerisinde bunların nasıl düzenlendiği ve larvaların bu sürece nasıl katkıda bulunduğu halen bilinmemektedir. Genin transkripsiyonel sonrası düzenlenmesinde rolü olan miRNA'ların hangilerinin larva uygulamasıyla ekspresyon seviyelerinin değiştiğinin ve bu süreçte rol aldığı ortaya çıkartılması mekanizmanın açıklanmasında önemli bir katkı sağlayabilir. Bu sebeple çalışmamızda; larvaların hangi miRNA'ların ekspresyonunu etkilediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç için Wistar Albino sıçan kullanılarak tedavi ve kontrol grubu oluşturuldu ve sıçanların sırt bölgesine tam kat yara defekti oluşturuldu. Yaralanmadan sonraki 0., 4. ve 7. günlerde tedavi grubunun yaralarına larva salgısı uygulandı ve yaralanmadan sonraki 4., 7. ve 10. günlerde yara dokuları alındı. Total RNA elde edilip mikrodizin analiziyle 389 olgun miRNA'nın taraması yapıldı. Kontrol grubuna göre tedavi grubunda 1,5 kat ve üzeri değişiklik gösteren 104 miRNA tespit edildi. Yara iyileşmesinin her farklı gününde en çok artan ve azalan ilk üç miRNA incelendiğinde ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanması, hücre çoğalması ve göçü, apoptoz ve inflamasyon süreçleriyle ilişkili olduğu görülmüştür. Bu çalışmamız, normal iyileşme sürecinden farklı olarak larva salgısı tedavisinin miRNA ekspresyon seviyelerini değiştirdiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Larva Debridman Tedavisi, *Lucilia sericata*, Mikrodizin, MikroRNA, Yara İyileşmesi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 19943.

ABSTRACT

Arkan, H. Analysis of microRNA Profiles in Healed Wounds by The Use of *Lucilia sericata* Larvae in An Experimental Rat Wound Model. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. Master Thesis. İstanbul. 2013.

Nowadays, many effective therapy methods are applied in improving of wounds, but but there are still cases that the methods cannot be adequate. Maggot debridement therapy (MDT), whose usability in the pathology of the wound healing is investigated, appears to be an effective method. MDT is a method that is based on biodebridement by the appropriate number of sterile *Lucilia sericata* larvae that are placed in the wound site. Various mechanisms are put forward to explain how larvae improve the nonhealing/imperfect wounds with MDT. Although there are evidences about, larvae improve the wounds by changing the levels of some growth factors, the mechanisms aren't clear. Genes, that play roles at wound healing, are identified, but it's still unknown how genes are regulated in the process and how larvae contribute to the process. Detection which miRNAs, that play a prominent role in the post-transcriptional regulation of genes, that alter expression levels of by larvae application, and play roles in the process, can provide a significant contribution in the explanation of the mechanism. For this reason in our study, it has been aimed to determine which miRNAs larvae affect expression of. For this purpose, it was created treatment and control groups by using the Wistar Albino rats, and full thickness wound defect on their dorsum. Larval secretion/extraction was treated to wounds of treatment group on days 0, 4 and 7 post wounding. Wound tissues were collected on days 4, 7 and 10 post wounding. Total RNA was isolated from wound tissues and detection of 389 mature miRNA was done by microarray analysis. 104 miRNAs were differentially expressed in treatment group to a factor of 1.5 fold or more in comparison to control group. When first three miRNAs, that are up- or down-regulated every different days of wound healing, were analyzed, they were associated with processes of extracellular matrix remodelling, cell proliferation and migration, apoptosis and inflammation. This study shows that larval secretion/extraction therapy altered miRNA expression levels as opposed to the normal healing process.

Key Words: *Lucilia sericata*, Maggot Debridement Therapy, Microarray, MicroRNA, Wound Healing.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 19943

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Deri, yetişkin bir insanın toplam vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturan büyük bir organdır. Vücudu çevresel tehlikelere karşı korur ve dehidrasyonu önler. Deri, üç farklı doku tabakasından oluşmuştur: Epidermis, dermis ve hipodermis. Çok sayıda faktör ve kompleks gen regülatör ağını içeren fizyolojik süreçlerle, bu üç tabakanın gelişimi düzenlenir (1).

Transfer RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) gibi kodlanmayan RNA'ların görevleri anlaşıldığında görülmüştür ki diğer kodlanmayan RNAlar, birçok insan geninin post-transkripsiyonel düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu esas olarak, RNA'nın iki formu tarafından gerçekleştirilir: small interfering RNAlar (siRNAlar) ve mikroRNAlar (miRNAlar)'dır. Kodlanmayan bu RNA'lar gen ekspresyonunun birçok alanını kontrol ettiği görülmektedir. Transkriptomun %30'undan daha etkili olduğu görülen miRNA'lar, insan genom kodunun %3 civarının olduğu tahmin edilmektedir (10). MiRNA'lar genelde hedef mesajcı RNA (mRNA)'nın 3'çevrilmeyen bölge (3'UTR)'sine bağlanırlar. Ya hedef mRNA'yı degrade ederek ya translasyonu bloke ederek ya da her ikisini birden yaparak post-transkripsiyonel gen düzenlenmesini indüklemeye yeteneğindedirler (1). MiRNA'nın hatalı ekspresyonu ve miRNA'nın hedef yerlerinin kazanılması veya kaybı, patolojik durumlar ve hastalık süreçleri ile ilişkilendirilmiştir (10).

Yara, yumuşak dokuların anatomisinin ve fonksiyonunun bozulmasıdır (6). Yara iyileşmesi, hücresel ve biyokimyasal olayların karşılıklı etkileşimini içeren patofizyolojik ve çok faktörlü dinamik bir süreçtir (5, 7). Yaralanma ya da hastalık nedeniyle derinin büyük bir kısmında bütünlük kaybolur ve bu kayıp büyük sakatlıklara hatta ölüme yol açabilir (7). Deri bütünlüğünün bozulduğu durumlarda; keratinosit, fibroblast, endotel, makrofaj ve trombositleri içeren birçok hücrenin rol aldığı bir süreç başlar. Hücrelerin göç etmesiyle, infiltrasyonu, çoğalmasıyla ve farklılaşmasıyla yeni doku formasyonu oluşur ve sonuçta yara kapanır (5). MiRNA'ların deri yara tamirinde önemli bir role sahip olduğu görülmüştür. Şimdiki bilimsel bulgular göstermiştir ki insan derisinde ve yara bölgesinde çok özgül role sahip miRNA'lar bulunmaktadır. MiRNA'lar; fibroblast ve keratinosit fonksiyonu, apoptoz ve inflamatuvar sürecini kontrol eder (10).

Hızlı ve etkili yara iyileşmesi, komplikasyon riskini azaltmak ve hastanede kalış süresinin uzamasına bağlı olarak hastanın rahatsızlığının artmasını ve günlük yaşamına dönüşünün zorlaşmasını engellemek için önemlidir (35). Günümüzde çok sayıda etkili tedavi yöntemi uygulanmakla birlikte, hala bu yöntemlerin yeterli olmadığı vakalarla karşılaşılabilir. Topikal yolla yara iyileşmesini etkileyen kimyasal, fiziksel ve biyolojik birçok ajan tanımlanmıştır (36). Topikal uygulanan yöntemler arasında larva debridman tedavisi (LDT) yara iyileşmesi patolojisinde kullanılabilirliği araştırılan etkili bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sinek larvalarının yaraları temizlediği ve iyileştirdiği yüzyıllardır bilinmektedir. Wollina ve ark. tarafından, biyocerrahi olarak da adlandırılan LDT; canlılığını yitirmiş dokuyu kaldırmak, enfeksiyon riskini azaltmak ve yara iyileşmesini artırmak için yaraların üzerinde canlı larvaları kullanma olarak tanımlanmıştır (29). *Lucilia sericata* larvaları salgılarında bulunan çeşitli enzimler aracılığıyla nekrotik dokuyu parçalayarak ve sindirerek ortadan kaldırabilmektedir. Ayrıca larva salgısındaki antibakteriyel maddelerin ve enzimlerin etkisiyle yaranın dezenfeksiyonu gerçekleşmekte ve granülasyonu uyaran çeşitli maddelerin, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin etkisiyle de yaranın granülasyonu gerçekleşmektedir (28).

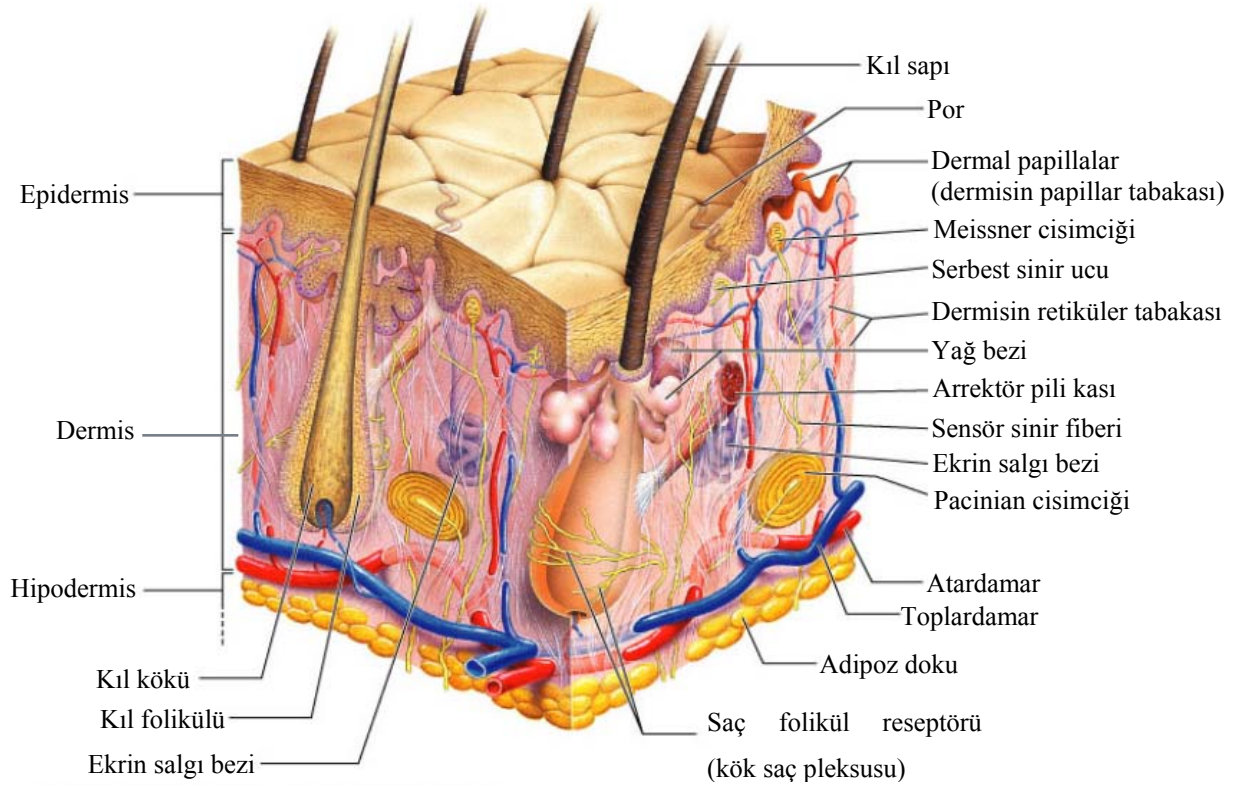
MiRNA'ların yara iyileşmesinin çeşitli fazlarının gerçekleşmesi için gerekli olduğu ve yara iyileşmesini hızlandıran çeşitli tedaviler sonucunda miRNA seviyelerinin değiştiği dikkate alınır, larva salgısının da yara iyileşmesindeki çeşitli fazları etkileyerek iyileşmeyi hızlandırdığı dönemde miRNA'lar üzerine etkisi olabilir. Ancak larvanın yara iyileşmesi süresince hangi miRNA'ların seviyesini değiştirdiğine dair bir çalışma yapılmamıştır. Bu sebeple çalışmamızda; larvaların hangi miRNA'ların ekspresyonunu arttırdığı ya da azalttığı belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Yapısı ve Görevleri

Deri, yetişkin bir insanın toplam vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturan büyük bir organdır. Deri, üç farklı doku tabakasından oluşmuştur: Epidermis, dermis ve hipodermis (Şekil 2-1). Çok sayıda faktör ve kompleks gen regülatör ağını içeren fizyolojik süreçlerle, bu üç tabakanın gelişimi düzenlenir (1). Derinin yapısında kıl folikülleri, yağ ve ter bezleri gibi deri ekleri ile immün hücreler, sinirler ve damarlar yer alır (2).

Deri, insan vücudunun dış yüzeyini sarar ve aynı zamanda çevre ve organizma arasındaki iletişimi sağlar. Vücut için tehlikeli olan yabancı maddelerin girişini engeller. Mekanik sarsılma ve çarpmalara karşı yastık gibi davranarak diğer organların hasar görmesini ve ısı kaybını önler. Ayrıca çevreden gelen uyarıları iletir. İnsan derisinin bariyer olması dışında yağda çözünen bileşikler depo etme görevi de vardır (3).

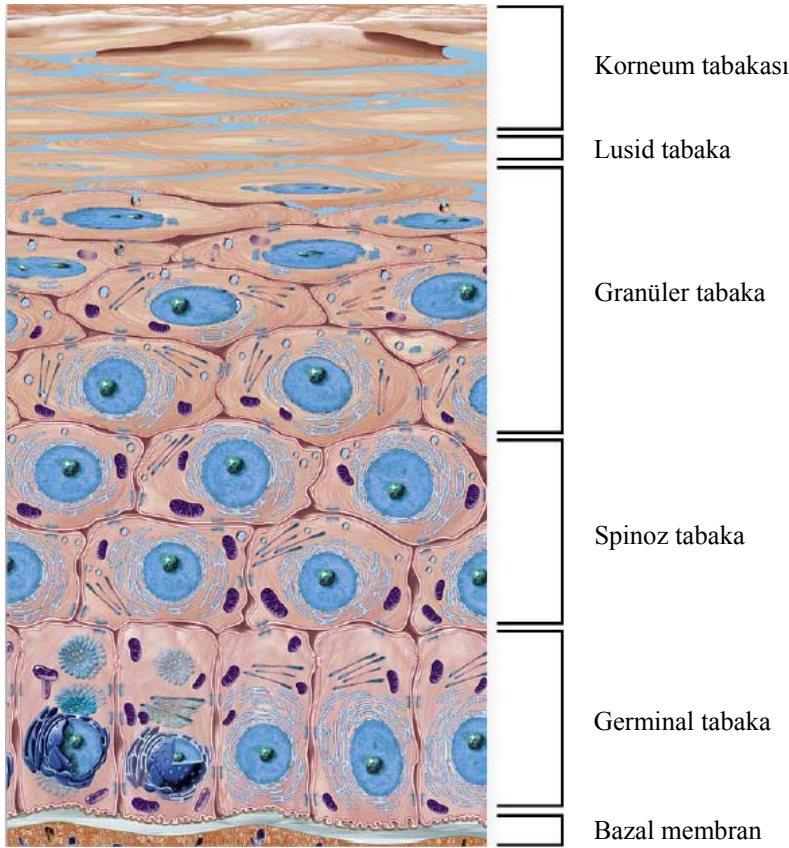


Şekil 2-1: Deri yapısı ve deri ekleri (4).

2.1.1. Epidermis

Epidermal hücrelerin %90-95'ini keratinositler oluşturur. Keratinosit dışında epidermiste Langerhans hücreleri, melanositler ve Merkel hücreleri bulunur.

Epidermis, keratinositlerin yerleşim yerlerine, yapısal özelliklerine, mitotik aktivitelerine ve farklılaşma durumlarına göre, içten dışa; germinal tabaka, spinoz tabaka, granüler tabaka, lüsid tabaka ve korneum tabakası olmak üzere 5 tabakadan (Şekil 2-2) oluşur (5).



Şekil 2-2: Epiderminin tabakaları (5).

Germinal tabaka, mitotik aktivitesi olan keratinositlerin yerleşik olduğu tabakadır. Bu tabakadaki keratinositler 3 farklı yapıda hücre içermektedir: Holoklon, merokrin ve paraklon hücreler. İn vitro olarak holoklon yapısı kanıtlanan hücreler, epidermal kök hücre olarak kabul edilmektedir. Epidermal yaralanmaya cevap olarak bu kök hücreler aktif hale geçer (5).

5-10 sıra yassı hücreden oluşan spinoz tabakadaki hücreler, geniş keratin filamentleri (K5/14, K1/10) içerir. Keratohiyalin (filagrin) ve Odland (lameller lipid)

granülleri aracılığıyla epidermal sağlamlık ve bariyer fonksiyonunda önemli rol oynayan bir tabakadır (5).

Granüler tabaka, nükleus ve diğer hücre organellerinin çözülmeye hazırlandığı bölgedir ve yüksek molekül ağırlıklı keratinlerin (K1/K2, K10/11) oluştuğu tabakadır (5).

Nükleus ve sitoplazmik organeller içermeyen, yassı, ölü, boynuzumsu hücrelerden oluşan korneositlerin, kolesterol sülfatın hidrolizi sonucunda deskuame oldukları kabul edilmektedir (5).

2.1.2. Dermis

Koryum ya da kutis olarak da adlandırılan dermis; ince ve yüzeysel papiller dermis ile kalın ve derinde bulunan retiküler dermis olarak iki kısımdan oluşur. Amorf ara madde, lifler (kollajen, elastik ve retiküler fibriller) ile hücreleri (fibroblast, mast hücresi ve makrofaj gibi) içerir. Matriks ya da temel madde olarak da adlandırılan dolgu maddesi; fibronektin, glikozaminoglikanlar, hiyaluronik asit, kondroitin sülfat ve dermatan sülfattan oluşur. Bu matriks elemanları; fibroblast, mast hücreleri ve düz kas hücreleri tarafından salgılanır ve derinin hidrasyonunu sağlar. Fibroblastlar dermiste en fazla bulunan hücrelerdir. Bu hücreler kollajen, elastin ve mukopolisakkaritleri üretirler. Dermiste en çok bulunan kollajenler ise tip I (%80-90), tip III (%8-12) ve tip V kollajen (%5'den az)'dir. Kollajenin yapısında; glisin, hidrosilizin, hidrosiprolin ve çok büyük oranda prolin aminoasitleri bulunur. Kollajen, bir taraftan kollajenazlar ile parçalanırken, diğer taraftan yeni sentez edilen fibrillerle yer değiştirir (2, 3, 5).

Derinin, besin maddelerini taşıması, artık maddeleri uzaklaştırması, kan basıncını ve ısıyı düzenlemesi için yeterli kan akımına ihtiyacı vardır. Dermis, damar ağlarıyla desteklenmiştir. Arterior fleksusun kollarından biri ter bezlerine, tükrük bezlerine ve kıl köklerine kan taşır. Dermisteki kılcak kan damarları, difüze olan molekülle zenginleştiğinde, sink koşul gerçekleşecek şekilde molekülleri uzaklaştırır (3).

2.1.3. Hipodermis

Subkutis olarak da adlandırılır. Deri altı yağ dokusu ve fibröz trabeküllerden oluşur. Dermiste paralel seyreden bağ dokusu lifleri, bu tabakada deri yüzeyine dik olarak seyreder (septa), buna bağlı olarak bu tabaka, içerisinde yağ hücre

topluluklarından zengin bölmelere (lobül) ayrılmıştır. Bu yağ topluluğuna ‘pannikülüs adipozus’ denir. Bu tabaka damar ve sinir yönünden çok zengindir. Isı kaybını engelleme, travmalara karşı yastık göreviyle birlikte koruma ve yedek besin deposu görevini görür (2).

2.2. YARA İYİLEŞMESİ

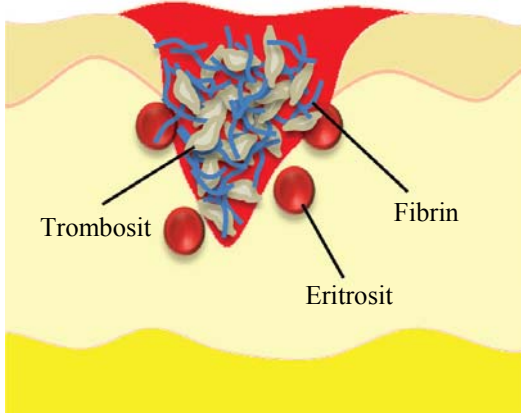
Yara, yumuşak dokuların anatomisinin ve fonksiyonunun bozulmasıdır (6). Yara iyileşmesi, hücresel ve biyokimyasal olayların karşılıklı etkileşimini içeren patofizyolojik ve çok faktörlü dinamik bir süreçtir (5, 7). Yaralanma ya da hastalık nedeniyle derinin büyük bir kısmında bütünlük kaybolur ve bu kayıp büyük sakatlıklara hatta ölüme yol açabilir (7). Deri bütünlüğünün bozulduğu durumlarda; keratinosit, fibroblast, endotel, makrofaj ve trombositleri içeren birçok hücrenin rol aldığı bir süreç başlar. Hücrelerin göç etmesiyle, infiltrasyonu, çoğalmasıyla ve farklılaşmasıyla yeni doku formasyonu oluşur ve sonuçta yara kapanır (5).

Yara iyileşmesi birbiriyle bağlantılı üç evreden oluşur. Bunlar; inflamasyon evresi, proliferasyon evresi ve olgunlaşma evresidir.

2.2.1. İnflamasyon Evresi

Yaralanma sonrasında kan damarlarının bütünlüğü bozulur ve kanama meydana gelir. Kanama ile beraber hemostazın gerçekleşmesiyle yara iyileşmesinin ilk aşaması başlamış olur. Yara meydana geldikten sonra hücreler tromboksan A₂ gibi çeşitli vazoaktif komponentler salgılayarak hasarlanmış damarlarda geçici olarak vazokonstrüksiyona sebep olur (6). Bu şekilde hem kan akım miktarı azaltılarak kan kaybı önlenir, hem de büyüme faktörleri yara bölgesinde tutularak lokal etki yapması sağlanır (6, 8). Vazokonstrüksiyonla eş zamanlı olarak pıhtılaşma mekanizması harekete geçer. Damar dışına çıkan trombositlerin endotel altı kollajenlerle adezyonu gerçekleşir ve trombositler kümeleşir. Trombositler adezyon sırasında aktive olarak yara iyileşmesinin erken ve geç evrelerinde etkili olan çeşitli büyüme faktörlerini, sitokinleri ve pıhtılaşmada görevli faktörleri salgılar. Vazokonstrüksiyondan yaklaşık 20 dk sonra salınan histamin gibi çeşitli komponentler aracılığıyla vazodilatasyonun ve geçirgenlik artışının meydana gelmesiyle kan hücrelerinin diapedezi, sıvı ve proteinlerinin damar dışına çıkışı gerçekleşir (6). Trombin fibrinojeni fibrine dönüştürür ve pıhtı oluşur (9). Pıhtıda fibrin, fibronektin, trombozpondin gibi çeşitli kan proteinleri ile kan hücreleri yer alır (Şekil 2-3). Pıhtıyı oluşturan bu faktörler inflamatuvar reaksiyonu başlatacak

olan büyüme faktörlerini ve sitokinleri salgılar (6). Oluşan bu pıhtı kontaminasyonu, vücut sıvı kaybını önlediği gibi oluşturduğu geçici matriks ile hücrelerin göç etmesini ve ekstrasellüler matriksin sentezini sağlar (6, 9).

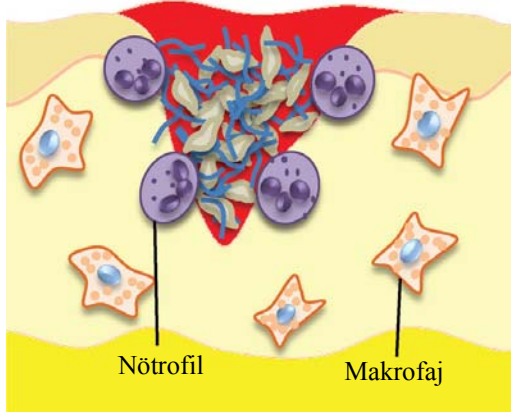


Şekil 2-3: Homeostaz

İncinmeden hemen sonra, kan elemanları hasarlı damarlardan salınır. Bunu takiben, hüresel faktör salınımına yanıt olarak vazokonstriksiyon meydana gelir. Trombositler, yara içerisine depolanmış pıhtıyı oluşturmak için fibrinle küme oluşturur (10).

Zarar görmüş ya da aktive olmuş parankimal hücreler, koagülasyon ve aktive olmuş kompleman yolağı tarafından çeşitli vazoaktif komponentler ve kemotaktik faktörler üretilir. Bu maddelerin aracılığıyla yara bölgesine ilk olarak lökositler gelir (7). Travmayı takiben ilk birkaç saat ile 6 saat arasında yara bölgesine gelen ilk lökosit nötrofillerdir (6). Nötrofil sayısı 24. ve 48. saatler arasında en fazla seviyeye ulaşır (9). Nötrofiller salgıladıkları proteazlarla nekrotik dokuyu ve önceden var olan ekstrasellüler matriksi parçalar (6). Yara bölgesindeki ölü dokuyu, yabancı partikülleri ve bakterileri fagositozla ortadan kaldırarak yara bölgesini temizler (6, 9). Nötrofiller birçok proinflamatuvar sitokinin önemli bir kaynağıdır. Nötrofillerin yara bölgesine gelmesinden kısa bir süre sonra monositler yara bölgesine ulaşır ve aktive olarak doku makrofajlarına dönüşür (Şekil 2-4). Nötrofiller gibi makrofajlar da ölü doku, bakteri ve yabancı maddeleri fagosit ederler. 48. ve 72. saatler arasında en fazla sayıya ulaşırlar (9). Enfeksiyon bulunmadığı takdirde 3. günden sonra eskarla nötrofillerin sayısı azaltılır ya da makrofajlar tarafından fagosit edilir (7). Makrofajlar ekstrasellüler matriksin düzenlenmesinde, büyüme faktörlerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin

salgılanmasında rol oynar (8, 9). Yapılan çalışmalarda makrofajların inflamasyon ve onarım evreleri arasındaki geçişte önemli bir role sahip olduğu görülmüştür (7).

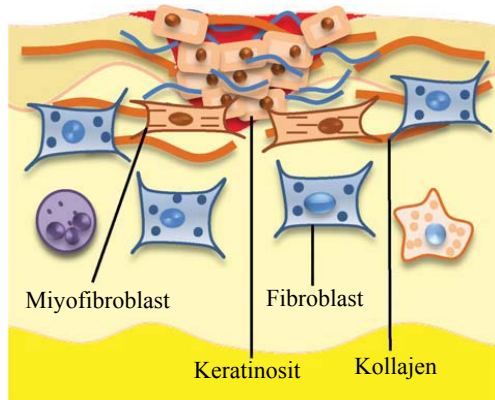


Şekil 2-4: İnflamasyon

Çeşitli kemotaktik faktörler, yara bölgesine nötrofil ve monositleri çeker. Bu hücreler yara debridmanı, büyüme faktör salınımı ve ekstrasellüler matriks (ECM) organizasyonundan sorumludur (10).

2.2.2. Proliferasyon Evresi

Proliferasyon evresi inflamasyonu takiben yaklaşık olarak 3. gün ile 5. gün arasında yaradaki kan pıhtısı, ölü doku, yabancı partiküller ve enfeksiyon gibi bariyerler kalktıktan sonra başlar. Bu evrenin karakteristik özellikleri fibroblastların hâkim olması, yarada granülasyon dokusunun oluşması, epitelizasyon ve yara kontraksiyonudur (Şekil 2-5) (6).



Şekil 2-5: Proliferasyon

Fibroblastlar kollajen ve diğer ECM komponentleri salar, miyofibroblastlar yara kontraksiyonuna sebep olur ve keratinositler yara yüzeyini re-epitelize eder. Ayrıca, vaskular ağı onarmak ve yara bölgesini doldurmak için anjiyogenez yer alır (10).

Granülasyon Dokusunun Oluşumu

Yeni oluşan kapillerler sebebiyle granüler görünümünde olan yeni stroma genellikle granülasyon dokusu olarak adlandırılır ve yaralanmanın yaklaşık 4. gününde yara boşluğunda oluşmaya başlar. Aynı esnada makrofajlar, fibroblastlar ve kan damarları yara boşluğuna doğru hareket eder. Makrofajlar fibroplazi ve anjiyogenezin uyarılması için gerekli olan büyüme faktörlerinin devamlı kaynağı olarak iş görür. Fibroblastlar hücre çoğalması ve büyümesini desteklemek için gerekli olan ECM elemanlarının sentezini sağlar. Kan damarları ise hücre metabolizmasını desteklemek için gerekli olan oksijeni ve besinleri taşır (7).

Fibroplazi: Kollajen sentezleyen fibroblastların yara kenarlarından köken alarak yara bölgesine göç ederek çoğalmaları, kollajenin sentezlenmesi ve kollajenin yara bölgesinde birikmesi sürecine denmektedir. Fibroblastlar yaralanmadan sonraki 3-4. günlerde görülür, 7. günde en fazla seviyeye ulaşır ve 15-21. güne kadar yarada aktif olarak yer alır. Fibroblastlar bağ dokuyu çevreleyen farklılaşmamış mezenkimal hücrelerden ve perivasküler adventisyadan kökenini alır (6).

İnflamatuvar evre sırasında ekstrasellüler fragmentlerden ve inflamatuvar hücrelerden salınan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), transforming büyüme faktörü β (TGF- β), bağ doku büyüme faktörü (CTGF), C5a (komplement elemanı 5a), fibronektin gibi aracı moleküller fibroblastları uyarır ve fibroblastların yaraya göç etmesini sağlar (6, 8, 9). Fibrin pıhtı içindeki lifler ve yeni oluşan kapillerler boyunca sitoplazmik uzantılar oluşturarak fibroblastlar yaranın içine doğru hareket eder (6). Ayrıca fibroblast hareketinde gerekli olan kollajenaz-1 (MMP-1), kollajenaz-3 (MMP-13), plazminojen aktivatörü gibi fibroblast kaynaklı enzimler de bu süreçte yer alır (11).

Fibroblastlar fibrin pıhtısını geçici matriks olarak kullanır. Geçici matriks fibronektin-laminin, hyaluronik asit ve kollajenden meydana gelen gevşek bir yapıya sahip ECM ile yer değiştirir (6). Yaralanmadan sonraki 4-5. günlerde PDGF, TGF- β , EGF, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), FGF-2, CTGF gibi büyüme faktörlerinin etkisiyle tropokollajen molekülleri ECM'ye bırakılır ve olgunlaşmamış kollajen fibrilleri birbirleriyle çapraz bağlanarak olgun kollajen oluşur (6, 9).

Yara merkezindeki asidik ortam ve düşük oksijen miktarı fibroblast çoğalmasını uyarır ve fibroblastlar en çok bu ortamda matriks proteinlerini sentezler. Yeni damar

oluşumuyla yara merkezindeki oksijen arttığından dolayı fibroblastların çoğalması da azalır (6).

Anjiyogenez: Yara bölgesinde var olan endotel hücrelerden yeni kan damarlarının oluşmasına denmektedir. Yara iyileşmesinde fibroblastların proliferasyon süreci ile paralel olarak gelişir (6). Yüksek miktardaki laktat, azalmış pH ve düşük oksijen basıncı gibi doku çevresindeki değişiklikler anjiyogenezi uyardığı gibi yara iyileşmesinin inflamatuvar evresinde üretilen vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), FGF, TGF- β ve anjiyopoietin gibi çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler de anjiyogenezi uyarır ve düzenler (9).

Anjiyogenez için endotel hücreleri göç etmelidir. Endotel hücreleri salgıladıkları kollajenaz, plazminojen aktivatörü ve stromelizin gibi aracı moleküllerle venül bazal membranı parçalar. Parçalanmış bazal membran aralıklarından endotel hücreler psödopodlar oluşturarak perivasküler alana çıkar ve salgıladıkları proteolitik enzimlerle kapiller ucunda bulunan endotel hücreleri yara içine doğru hareket ederler. Ardı ardına dizilerek kapiller tomurcuklanmayı oluştururlar. Diğer yönlerden gelen tomurcuklarla birleşip kapiller dallanmayı oluşturur ve sonuçta kapiller ağı meydana gelir (6).

Epitelizasyon

Epitelizasyon, yaralanmadan sonra derinin bariyer özelliğinin yeniden kazandırılması amacıyla epitel hücrelerinin ayrılmasını, göç etmesini, çoğalmasını, organize ve keratinize olmasını kapsayan bir süreçtir. Yaralanmada bazal membran zarar görmediyse epitelizasyon yara kenarındaki sağlam epitel hücrelerinden, kıl folikülü ve ter bezi gibi epidermal oluşumlardan köken alır. Tam kalınlıktaki açık yaralarda ise bazal membran zarar gördüğünden epitelizasyon sadece yara kenarındaki sağlam epitel hücrelerinden köken alır (6).

Yaranın epitelizasyonu yaralanmadan saatler sonra başlar (11). Keratinositler bazal epidermal hücrelerini oluşturmak için göç etmelidir. Bunun için de fenotipik değişime uğrarlar. Keratinositler yalnızca canlı yüzeyler üzerinde göç edebildiklerinden yaralanmadan hemen sonra oluşan pıhtı epitelizasyon için geçici bir engel oluşturur. Keratinositler tip V kollajeni nötral proteazlar, plazminojen aktivatörü, kollajenaz ve fibronektin üreterek epitelizasyon sürecine katkıda bulunur. Kollajenaz ve diğer proteazlar pıhtı ile canlı yüzey arasındaki bağlantıyı ayırır. Bu şekilde keratinositlere göç etmek için zemin hazırlanmış olur. Fibronektin de keratinositlerin yara tabanına

doğru göç etmesine yardımcı olur. Serbest yara kenarlarından başlayan epitelizasyon, iki taraftan göç e başlayan keratinositlerin birbirleriyle karşılaşıp kontakt inhibisyon yapmalarına kadar devam eder (6). Granülasyon tabakası olarak adlandırılan bu tabakadaki hücreler mitoz girer ve yeni oluşan hücreler dış yüzeye doğru ilerler ve çok katlı epiteli oluşturur. En dış tabakadaki epitel keratinize olarak epidermise dayanıklılık kazandırır.

Enfeksiyon ve yara kabuğunun olmadığı yaralarda, nemli ortam ve yeterli oksijenlenmenin sağlandığı durumlarda keratinositlerin göçü ve çoğalması en yüksek seviyededir (6).

Yara Kontraksiyonu

Defektin kapatılmasını kolaylaştırmak için yarayı çevreleyen tam kalınlıktaki yara dudaklarının merkeze doğru hareketi sonucu yara büyüklüğünün azalmasıdır. Kontraksiyon yarananmadan sonraki 5-15. günlerde en fazla seviyededir (6).

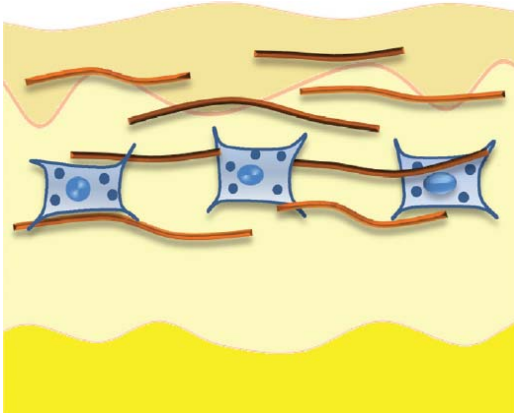
Yara iyileşmesi esnasında matriksin birikmesi ve fibroblastlarda protein sentezinin sona ermesinden sonra fibroblastlarda fenotipik değişikler meydana gelir ve fibroblastlar miyofibroblastlara dönüşür. Miyofibroblastlar düz kas hücreleri ve fibroblastların özelliklerini gösterir (6). Miyofibroblastlar hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantıları yapar ve aktin-içeren mikrofilamentleri aracılığıyla kasılır. Bu şekilde yaranın kontraksiyonu gerçekleşir (7).

Kontraksiyon yara dudakları birbirleriyle temas sağladıklarında, miyofibroblastların gerilim kuvvetinin yarayı çevreleyen derinin gerilim kuvvetine eşit olduğunda ve miyofibroblastlarda yapısal bir bozukluk olduğunda durur. Granülasyon dokusu eğer tam kalınlıktaki greft veya flep ile kapatılırsa ve açık yaralar mekanik olarak hareketsizleştirilirse yara kontraksiyonu engellenir. Yaraların şekline göre yara kontraksiyonu ve skarı değişir. Dairesel yaralar üçgen, dörtgen gibi yaralardan yaklaşık %30 daha yavaş büzüşerek iyileşir (6).

2.2.3. Olgunlaşma Evresi

Haftalar, aylar hatta yıllar boyunca süren yara iyileşmesinin bu son evresinde granülasyon dokusu skar dokusuna dönüşür ve ECM olgunlaşır (şekil 2-6) (6, 9). Bu evrede yara bölgesindeki fibroblastların sayısı azalır, kollajen üretimi dengeye ulaşır, epitelizasyon tamamlanır, yara rengi soluklaşır, yara gerilim direnci artar, skar

dokusunun hacmi azalır ve sonuçta iyileşmiş bir skar dokusu oluşur. Bu evre boyunca fazla sayıda hücre ve damarsal yapıya sahip granülasyon dokusu yavaş bir şekilde şekil ve yapısını değiştirir ve daha az hücre ve damara sahip bir skar dokusuna dönüşür. Hücrelerin azalması apoptozla ya da hücrelerin yara dışına göç etmesiyle olur (6). Hyaluronik asit kondritin sülfat ve dermaten sülfata dönüşür. Kollajenlerin yeniden düzenlenmesinde kollajenaz rol alır (8). Granülasyon evresinde sentezlenen kollajen III'ün yerini kollajen I alır (12). Kollajen başta incedir. Kollajen fibrilleri çapraz bağlanır ve oluşan kollajen demetleri gelişir ve kalınlaşır. Deri yüzeyine paralel bir şekilde yeniden düzenlenir. Bu değişikliklerden sonra yara gerilim kuvveti artar. Skar dokusu ilk hafta yaranın en son kazanacağı direncin %3'üne sahipken, üçüncü haftada %30, üçüncü ay ve sonrasında %80 direnç kazanır (6).



Şekil 2-6: Olgunlaşma

Fibroblastlar, kollajen sentezi ve yıkımını içeren ECM'nin kompozisyonundaki değişikliklerden sorumludur. Yaralanmış derinin bütünlüğünü iyileştirmek için yara kapanmasından sonra bu olay devam eder (10).

2.3. MİKORNA

MikroRNA'lar (miRNA), küçük (~22 nükleotid uzunluğunda) kodlanmayan tek iplikli RNA molekülüdür (1). Transfer RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) gibi kodlanmayan RNA'ların görevleri anlaşıldığında görülmüştür ki diğer kodlanmayan RNAlar, birçok insan geninin post-transkripsiyonel düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu esas olarak, RNA'nın iki formu tarafından gerçekleştirilir: small interfering RNAlar (siRNAlar) ve mikroRNAlar (miRNAlar)'dır. Kodlanmayan bu RNA'lar gen ekspresyonunun birçok alanını kontrol ettiği görülmektedir. Transkriptomun %30'undan daha etkili olduğu görülen miRNA'lar, insan genom

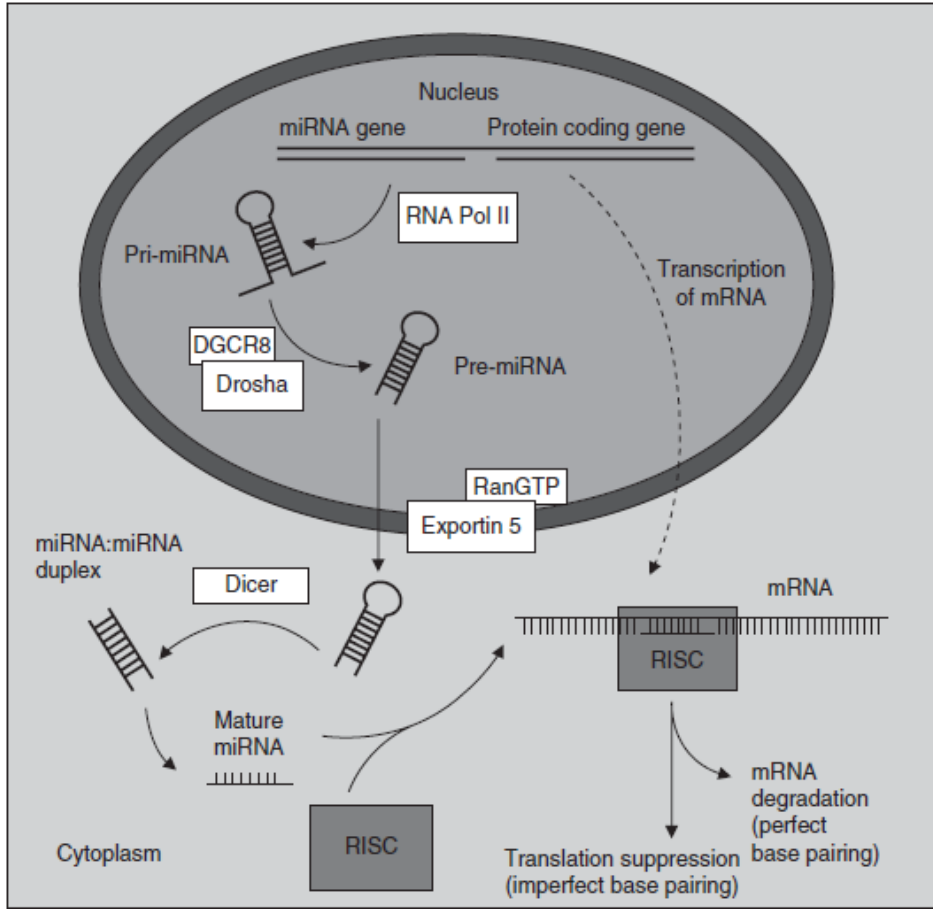
kodunun %3 civarının olduğu tahmin edilmektedir (10). MiRNA'lar genelde hedef mRNA'nın 3'UTRsine bağlanırlar. Ya hedef mRNA'yı degrade ederek ya translasyonu bloke ederek ya da her ikisini birden yaparak post-transkripsiyonel gen düzenlenmesini indükleme yeteneğindedirler (1).

2.3.1. Tarihçe

MiRNA'lar ilk kez *Caenorhabditis elegans*'ın larval gelişimiyle ilgili yapılan çalışmalarda 1993 yılında keşfedilmiştir. Lee ve ark., *C. elegans*'ta bulunan heterokronik gen lin-4'ün 22 ve 61 bazlık protein kodlamayan RNA çiftini kodladığını ve bu küçük RNA'ların lin-14'ün 3'UTR'sindeki bazı tekrar dizilerle komplementer olduğunu ve RNA-RNA etkileşimiyle lin-4'ün lin-14 proteinini negatif olarak düzenlediğini bulmuştur (13). *C. elegans*'ın larval gelişiminde görevli başka bir küçük RNA olan 21 bazlık heterokronik let-7'nin de lin-41'in 3'UTR'ye komplementer olup negatif olarak düzenlediği Reinhart ve ark. tarafından 2000 yılında bulunmuştur (14). Aynı yıl let-7 geninin birçok hayvanda korunduğu bulunmuştur (15). 2001 yılında Science dergisinde yayınlanan 3 yayında bu küçük kodlanmayan düzenleyici RNA'lar ilk defa "mikroRNA" olarak isimlendirildi (16-18).

2.3.2. MikroRNA Biyogenezi ve Fonksiyonu

MiRNA'lar, birbirini izleyen ve üç basamaktan oluşan işlem süreci sonucunda meydana gelir. İlk basamak; nukleusta miRNA genlerinin transkripsiyonuyla birincil transkript (pri-miRNA)'in oluşumunu içerir. İkinci basamak; nukleusta pri-miRNA'ların öncül miRNA (pre-miRNA)'lara dönüşümünü içerir. Üçüncü basamak ise; sitoplazmaya geçen pre-miRNA'lardan olgun miRNA'ların oluşumunu içerir (Şekil 2-7) (19).



Şekil 2-7: MiRNA biyogenezi ve transkripsiyon sonrası susturma mekanizmasının şematik özeti.

DGCR8= DiGeorge kritik bölgesi 8; mRNA= mesajcı RNA; pre-miRNA = öncül miRNA; pri-miRNA = primer miRNA; RanGTP= guanozin trifosfat bağlayan Ran; RISC = RNA ile indüklenmiş susturma kompleksi; RNA Pol II =RNA polimeraz II (10).

İnsanlarda genomik DNA'daki miRNA'ları kodlayan genlerin transkripsiyonu RNA polimeraz II enzimi tarafından nukleusta gerçekleşir. 500-3000 baz uzunluğunda ve ayrıca 5' cap (şapka) ve 3' poly A kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısında olan bu molekül pri-miRNA olarak adlandırılır. RNaz III ailesine ait bir endonükleaz olan Drosha ile çift iplikli RNA bağlayıcı protein olan DGCR8 (DiGeorge kritik bölgesi 8; *C elegans* ve *Drosophila*'da Pasha olarak bilinir) bir araya gelerek mikroişlemci kompleksini oluşturur. Oluşan bu kompleks pri-miRNA'yı keserek yaklaşık 70 nükleotidli pre-miRNA'yı oluşturur, Ran-GTP bağımlı eksportin-5 aracılığıyla pre-miRNA nukleustan sitoplazmaya taşınır. RNaz III ailesine ait bir endonükleaz olan Dicer ve transaktivasyondan sorumlu RNA bağlayıcı protein (TRBP)'in oluşturduğu kompleks pre-miRNA'nın sap-ilmliğini keserek 18-24 nükleotidli çift zincirli miRNA:

miRNA* dubleksini meydana getirir. Dicer bu esnada RNA ile indüklenmiş susturma kompleksi (RISC)'nin oluşumunu başlatır. RISC'in katalitik komponentleri argonaut proteinleridir. Bu proteinler miRNA'nın bağlanması sırasında özgül mRNA'yla ilişki kurar ve yardımcı proteinlerin aktivitesini kolaylaştırır. RISC aracılığıyla miRNA: miRNA* dubleksini birbirinden ayırır. 5' ucu daha kararlı olanı RISC'e dâhil olur ve bu iplik kılavuz olarak adlandırılır. Kılavuz miRNA'ya eşlenik diziyi içeren iplik de yolcu ya da anti-kılavuz olarak adlandırılır. Genelde yolcu zincir RISC'in substratı olarak sindirilir. MiRNA RISC'e dâhil olduktan sonra hedef mRNA'ya bağlanarak yapısındaki argonaute proteinleri aracılığıyla mRNA'nın yıkılmasına ya da protein sentezinin baskılanmasına yol açar. Hayvanlarda, miRNA'lar genellikle eksik baz eşleşmesi durumunda transkriptin 3'-UTR'lerine bağlanarak protein sentezini baskılar. Bununla birlikte, kusursuz ya da kusursuza yakın baz eşleşmesi durumunda, miRNA'lar hedef mRNA'nın 3'-UTR'lerini ikiye ayırır ve parçalar (10, 19-21).

MiRNA gen kopya sayısındaki değişiklikler, miRNA öncüllerinin mutasyonu, histon deasetilasyonu ve miRNA öncüllerinin hipermetilasyonu miRNA ekspresyonunun transkripsiyonel öncesi düzenlenmesini etkileyebilir. Transkripsiyonel öncesi ve sonrası miRNA düzenlenmesi genellikle özgül değildir. Buna karşın transkripsiyonel seviyesinde miRNAların düzenlenmesi özgüldür ve özgül miRNA'ların ekspresyonunu düzenleyen birçok transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır (10).

2.3.3. MikroRNA ve Yara İyileşmesi

MiRNA'nın hatalı ekspresyonu ve miRNA'nın hedef yerlerinin kazanılması veya kaybı, patolojik durumlar ve hastalık süreçleri ile ilişkilendirilmiştir. MiRNA'ların deri yara tamirinde önemli bir role sahip olduğu görülmüştür. Şimdiki bilimsel bulgular göstermiştir ki insan derisinde ve yara bölgesinde çok özgül role sahip miRNA'lar bulunmaktadır (Tablo 2-1). MiRNA'lar; fibroblast ve keratinosit fonksiyonu, apoptoz ve inflamatuvar sürecini kontrol eder (10). Örneğin; inflamasyonu kontrol eden ilk bulunan miRNA vaskular hücre adezyon molekülü (VCAM-1)'ün inhibitörü olan miR-126'dır. Endotel hücrelerde miR-126'nın azalması VCAM-1'in ekspresyonda artışa sebep olmuştur, bu da lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunu arttırmıştır (22). *In vivo* ve *in vitro* olarak miR-21'in yara alanına doğru fibroblastların göçünü hızlandırdığı bulunmuştur (23). Tili ve ark. miR-125b'nin tümör nekrozis faktörü- α (TNF- α)'ya bağlanarak transkripsiyon sonrası baskılanmayı sağladığını rapor

etmişlerdir (24). miR-29'un sistemik sklerozda fibrogenezin düzenleyicisidir. miR-29a'nın kollajen tip I ve III'ün ekspresyonunu negatif yönde etkiler (25). miR-92a'nın endotel hücrelerinde fazlaca eksprese edilir ve anti-anjiyogenik etki gösterir. Limb iskemi ve miyokardiyal infarktüs fare modelinde miR-92a inhibe edildiğinde damar büyümesinin arttığı görülmüştür (26).

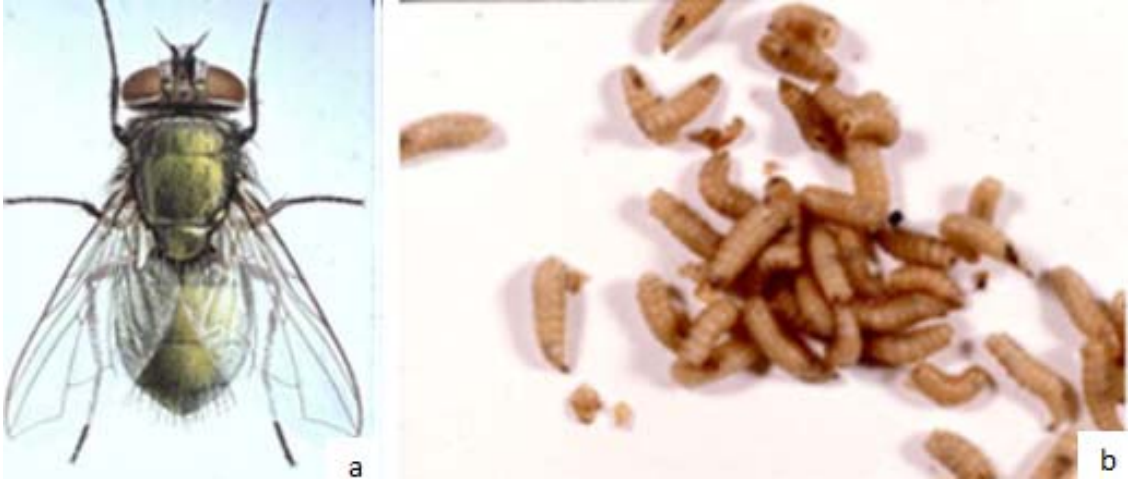
Tablo 2-1: Deri yara tamirinde olası rolleriyle miRNAlar

miRNA	Fonksiyonu
miR-125b	İmmün hücre toplanmasını etkileyen TNF- α ekspresyonunu düzenler.
miR-126	EC'ye lökosit adherensini etkileyen VCAM-1 ekspresyonunu düzenler.
miR-31, miR-17-3p	EC'ye lökosit adherensini etkileyen E-selektin ve ICAM-1 ekspresyonunu düzenler.
miR-223	Granülopoiez ve olgun nötrofil aktivitesini etkiler.
miR-21, miR-155, miR-424, miR-17-92	Monositik farklılaşmayı etkiler.
miR-29a/b/c	Dermal fibroblast-aracılı fibrozisi düzenler.
miR-203	Keratinosit proliferasyonu ve farklılaşmasını düzenler ve keratinosit immünomodulator hareketine katılır.
miR-210	Keratinosit proliferasyonunu düzenler.

EC= Endotelyal hücre; ICAM-1 = Hücrelerarası adezyon molekülü-1; TNF- α = Tümör nekrozis faktör- α ; VCAM-1= Vasküler hücre adezyon molekülü-1 (10).

2.4. LUCİLİA SERİCATA

Yeşil şişe camı sineği veya yeşil et sineği olarak da bilinen *Lucilia sericata*'nın erişkini, metalik yeşil veya mavimsi yeşil renkte olup 5-10 mm büyüklüğündedir. Bu sinek türünün yaşam evresi yumurta, larva (I., II. ve III. dönem), pupa ve erişkin şeklindedir (Şekil 2-8). Yumurtaları soluk sarımsı-beyaz renktedir. Boyu 16 mm olan III. dönem larvalarında 12 segment bulunmaktadır. Posteriyor stigmalarında bulunan peritremleri dar ve kapalıdır (27).



Şekil 2-8: a) *Lucilia sericata*, b) *Lucilia sericata* larvaları (28).

L. sericata, doğal yaşamında yumurtalarını insanların ve hayvanların çürüyen, habis iltihaplı açıktaki yaralarına; ayrıca kokuşmuş ve çürümeye başlamış cesetlerin üzerine bırakır. Yumurtadan çıkan larvalar bu habis iltihaplı, kokuşmuş ve çürümeye başlamış dokularla beslenir. Bu beslenme esnasında larvalar canlı ve sağlıklı dokulara saldırmaz. Bu özelliğinden dolayı *L. sericata*'nın I. ve II. dönem larvaları zor iyileşen kronik yaraların tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (27).

2.4.1. Yaşam Döngüsü

L. sericata otojenöz bir tür olup yumurtalarını oluşturmadan önce proteinli besinlere ihtiyaç duyar. Proteinli besinlerin varlığında erişkin dişi sinekler hayatları boyunca üçer gün aralıklarla ortalama 225-250 yumurta bırakırlar. Yumurtadan çıkan larvalar; I. dönemi 22 saat, II. dönemi 15 saat ve III. dönemi ise ortalama 43 saatte tamamlarlar. Pupa öncesi safha yaklaşık olarak 100 saat ve pupa dönemi de ~192 saat sürmektedir. Buna göre, *L. sericata*'nın yaşam döngüsü 25 °C'de yaklaşık 16 gün sürmektedir (27).

2.4.2. LDT

Wollina ve ark. tarafından, biyocerrahi olarak da adlandırılan larva debridman tedavisi (LDT); canlılığını yitirmiş dokuyu kaldırmak, enfeksiyon riskini azaltmak ve yara iyileşmesini artırmak için yaraların üzerinde canlı larvaları kullanma olarak tanımlanmıştır. *Lucilia sericata* Baer'in zamanından beri kullanılmaktadır (29).

Larvaların en etkili olması için optimal bir sıcaklığına (vücut sıcaklığı), oksijen kaynağına ve nemli yara ortamına ihtiyaç vardır (30). Bu sebeple tedavi sırasında hava geçirgenliğini sağlayacak pansuman uygulanmalı ve yaranın nemli kalması sağlanmalıdır.

LDT; bacak ülseri, bası yarası, ampütasyon bölgeleri, diyabetik ayak ülseri, birincil yanık, kronik osteomyelit, yumuşak doku enfeksiyonu ve kangren gibi durumlarda kullanılmaktadır (29).

2.4.2.1. LDT'nin Tarihçesi

Sinek larvalarının yaraları temizlediği ve iyileştirdiği yüzyıllardır bilinmektedir (29). Bu larvaların yara üzerindeki yararlı etkileri ilk olarak Fransız cerrah Ambroise Paré tarafından 1559 yılında keşfedilmiştir (28, 29). Napolyon'un ordusunda başhekim olarak görev yapan Fransız cerrah Baron Larrey 1829 yılında larvalar tarafından enfekte olmuş yaralarda granülasyon dokusunu iyileştirdiğini ve iyileşmeyi hızlandırdığını keşfetmiştir (29). Amerikan İç Savaşı'nda görevli olan Dr. Joseph Jones, yaralardaki larvaların yalnızca ölü dokuları tahrip ettiğini ve canlı dokulara ise zarar vermediklerini fark etmiştir (31). Amerikan İç Savaşı sırasında cerrah olan J F Zacharias, ilk defa resmi olarak larva uygulamasını belgelemiştir (32). Baer 1917'de Birinci Dünya Savaşı'nda yer alan 2 askerdeki larvaların etkisini gözlemlemiştir (29). Aynı yıl açık kırıkların ve mide yaralarının tedavisini rapor etmiştir (32). Baer 1931 yılında larva tedavisi olarak da bilinen LDT'yi tanımlamıştır (28).

Baer tarafından LDT'nin yaygınlaşmasına takiben, larvalar Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Avrupa'nın her yerinde tüm çeşitli yaralarda bulunmaya başladı (iatrojenik olarak). Antibiyotiklerin ve özellikle Chain ve ark. tarafından penisilinin gelişimiyle yara bakımı için larvaların kullanımında dramatik bir düşüş kaydedilmiştir. Yara bakım tekniklerinin gelişmesi larvalara son darbeyi vurmuştur. Nigam ve ark., bakteriyel direncin (özellikle metiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)) gelişiminden ve kronik yaraların etkin bakımındaki başarısızlığından sonra larvaların ikinci dirilişinin gerçekleştiğini kaydetmiştir. Nigam ve ark., ayrıca geniş kapsamlı bir makalede yara iyileşmesi sırasında yer alan kompleks olaylar dizisini detaylandırmış, *Lucilia sericata*'nın yaşam döngüsünü iyi bir şekilde hesaplamış ve LDT için en sık kullanılan sinek larvası olduğunu belirtmişlerdir (29).

Türkiye’de ise LDT ilk defa 2002’de Tanyüksel ve ark tarafından GATA’da uygulanmaya başlamıştır (28). İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri binasında TÜBİTAK Biyoterapi Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı kurulmuştur ve 2007’den beri burada LDT’ye devam edilmektedir.

2.4.2.2. LDT’nin Etki Mekanizması

LDT’nin etki mekanizması 3 başlık altında toplanabilir:

1-) Debridman: *Lucilia sericata* larvaları, ağzındaki çengeller ve salgılarında bulunan çeşitli proteolitik enzimler aracılığıyla nekrotik dokuyu parçalar ve kısmi sindirilmiş nekrotik dokuyu besin olarak kullanarak ortadan kaldırırlar (28).

2-) Dezenfeksiyon: Larva salgısında yer alan antibakteriyel maddelerin etkisiyle ve proteolitik enzimlerin bakterileri parçalamasıyla yaranın dezenfeksiyonu gerçekleşir (28). Ayrıca larva salgısının yaranın pH’sını değiştirmesi (33) ve larva sindirim kanalının değişen pH’sı bakterilerin ölümüne neden olur (28).

3-) Granülasyonun başlaması: Larva salgısında granülasyonu uyaran çeşitli maddeler, büyüme faktörleri ve sitokinler bulunur. Larva salgısındaki bazı maddelerin yaranın pH’sını değiştirmesi de granülasyonu uyarıcı bir etki gösterir (28, 33).

2.4.2.3. Larva Salgısı

Livingston larvaların “aktif madde”sini tanımlamıştır. Aktif madde topikal ya da aşı olarak kullanılmış ancak aşılamanın zararlı olduğu görülmüştür. Ayrıca karakterizasyonu yapılmıştır. Livingston, larva ekstratının sülfidril radikalleri, allantoin, kalsiyum, sistein, glutatyon ve “embriyonik büyümeyi uyarıcı maddeler”i içerdiğini buldu. Prete aktif maddenin daha ileri karakterizasyonunu gerçekleştirmiş ve *Lucilia sericata*’nın hemolimf ve sindirimsel salgılarının in vitro olarak insan fibroblastlarında büyümeyi uyardığını göstermiştir (30). Larvaların üre, amonyum ve kalsiyum karbonat ürettiği bulunmuştur. Debridman mekanizmasının anlaşılması için yapılan çalışmalarla larvaların beslenirken karboksipeptidaz A ve B, lösinaminopeptidaz, kollajenaz ve serin proteaz (tripsin ve kimotripsin benzeri enzimler) gibi sindirim enzimlerini ortama saldırdığı bulunmuştur (29). Antibakteriyel aktiviteye sahip iki bileşik bulunmuştur: fenilasetik asit ve fenilasetaldehit (30). Chambers’ın yaptığı bir çalışmayla larvaların nekrotik ve enfekte yaralara girip kimotripsin ve tripsin benzeri aktiviteleri içeren salgısını salmasıyla ECM komponentlerinin yeniden düzenlenmesini sağlayarak yara

iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini bulmuştur (34). *Lucilia sericata* larva salgılarının içerdiği moleküller Tablo 2-2’de gösterilmiştir.

Tablo 2-2: *Lucilia sericata* larva salgılarının içerdiği moleküller (29, 30, 34)

Sülfidril radikalleri
Allantoin
Kalsiyum
Sistein
Glutasyon
Üre
Amonyum
Kalsiyum karbonat
Karboksipeptidaz A ve B
Metalloproteinaz (Lösinaminopeptidaz, aminopeptidaz)
Kollajenaz
Serin proteinaz (Tripsin ve kimotripsin benzeri enzimler, trombin, plazmin, kallikrein, elastaz, ürokinaz)
Sistein proteinaz (Papain)
Fenilasetik asit
Fenilasetaldehit

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2011/153 no'lu kararla onaylanmıştır. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı Üretim bölümünden 10 adet sağlıklı, Wistar albino türü, yetişkin, erkek, 250-300 gr ağırlığında sıçanlar temin edildi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında bakımı yapıldı ve hayvan deneyleri 25 Haziran 2012 – 16 Ağustos 2012 tarihleri arasında yürütüldü. Sıçanlar 21-24 °C'de (oda sıcaklığında), 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık fotoperiyodunda, polikarbon yapılı sıçan kafeslerinde bireysel olarak, %18-20 protein içeren pelet sıçan yemi ve su ile ad-libitum olacak şekilde beslenerek muhafaza edildi.

3.1. Hayvan Deneyi Planı

Her grupta 5'er adet olmak üzere sıçanlar rastgele olarak tedavi ve kontrol grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı. Tedavi grubunun yaralarına topikal olarak *Lucilia sericata* larva salgısı uygulanmışken kontrol grubuna bidistile su uygulanmıştır.

3.2. Deney Protokolü

Sıçanlara her operasyon öncesinde 10 mg/kg dozda ksilazin HCl (Rompun, %2, Bayer) ve 50 mg/kg dozda ketamin HCl (Ketalar, 10 ml, Pfizer) anestezisi intraperitoneal yolla uygulandı. Her bir sıçanın sırt bölgesi tıraş edildi ve sonrasında povidon iyot ile temizlendi. Sonra bir levhanın rehberliğinde 1,5 cm çapında sirküler 4 adet alan çizildi (Şekil 3-1) ve cerrahi makas aracılığıyla tam kat yara modeli oluşturuldu (Şekil 3-2). Yaraların ikisi orta hattın sağ üst ve sağ alt kısmına diğer ikisi sol üst ve sol alt kısmına açıldı.



Şekil 3-1: Sıçanın sırt bölgesi tıraşlandıktan sonra steril koşullarda yara alanının belirtilmesi.



Şekil 3-2: Sıçanın sırt bölgesine steril koşullarda yara modelinin oluşturulması.

Her hayvanın yarasına birer tane olmak üzere steril koşullarda, uygun boyut ve sayıda cerrahi süngerler (Spongostan®) hazırlandı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde bulunan TÜBİTAK Biyoterapi Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı'ndan steril *Lucilia sericata* larvaları temin edildi. II. dönem sonu - III. dönem başına ait larvalar 1 ml bidistile suda 250 adet olacak şekilde steril cam kaba konularak oda sıcaklığında 1 saat bekletildi (37). Larva salgısı insülin enjektörüyle toplandı ve her süngere 50 µl olacak şekilde emdirildi. Tedavi grubundaki 5 sıçanın yaralarına larva salgısı emdirilmiş süngerler yerleştirildi. Negatif kontrol olarak her süngere 50 µl olacak şekilde bidistile

su emdirildi ve bu emdirilmiş süngerler kontrol grubundaki 5 sıçanın yaralarına yerleştirildi. Tüm sıçanların cerrahi süngerlerinin üzeri steril gazlı bez ile kapatılıp hareketini kısıtlamayacak şekilde flaster ile bandajlandı. Her bir sıçan, üzeri kodlanmış bireysel kafeslere yerleştirildi.

3.3. Yara İyileşmesinin İzlenimi

İlk gün (0. gün) alınan deri biyopsileri sham grubu olarak histopatolojik incelemeler için kullanıldı. Yaraların fotoğrafları çekildi. Her bir sıçanın yaraları fizyolojik tuzlu su (FTS) ile temizlenmesinden sonra yara alanlarına emdirilmiş cerrahi süngerler yerleştirildi.

4., 7. ve 10. gün her hayvandaki belli bir yaradan bir miktar sağlıklı dokuyu da içerecek şekilde biyopsi alındı. Yara bölgesini içerecek şekilde bisturi yardımıyla bir kısmı histopatolojik inceleme için ayrılırken bir kısmı da moleküler genetik analizi için ayrıldı. Yaraların fotoğrafları çekildikten sonra her bir yara FTS ile temizlendi ve 4. ve 7. günde yaralara, emdirilmiş sünger kullanıldı. 10. günde deney sonlandırıldı.

Deneylerde yapılan işlemler Tablo 3-1’de özetlenmiştir.

Tablo 3-1: Hayvan Deneyleri Uygulamasının Özeti

Grup	Gün	Fotoğraf Çekimi	Larva Salgısı Uygulaması	Bidistile Su Uygulaması
Tedavi	0	✓	50 µl/YB	×
	4	✓	50 µl/YB	×
	7	✓	50 µl/YB	×
	10	✓	×	×
Kontrol	0	✓	×	50 µl/YB
	4	✓	×	50 µl/YB
	7	✓	×	50 µl/YB
	10	✓	×	×

YB: Yara başına.

3.4. Histopatolojik İnceleme

Sıçanlara ait doku örnekleri %10'luk nötral formalin içerisinde tespit edildi. Rutin doku takip işlemleri sonrasında parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlığında elde edilen kesitler, Hemotoksilen-Eozin (H-E) ve Azan ile boyanarak ışık mikroskobu (Olympus BX61) ile görüntülenip mikroskop kamerası (Olympus DP72) ile fotoğraflandı. H+E ile boyanan kesitlerin genel görünümleri değerlendirildi. Azan ile boyanan kesitlerde ise epitel rejenerasyonu ve fibröz değerlendirmeleri yapıldı.

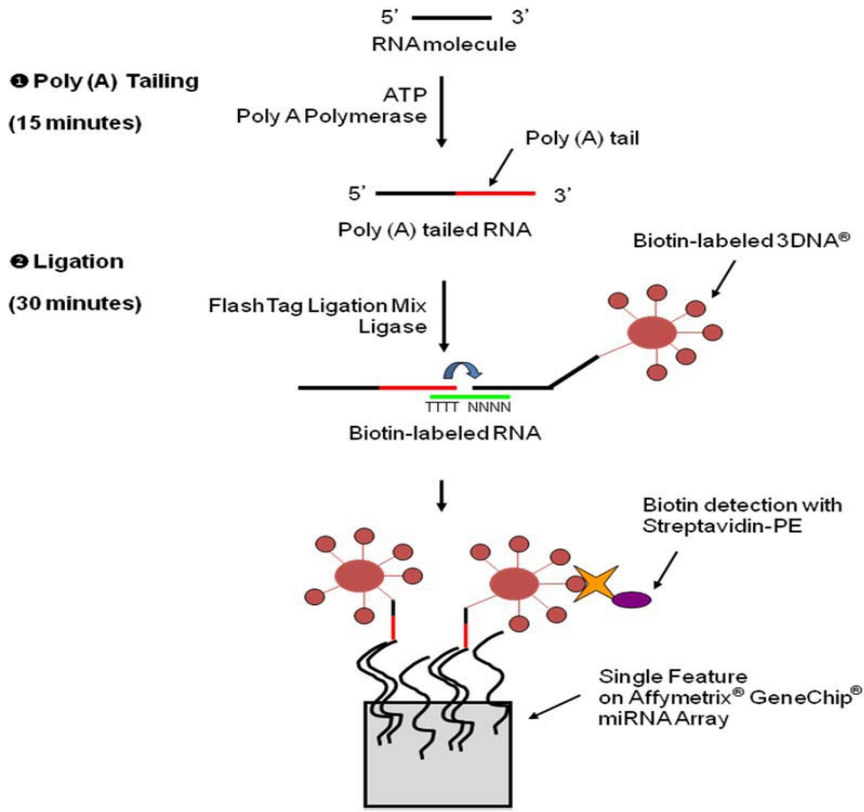
3.5. Moleküler Genetik Analizi

Sıçanlardan alınan doku örnekleri DNaz ve RNaz içermeyen 1,5 ml'lik ependorflara konulup analiz gününe kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Toplanan dokular İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp AD'ye soğuk zincirle ulaştırıldı. MiRNA profilinin taranması için mikrodizin analizi (GeneChip miRNA 2.0 Array, Affymetrix) yapıldı.

3.5.1. Mikrodizin Analizi ile miRNA Profilinin Taranması

FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit (Affymetrix) protokolü (Şekil 3-3) aşağıdaki basamaklardan oluşur:

1. RNA Hazırlanması
2. Poly(A) Kuyruğu eklenmesi
3. Ligasyon
4. Hibridizasyon
5. Yıkama-Boyama-Tarama.



Şekil 3-3: FlashTag™ HSR Protokolü

3.5.1.1. RNA Hazırlanması

Ambion PureLink RNA Kit ile RNA izole edildi ve RNA konsantrasyonu ölçülerek çalışmaya uygun olması teyit edildi. Analiz gününe kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

Dokudan RNA İzolasyonu

- Dokular, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılıp, oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı.
- Dokular homojenize edilmesi için pens yardımıyla homojenizasyon tüpüne ("bead"li tüplere) aktarıldı ve üzerine 600 μl . tissue lysis buffer eklendi.
- Tüpler homojenizatörde (MagNA Lyser Green Beads) 6.500 speed'de 1 dakika homojenize edildi.
- Homojenizatörden çıkarılan tüpler cold block'ta 3-5 dakika (köpükleri gidinceye kadar) bekletildi ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de de bekletilebilir.)

- Homojenat (600µl) temiz ependorflara aktarıldı. Üzerine %70 lik etanol (600µl) eklendi. (1+1 etanol eklendiğinden baştaki hacim kadar eklendi.) Ve karışım vortekslendi.
- Bu karışımın içinden 700 µl. alınıp spin kolonlara aktarıldı. 13.000 RPM’de 15 sn. santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri değiştirildi. Bir önceki aşamada kalan homojenat filtreli tüpe aktarıldı. 13.000 RPM’de 15 sn. santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri değiştirildi ve üzerine 700µl Wash Buffer I eklendi. 13.000 RPM’de 15 sn. santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri değiştirildi ve üzerine 500µl Wash Buffer II ilave edildi. 13.000 RPM’de 15 sn. santrifüj edildi (Wash Buffer II, 60ml. Ethanol ile sulandırılarak hazırlandı).
- Aynı işlem bir kez daha tekrar edildi.
- Toplama tüpleri atıldı. Filtreler ependorflara yerleştirildi ve üzerine 30µl RNase Free Water eklenerek RNA çözüldü ve 1-2 dk. beklendikten sonra 13.000 RPM’de 2 dakika santrifüj edilerek RNA’nın çökmesi sağlandı.
- Elde edilen RNA -80 °C’de saklandı.

RNA Konsantrasyonunun Ölçümü

- NanoDrop Spektrofotometre kullanılarak, elde edilen RNA’ların konsantrasyonları ölçüldü. RNA’lar konsantrasyonları 100 ng/µl olacak şekilde dilüe edildi.

3.5.1.2. Poly(A) Kuyruğu eklenmesi

- Bu aşama RNA molekülünün 3’ ucuna Poly(A) kuyruğu ekleme aşamasıdır (Tablo 3-2) ve buz üzerinde yapılır.
- 8 µl RNA üzerine 2 µl RNA Spike Control Oligos eklendi.
- ATP karışımı 1 mM’lık Tris ile dilüe edildi.

Dilüsyon için kullanılan formül:

$$1000 / \dots \mu\text{g başlangıç total RNA}$$

ÖRNEK: Başlangıç miktarı 2 µg olan RNA örneği için;

1000/2=500 bu durumda bu örnek için ATP karışımı 1’e 500 oranında dilüe edildi.

- Poly(A) kuyruğu ekleme master mixi hazırlandı, 5 µl master mix RNA örneklerine eklendi ve 15 dakika 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3-2: Poly (A) kuyruğu eklenmesinde kullanılan malzemelerin miktarı

Kullanılan Malzemeler	Miktarlar
RNA Spike Control Oligos	2,0 µl
ATP Karışımı (Dilüe Edilmiş)	1,0 µl
PAP Enzimi	1,0 µl
10X Reaksiyon Tamponu	1,5 µl
25 mM MnCl ₂	1,5 µl
Toplam Hacim (total RNA dahil)	15 µl

3.5.1.3. FlashTag™ Biotin HSR Ligasyon

- Bu aşamada örneklere biyotinli DNA'nın ligasyonu sağlandı (Tablo 3-3).
- İnkübe edilen örnekler buz üzerinde bekletildi.
- 4 µl 5X FlashTag Ligation Mix Biotin her örneğe eklendi.
- 2 µl T4 DNA Ligaz enzimi eklendi ve 25 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresi dolduktan sonra reaksiyonu durdurmak için son olarak 2,5 µl Stop Solution eklendi ve ligasyon evresi tamamlandı.

Tablo 3-3: Ligasyon aşamasında kullanılan malzemelerin miktarı

Kullanılan Malzemeler	Miktarlar
5X FlashTag Ligation Mix Biotin	4,0 µl
T4 DNA Ligase	2,0 µl
Stop Solution	2,5 µl
Toplam Hacim (poly-a tailed RNA dahil)	23,5 µl

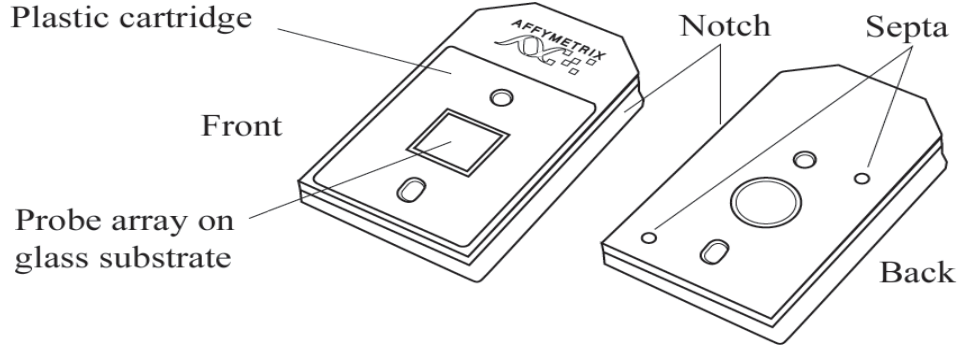
3.5.1.4. Hibridizasyon

- Bu aşama örneklerin array içine yüklenmeden önceki son aşamasıdır.
- Tamamen çözünen 20X Eukaryotic Hybridization Controls 65 °C'de 5 dakika inkübe edildi.
- Tablo 3-4'te verilen hibridizasyon karışımı hazırlanıp 21,5 µl olan biotin-labeled örnekler üzerine eklendi ve array hibridizasyon kokteyli hazırlandı.

Tablo 3-4: Hibridizasyon aşamasında kullanılan malzemeleri miktarı

Kullanılan Malzemeler	Miktarlar
2X Hibridizasyon Mix	50 µl
%27.5 Formamide	15 µl
DMSO	10 µl
20X Eukaryotic Hyb. Controls	5 µl
Control Oligonucleotide B ₂ , 3nM	1,7 µl
Toplam Hacim	103,2 µl

- 99 °C’de 5 dakika, 45 °C’de 5 dakika inkübe edildi. Bu sırada hibridizasyon fırını 48 °C’ye ısıtıldı.
- Örnekler array içine yüklendi ve 48 °C’de 60 rpm’de 16 saat boyunca array içindeki oligomerlere hibridize olması beklendi.



Şekil 3-4: Affymetrix GeneChip® Probe Array.

3.5.1.5. Yıkama-Boyama-Tarama

- 16 saat sonunda array hibridizasyon fırınından (Affymetrix) alındı ve bilgisayara bağlı olan yıkama istasyonunda array için uygun protokol seçildi. Gerekli tampon ve solüsyonlarla yıkama ve boyama yapıldı.
- Yıkama-boyama protokolü tamamlanan array alındı ve tarayıcıya kondu. Tarama sonucunda analiz için gerekli olan ham veri elde edildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel inceleme için, GraphPad Prism 5 İstatistik paket programı kullanıldı. Tedavi ve kontrol grubuna ait mikrodizin verileri istatistiksel t-testi kullanılarak karşılaştırıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Kontrol grubuna göre tedavi grubunun ekspresyon seviyesinin kat değişim eşiği 1,5 olarak alındı ve kat değişimi denklem 3-1 (38)’e göre hesaplandı:

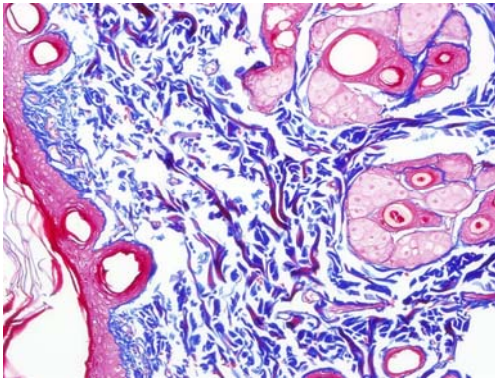
$$\text{Kat değişimi} = \begin{cases} T/K, T/K \geq 1 \text{ ise} & (3-1) \\ -K/T, T/K < 1 \text{ ise} \end{cases}$$

T: Tedavi grubu; K: Kontrol grubu.

4. BULGULAR

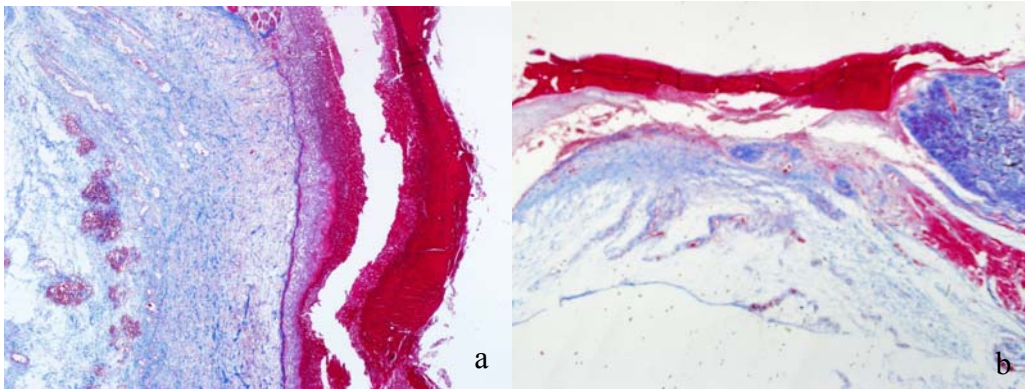
4.1. Histopatolojik Değerlendirme

Mikroskopik incelemeler sonucunda, sham grubuna ait örneklerde histolojik yapının korunduğu gözlemlendi. Epidermal hücre tabakaları belirgin, dermis bağ doku elemanları düzgün, kollajen lif demetleri organize, kıl kökleri, yağ ve ter bezleri uygun yerleşimlerindeydi (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: Sham grubuna ait deri kesiti.

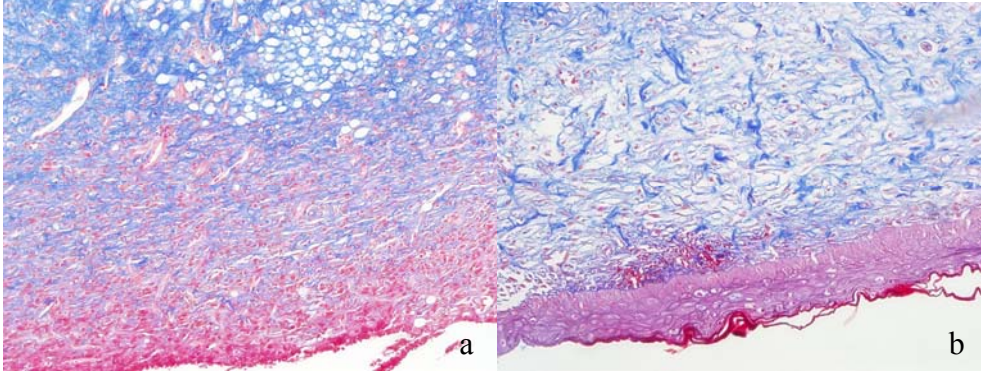
Yara iyileşmesinin 4. gününde kontrol ve tedavi gruplarında yaraya bağlı doku hasarı oldukça belirgindi. Dermis içerisinde yaygın bir inflamasyon tespit edildi. Kollajen lif yapılarında belirgin bir disintegrasyon, yoğun inflamatuvar hücre ve yoğun anjiyogenez sahaları gözlemlendi. Epidermis oldukça haraplanmıştı (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: Yara iyileşmesinin 4. gününe ait yara kesitleri

a- Kontrol grubu, b- Tedavi grubu.

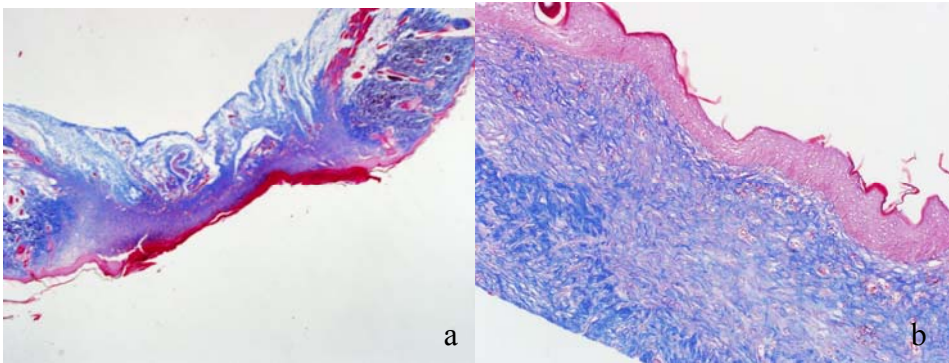
Yara iyileşmesinin 7. gününde kontrol ve tedavi gruplarında inflamasyon ve anjiyogenezin hala belirgin olduğu görüldü. Kollajen liflerindeki artış her iki grupta da görülmekle birlikte tedavi grubunda daha yoğundu. Tedavi grubunda kollajen liflerinin lif demetlerini yapmaya başlaması kayda değerdi. Epitelizasyon kontrol grubunda hala belirgin bir hasar ile seyrederken tedavi grubunda önemli ölçüde tamamlanmıştı. Hücre yapıları düzgündü ve hücre tabakaları oldukça seçilir haldeydi (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: Yara iyileşmesinin 7. gününe ait yara kesitleri

a- Kontrol grubu, b- Tedavi grubu.

Yara iyileşmesinin 10. gününde kontrol ve tedavi grubunda inflamasyon ve anjiyogenez önemi ölçüde azalmış olarak bulundu. Kollajen lif yapıları belirgin, yer yer demetler yapmış durumda ve organizeydi. Kontrol grubunda epitelizasyon tamamlanmamışken tedavi grubunda epitelizasyon oldukça iyiydi. Hücreler uygun morfolojide ve tabakalar belirgindi (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: Yara iyileşmesinin 10. gününe ait yara kesitleri

a- Kontrol grubu, b- Tedavi grubu.

4.2. MikroRNA Mikrodizin Analizi

MikroRNA mikrodizin analizleri yara iyileşmesinin 4., 7. ve 10. günleri dikkate alınarak tedavi grubu ile kontrol grubu arasında gerçekleştirilmiştir. 389 olgun miRNA'nın analizi yapılmıştır.

Yara iyileşmesinin 4. gününde tedavi ve kontrol grubundaki miRNA'ların ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, 316 miRNA'da anlamlı değişim gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre tedavi grubunda 158 miRNA'nın ekspresyonu artmışken 158 miRNA'nın ekspresyonu azalmıştır. Kontrol grubuna göre tedavi grubunun kat değişimleri incelendiğinde, 30 miRNA'nın ekspresyonunda $\geq 1,5$ kat artış gözlenmişken (Tablo 4-1), 24 miRNA'nın ekspresyonunda da $\geq 1,5$ kat azalma gözlenmiştir (Tablo 4-2).

Tablo 4-1: Yara iyileşmesinin 4. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda ekspresyonu anlamlı olarak artan miRNA'lar

Transkript ID	p Değeri	Kat Değişimi
rno-let-7a	0,001	2,47
rno-miR-181b	0,001	2,11
rno-miR-543	0,001	2,05
rno-miR-421	0,001	1,99
rno-miR-449a	0,001	1,90
rno-miR-211	0,001	1,86
rno-miR-105	0,001	1,85
rno-miR-196b	0,001	1,83
rno-miR-150	0,001	1,82
rno-miR-346	0,001	1,80
rno-miR-324-5p	0,001	1,77
rno-miR-207	0,001	1,77
rno-miR-1	0,001	1,76
rno-miR-99a*	0,001	1,76
rno-miR-365	0,001	1,73
rno-miR-504	0,001	1,73
rno-miR-154	0,001	1,70
rno-miR-190b	0,001	1,69
rno-miR-7b	0,001	1,69
rno-miR-206	0,001	1,67
rno-miR-92b	0,001	1,66
rno-miR-181d	0,001	1,64
rno-miR-541	0,001	1,60
rno-miR-349	0,001	1,59

rno-miR-466b	0,001	1,58
rno-let-7i	0,001	1,53
rno-miR-872	0,001	1,53
rno-miR-20b-5p	0,001	1,53
rno-miR-25	0,001	1,51
rno-miR-291a-5p	0,001	1,50

p<0,05; Kat değışimi ≥1,5

Tablo 4-2: Yara iyileşmesinin 4. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda ekspresyonu anlamlı olarak azalan miRNA'lar

Transkript ID	p Değeri	Kat Değışimi
rno-miR-133b	0,001	-2,48
rno-miR-378	0,001	-2,42
rno-miR-25*	0,001	-2,35
rno-miR-1224	0,001	-2,23
rno-miR-196a*	0,001	-2,05
rno-miR-21*	0,001	-2,01
rno-miR-135b	0,001	-1,95
rno-miR-29a	0,001	-1,92
rno-miR-181a	0,001	-1,92
rno-miR-678	0,001	-1,80
rno-miR-193*	0,001	-1,79
rno-miR-327	0,001	-1,78
rno-miR-20a*	0,001	-1,78
rno-miR-494	0,001	-1,77
rno-miR-133a	0,001	-1,73
rno-miR-101a	0,001	-1,70
rno-miR-296*	0,001	-1,67
rno-miR-205	0,001	-1,67
rno-miR-761	0,001	-1,63
rno-miR-125b-3p	0,001	-1,63
rno-miR-542-3p	0,001	-1,62
rno-miR-32	0,001	-1,60
rno-miR-666	0,001	-1,58
rno-miR-22*	0,002	-1,57
rno-miR-183	0,001	-1,53
rno-miR-24	0,001	-1,51
rno-miR-19a	0,001	-1,51

p<0,05; Kat değışimi ≥1,5.

Yara iyileşmesinin 7. gününde tedavi ve kontrol grubundaki miRNA'ların ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, 291 miRNA'da anlamlı değışim gözlenmiştir.

Kontrol grubuna göre tedavi grubunda 139 miRNA'nın ekspresyonu artmışken 152 miRNA'nın ekspresyonu azalmıştır. Kontrol grubuna göre tedavi grubunun kat değişimleri incelendiğinde, 8 miRNA'nın ekspresyonunda $\geq 1,5$ kat artış gözlenmişken (Tablo 4-3), 5 miRNA'nın ekspresyonunda da $\geq 1,5$ kat azalma gözlenmiştir (Tablo 4-4).

Tablo 4-3: Yara iyileşmesinin 7. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda ekspresyonu anlamlı olarak artan miRNA'lar

Transkript ID	p Değeri	Kat Değişimi
rno-miR-29b	0,001	1,92
rno-miR-340-3p	0,001	1,87
rno-miR-301a	0,001	1,83
rno-miR-449a	0,001	1,70
rno-miR-25*	0,001	1,65
rno-miR-465	0,001	1,59
rno-miR-346	0,001	1,54
rno-miR-26b*	0,001	1,51

p<0,05; Kat değişimi $\geq 1,5$.

Tablo 4-4: Yara iyileşmesinin 7. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda ekspresyonu anlamlı olarak azalan miRNA'lar

Transkript ID	p Değeri	Kat Değişimi
rno-miR-295	0,001	-1,69
rno-miR-296	0,001	-1,65
rno-miR-188	0,001	-1,54
rno-miR-20b-5p	0,001	-1,52
rno-miR-221	0,001	-1,52

p<0,05; Kat değişimi $\geq 1,5$.

Yara iyileşmesinin 10. gününde tedavi ve kontrol grubundaki miRNA'ların ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, 317 miRNA'da anlamlı değişim gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre tedavi grubunda 157 miRNA'nın ekspresyonu artmışken 160 miRNA'nın ekspresyonu azalmıştır. Kontrol grubuna göre tedavi grubunun kat değişimleri incelendiğinde, 26 miRNA'nın ekspresyonunda $\geq 1,5$ kat artış gözlenmişken (Tablo 4-5), 11 miRNA'nın ekspresyonunda da $\geq 1,5$ kat azalma gözlenmiştir (Tablo 4-6).

Tablo 4-5: Yara iyileşmesinin 10. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda ekspresyonu anlamlı olarak artan miRNA'lar

Transkript ID	p Değeri	Kat Değişimi
rno-miR-34c*	0,001	11,54
rno-miR-207	0,001	2,59
rno-miR-328	0,001	2,11
rno-miR-204*	0,001	2,04
rno-miR-711	0,001	2,01
rno-miR-466c	0,001	1,96
rno-miR-181b	0,002	1,89
rno-miR-483	0,001	1,81
rno-miR-350	0,001	1,81
rno-miR-211	0,001	1,79
rno-miR-23a*	0,001	1,79
rno-miR-30b-5p	0,003	1,77
rno-miR-214	0,001	1,76
rno-miR-667	0,001	1,74
rno-miR-342-3p	0,001	1,63
rno-miR-129	0,001	1,62
rno-miR-206	0,001	1,62
rno-miR-125a-3p	0,001	1,61
rno-miR-19b	0,001	1,60
rno-miR-329	0,001	1,55
rno-miR-30d*	0,001	1,53
rno-miR-221	0,001	1,52
rno-miR-31	0,001	1,52
rno-let-7d*	0,001	1,52
rno-miR-7b	0,001	1,51
rno-miR-1224	0,001	1,50

p<0,05; Kat değişimi \geq 1,5.

Tablo 4-6: Yara iyileşmesinin 10. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda ekspresyonu anlamlı olarak azalan miRNA'lar

Transkript ID	p Değeri	Kat Değişimi
rno-miR-320	0,001	-2,56
rno-miR-505	0,001	-1,96
rno-miR-210	0,001	-1,88
rno-miR-101a*	0,001	-1,76
rno-miR-216a	0,001	-1,74
rno-miR-26a	0,001	-1,70
rno-miR-133a	0,001	-1,61
rno-miR-374	0,001	-1,56

p<0,05; Kat değişimi \geq 1,5.

Yara iyileşmesinin 4., 7. ve 10. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda $\geq 1,5$ kat ve üzeri değişim gösteren miRNA'lar Tablo 4-7'de birlikte gösterilmiştir.

Tablo 4-7: Kontrol grubuna göre tedavi grubunda anlamlı değişen genlerin kat değişimine göre tüm gün birlikte gösterilmesi

Transkript ID	4. gün	7. gün	10. gün
rno-miR-301a	Green	Green	Red
rno-miR-324-5p	Green	Green	Red
rno-miR-327	Red	Red	Green
rno-let-7d*	Green	Red	Green
rno-miR-328	Green	Green	Green
rno-miR-329	Green	Red	Green
rno-miR-340-3p	Green	Green	Red
rno-miR-342-3p	Red	Red	Green
rno-miR-346	Green	Green	Red
rno-miR-349	Green	Green	Green
rno-miR-129	Red	Red	Green
rno-miR-20a*	Red	Green	Red
rno-miR-350	Green	Red	Green
rno-miR-135b	Red	Green	Red
rno-let-7a	Green	Green	Green
rno-let-7i	Green	Red	Green
rno-miR-7b	Green	Green	Green
rno-miR-19b	Red	Red	Green
rno-miR-19a	Red	Red	Green
rno-miR-21*	Red	Green	Green
rno-miR-22*	Red	Red	Green
rno-miR-23a*	Red	Red	Green
rno-miR-24	Red	Red	Green
rno-miR-25*	Red	Green	Green
rno-miR-25	Green	Red	Red
rno-miR-26a	Red	Red	Red
rno-miR-26b*	Red	Green	Green
rno-miR-29b	Red	Green	Green
rno-miR-29a	Red	Red	Green
rno-miR-30b-5p	Green	Red	Green
rno-miR-30d*	Green	Red	Green
rno-miR-31	Green	Green	Green
rno-miR-32	Red	Red	Red
rno-miR-34c*	Red	Green	Green
rno-miR-99a*	Green	Red	Green
rno-miR-101a*	Red	Green	Red

rno-miR-101a	Red	Red	Green
rno-miR-125a-3p	Dark Red	Dark Red	Light Green
rno-miR-125b-5p	Dark Red	Dark Red	Dark Green
rno-miR-125b-3p	Red	Light Green	Dark Green
rno-miR-133a	Red	Dark Red	Red
rno-miR-150	Light Green	Dark Green	Red
rno-miR-154	Light Green	Dark Red	Dark Green
rno-miR-181a	Red	Red	Dark Green
rno-miR-181b	Light Green	Dark Red	Light Green
rno-miR-183	Red	Dark Green	Dark Red
rno-miR-193*	Red	Red	Red
rno-miR-196a*	Red	Dark Red	Dark Red
rno-miR-204*	Dark Red	Dark Green	Light Green
rno-miR-205	Red	Red	Dark Red
rno-miR-206	Light Green	Dark Red	Light Green
rno-miR-210	Dark Green	Dark Green	Red
rno-miR-211	Light Green	Dark Red	Light Green
rno-miR-214	Red	Dark Green	Light Green
rno-miR-216a	Dark Green	Dark Red	Red
rno-miR-221	Dark Red	Red	Light Green
rno-miR-291a-5p	Light Green	Dark Red	Dark Red
rno-miR-296*	Red	Dark Green	Dark Green
rno-miR-296	Dark Red	Red	Light Green
rno-miR-320	Dark Red	Dark Red	Red
rno-miR-196b	Light Green	Dark Red	Dark Red
rno-miR-421	Light Green	Dark Red	Dark Green
rno-miR-449a	Light Green	Light Green	Dark Red
rno-miR-365	Light Green	Red	Dark Red
rno-miR-207	Light Green	Dark Green	Light Green
rno-miR-483	Dark Green	Red	Light Green
rno-miR-1	Light Green	Dark Red	Dark Green
rno-miR-133b	Red	Dark Green	Dark Green
rno-miR-543	Light Green	Dark Red	Dark Red
rno-miR-541	Light Green	Dark Red	Dark Red
rno-miR-542-3p	Red	Dark Red	Dark Red
rno-miR-494	Red	Light Green	Dark Red
rno-miR-374	Light Green	Dark Red	Red
rno-miR-363*	Dark Red	Dark Red	Red
rno-miR-20b-5p	Light Green	Red	Dark Red
rno-miR-378	Red	Dark Red	Dark Red
rno-miR-505	Light Green	Dark Green	Red
rno-miR-466b	Light Green	Dark Green	Dark Red
rno-miR-466c	Dark Red	Dark Green	Light Green
rno-miR-872	Light Green	Dark Green	Dark Green

rno-miR-181d	Green	Red	Green
rno-miR-188	Red	Red	Red
rno-miR-190b	Green	Green	Red
rno-miR-375	Red	Red	Red
rno-miR-92b	Green	Green	Red
rno-miR-652	Green	Red	Red
rno-miR-105	Green	Green	Green
rno-miR-1224	Red	Red	Green
rno-miR-504	Green	Red	Red
rno-miR-295	Red	Red	Green
rno-miR-465	Red	Green	Green
rno-miR-667	Red	Green	Green
rno-miR-761	Red	Red	Green
rno-miR-666	Red	Green	Red
rno-miR-678	Red	Red	Green
rno-miR-711	Red	Green	Green

Kontrol grubuna göre tedavi grubunda kat artışı olan genler yeşil, kat azalması gösterenler kırmızı renkle belirtilmiştir ($p < 0,05$, Kat değişimi $\geq 1,5$).



-1,5

1,5

5. TARTIŞMA

MiRNA, küçük (~22 nükleotid uzunluğunda) kodlanmayan tek iplikli RNA molekülüdür (1). MiRNA'lar genelde hedef mRNA'nın 3'UTR'sine bağlanırlar. Ya hedef mRNA'yı degrade ederek ya translasyonu bloke ederek ya da her ikisini birden yaparak post-transkripsiyonel gen düzenlenmesini indüklemeye yeteneğindedirler (1). MiRNA'nın hatalı ekspresyonu ve miRNA'nın hedef yerlerinin kazanılması veya kaybı, patolojik durumlar ve hastalık süreçleri ile ilişkilendirilmiştir (10).

Yara, yumuşak dokuların anatomisinin ve fonksiyonunun bozulmasıdır (6). Yara iyileşmesi, hücrel ve biyokimyasal olayların karşılıklı etkileşimini içeren patofizyolojik ve çok faktörlü dinamik bir süreçtir (5, 7). Deri bütünlüğünün bozulduğu durumlarda; keratinosit, fibroblast, endotel, makrofaj ve trombositleri içeren birçok hücrenin rol aldığı bir süreç başlar. Hücrelerin göç etmesiyle, infiltrasyonu, çoğalmasıyla ve farklılaşmasıyla yeni doku formasyonu oluşur ve sonuçta yara kapanır (5). Deride ve yara bölgesinde çok özgül role sahip miRNA'lar bulunmaktadır. MiRNA'lar; fibroblast ve keratinosit fonksiyonu, apoptoz ve inflamatuvar sürecini kontrol eder (10).

Hızlı ve etkili yara iyileşmesi, komplikasyon riskini azaltmak ve hastanede kalış süresinin uzamasına bağlı olarak hastanın rahatsızlığının artmasını ve günlük yaşamına dönüşünün zorlaşmasını engellemek için önemlidir (35). Günümüzde çok sayıda etkili tedavi yöntemi uygulanmakla birlikte, hala bu yöntemlerin yeterli olamadığı vakalarla karşılaşılabilir. Topikal yolla yara iyileşmesini etkileyen kimyasal, fiziksel ve biyolojik birçok ajan tanımlanmıştır (36). Topikal uygulanan yöntemler arasında larva debridman tedavisi (LDT) yara iyileşmesi patolojisinde kullanılabilirliği araştırılan etkili bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Wollina ve ark. tarafından, biyocerrahi olarak da adlandırılan LDT; canlılığını yitirmiş dokuyu kaldırmak, enfeksiyon riskini azaltmak ve yara iyileşmesini artırmak için yaraların üzerinde canlı larvaları kullanma olarak tanımlanmıştır (29). *Lucilia sericata* larvaları, salgılarında bulunan çeşitli enzimler aracılığıyla nekrotik dokuyu parçalayarak ve sindirerek ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca larva salgısındaki antibakteriyel maddelerin ve enzimlerin etkisiyle yaranın dezenfeksiyonu gerçekleşmekte ve granülasyonu uyaran çeşitli maddelerin, büyüme faktörlerinin ve

sitokinlerin etkisiyle de yaranın granülasyonu gerçekleşmektedir (28). Larvaların yaraları iyileştirdiğine dair çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Larvaların bazı büyüme faktörlerinin seviyesini değiştirerek yaraları iyileştirdiğine dair bulgular olsa da mekanizma açık değildir. Karmaşık bir süreç olan yara iyileşmesinde rol alan genler tanımlanmakla birlikte bu süreç içerisinde bunların nasıl düzenlendiği ve larvaların bu sürece nasıl katkıda bulunduğu halen bilinmemektedir. Genlerin transkripsiyonel olarak düzenlenmesinde görevli olan miRNA'ların yara iyileşmesinin çeşitli fazlarının gerçekleşmesi için gerekli olduğu ve yara iyileşmesini hızlandıran çeşitli tedaviler sonucunda miRNA seviyelerinin değiştiği dikkate alınır, larva salgısının da yara iyileşmesindeki çeşitli fazları etkileyerek iyileşmeyi hızlandırdığı dönemde miRNA'lar üzerine etkisi olabilir. Literatüre baktığımızda larva salgısının miRNA'lara olan etkisiyle ilgili yayın bulunmamaktadır. Bu sebeplerden dolayı, larvaların hangi miRNA'ların ekspresyonunu değiştirdiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç için Wistar Albino sıçan kullanılarak tedavi ve kontrol grubu oluşturuldu ve sıçanların sırt bölgesine tam kat yara defekti oluşturuldu. Yaralanmadan sonraki 0., 4. ve 7. günlerde tedavi grubunun yaralarına larva salgısı uygulandı ve yaralanmadan sonraki 4., 7. ve 10. günlerde yara dokuları alındı. Total RNA elde edilip mikrodizin analiziyle 389 olgun miRNA'nın taraması yapıldı.

Lucilia sericata uygulaması sonucunda, kontrol grubuna göre, Yara iyileşmesinin 4. gününde 158 miRNA'nın ekspresyonunda artış görülmekle birlikte bu miRNA'lardan 30 tanesinin kat değişimi 1,5 ve üzerindedir. En çok kat artışı göstererek dikkat çeken ilk üç miRNA rno-let-7a, rno-miR-181b ve rno-miR-543'tür. Yara iyileşmesinin 7. gününde 139 miRNA'nın ekspresyonunda artış görülmekle birlikte bu miRNA'lardan 8 tanesinin kat değişimi 1,5 ve üzerindedir. En çok kat artışı göstererek dikkat çeken ilk üç miRNA rno-miR-29b, rno-miR-340-3p ve rno-miR-301a'dır. Yara iyileşmesinin 10. gününde 157 miRNA'nın ekspresyonunda artış görülmekle birlikte bu miRNA'lardan 26 tanesinin kat değişimi 1,5 ve üzerindedir. En çok kat artışı göstererek dikkat çeken ilk üç miRNA rno-miR-34c*, rno-miR-207 ve rno-miR-328'dir.

Lucilia sericata uygulaması sonucunda, kontrol grubuna göre, yara iyileşmesinin 4. gününde 158 miRNA'nın ekspresyonunda azalma görülmekle birlikte bu miRNA'lardan 24 tanesinin kat değişimi 1,5 ve üzerindedir. Kat değişimi incelendiğinde, en çok azalma göstererek dikkat çeken ilk üç miRNA rno-miR-133b,

rno-miR-378 ve rno-miR-25*'tir. Yara iyileşmesinin 7. gününde 152 miRNA'nın ekspresyonunda azalma görülmekle birlikte bu miRNA'lardan 5 tanesinin kat değişimi 1,5 ve üzerindedir. Kat değişimi incelendiğinde, en çok azalma göstererek dikkat çeken ilk üç miRNA rno-miR-295, rno-miR-296 ve rno-miR-188'dir. Yara iyileşmesinin 10. gününde 160 miRNA'nın ekspresyonunda azalma görülmekle birlikte bu miRNA'lardan 11 tanesinin kat değişimi 1,5 ve üzerindedir. Kat değişimi incelendiğinde, en çok azalma göstererek dikkat çeken ilk üç miRNA rno-miR-320, rno-miR-505 ve rno-miR-210'dur.

Çalışmamızda dikkat geçen miRNA'ların yara iyileşmesiyle olan ilişkisi literatüre ve veritabanlarına dayanılarak araştırılmış ve aşağıda belirtilmiştir:

Çeşitli kanser türlerinde en iyi anlaşılmış miRNA'lardan olan let-7'nin hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenlediği belirtilmiştir. Let-7a'nın onkogen olan Ras'ın 3'UTR'lerine bağlanarak Ras'ı negatif yönde düzenlediği ve akciğer kanseri dokularında let-7a'nın ekspresyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (39). Müller ve Bosserhoff'un malignant melanoma hücre hatlarında yaptığı bir çalışmada, let-7a'nın integrin $\beta 3$ mRNA'sının 3'-UTR'sine bağlanarak integrin $\beta 3$ 'ü baskıladığı ve bu baskılanma sonucunda hücre invazyonunun azaldığı görülmüştür (40). Çalışmamızda let-7a'nın ekspresyonu çalışmamızın 4. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda 2,47 kat arttığı görülmüştür. Let-7a'nın bu artışı, hücre çoğalması, farklılaşması ve göçünü azaltır. Larva tedavisinin yaraları daha hızlı iyileştirdiğini bilmekteyiz. Tedavi sonucunda hücre çoğalması, farklılaşması ve göçünün yara iyileşmesinin 4. gününden önce gerçekleştiğini ve 4. günde kontrole göre tedavi grubunda hücre çoğalması, göçü ve farklılaşmasında azalmayı sağlayacak let-7a'nın bu sebeple artmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Lee ve ark. miR-378'in tümör baskılayıcıları olan Sufu ve Fus-1'i inhibe ettiğini ve anjiyogenezi ilerlettiğini bildirmişlerdir (41). Kontrol grubumuza göre tedavi grubumuzda miR-378'in 2,42 kat azalma gösterdiğini bulduk. Yaranın tedaviyle daha hızlı iyileştiği baz alınır, yara iyileşmesinin 4. gününden önce hücre çoğalması ve anjiyogenezin başlamasından dolayı 4. günde bu süreçlerle ilgili miRNA'larda da azalma meydana gelmiş olabileceği kanaatine vardık.

Yara iyileşmesinde inflamasyon evresi yer alsın da bu evrenin uzun süre devam etmesi istenmeyen bir durumdur. Bu durum yara iyileşmesinin inflamasyon fazından

proliferasyon fazına geçmeyi geciktirerek yarayı kronikleşmeye doğru götürür. Sun ve ark. tarafından in vivo olarak gerçekleştirilmiş çalışmada, NF-KB'ün nükleer yerleşiminde önemli role sahip importin- α 3'ün miRNA-181b tarafından hedeflenmesiyle NF-KB sinyallenmesi, endotelial hücre aktivasyonu ve vaskular inflamasyonda azalma olduğu rapor edilmiştir. NF-KB sitokin, adezyon molekülleri ve kemoatraktan proteinler gibi proinflamatuvar genlerin ekspresyonuna öncülük eder (42). Siklooksijenaz-2 (COX-2) prostaglandin (PG) ve tromboksanları içeren prostanoidlerin sentezini kataliz eden bir enzimdir. PG, inflamasyon ve tümörögenez gibi patolojik durumlarda gereklidir. İnflamasyonu inhibe etmek için COX-2'nin baskılanması gerekmektedir. Cox-2'nin 3'UTR'sine bağlanıp negatif yönde etkileyen miRNA'lardan biri miRNA-543'tür (43). Çalışmamızda 4. günde kontrol grubuna göre tedavi grubunda miRNA-181b'nin 2,11 kat ve miRNA-543'ün 2,05 kat artış gösterdiği gözlenmiştir. Bu iki miRNA'nın, inflamasyonu azaltmasıyla yara iyileşmesine olumlu katkılar sağladığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızın 4. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda miR-133b'nin 2,48 kat azaldığını gördük. miRDB veritabanına baktığımızda miR-133b'nin hedeflediği genlerden biri de integrin alfa 8 (Itga8)'dir. Azalan miR-133b'ye bağlı olarak Itga8'in translasyonunda artış olmasını beklemekteyiz. Gen ontoloji (GO) veritabanını kullanarak Itga8'in biyolojik süreçteki etkilerini araştırdığımızda hücre adezyonunda, ekstrasellüler matris organizasyonunda, düz kas doku gelişiminde, TGF β reseptörü (TGF β R) sinyal yolağında pozitif yönde görevli olduğunu gördük.

Çalışmamızın 4. gününde, kontrol grubuna göre tedavi grubunda 2,35 kat azalma gösteren miR-25*'in hedef genlerinden biri olan tip I kollajenin miR-25* tarafından negatif yönde düzenlendiği bildirilmiştir. Tip I kollajen ECM'de bol miktarda bulunur ve eksikliği cilt yaşlanmasına ve kırışıklığına sebep olur (44).

İn siliko çalışmalarla kollajenlerle en iyi baz dizisi eşleşmesi gerçekleştiren miRNA'ların miR-29 ailesinin olduğu belirtilmiştir. Birçok sistemde fibrötik rahatsızlığa yol açan sistemik sklerozda miR-29 ailesinin kontrole göre azaldığı görülmüştür. Bu azalmanın kollajende artışa neden olduğu rapor edilmiştir (25). Shi ve ark. tarafından insan meme kanserinde gerçekleştirilen çalışmada miR-301'in arttığı rapor edilmiştir. miR-301 kollajen 2a1, pten ve foxf2 genlerini negatif yönde etkileyerek hücre göçünde, anjiyogenezde ve hücre proliferasyonunda artışa ve kollajen

sentezinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (45). Çalışmamızın 7. gününde kontrole göre tedavi grubunda miR-301a'nın 1,83 kat ve miR-29b'nin 1,92 kat arttığı görülmüştür. Histolojik kesitler incelendiğinde kollajenlerin tedavi grubunda daha yoğun olduğu ve lif demetleri oluşturmaya başladığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda kollajenlerin lif demetlerini oluşturması 10. günde gözlemlenmiştir. Tedavi grubuna göre kontrol grubunda kollajen sentezinin ve ECM'de birikiminin gecikmesinden dolayı kollajeni etkileyen bu miRNA'larda azalma meydana gelmiş olabileceği kanaatine vardık.

Çalışmamızın 7. gününde kontrole göre tedavi grubunda 1,87 kat artan miR-340-3p'nin hedef geni için Targetscan veri tabanına bakıldı. Adamts9'un miR-340-3p tarafından hedeflendiği görüldü. ADAMTS9 proteazının ECM elemanı olan agrekan ve versikan proteoglikanlarını parçaladığı görüldü (46).

Wurdinger ve ark.nın yaptığı çalışmayla miR-296'nın anjiyogenik sinyali arttırdığı bildirilmiştir (47). Çalışmamızın 7. gününde kontrole kıyasla tedavi grubunda miR-296 1,65 kat azalma göstermiştir. 7. günde kontrole göre tedavi grubunda azalan diğer miRNA miR-188'dir. 1,54 kat azalma göstermiştir. Targetscan veritabanına göre Pten'i hedeflemektedir. Bu yolla miR-188'in azalması anjiyogenezi azaltabilir. Yara iyileşmesinin 4. gününde olduğu gibi 7. gününde de anjiyogenezi azaltan miRNA'lara rastlanılmıştır.

Yara iyileşmesinin 7. gününde miR-295 1,69 kat azalma göstermiştir. Targetscan veritabanına göre miR-295 kollajen 1A1'i hedefleyerek negatif yönde etkiler.

Yara iyileşmesinin 10. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda miR-328'de 2,11 kat artış gözlenmiştir. CD44'ün 3'UTR'sine bağlanarak negatif yönde etkiler. CD44 ligandı olan hyaluronanla etkileşir. CD44'ün miR-328'le etkileşimi hücre adezyonunda ve kapiller formasyonunda azalmaya sebep olur (48).

Yara iyileşmesinin 10. gününde kontrole kıyasla tedavi grubunda miR-34c* 11,54 kat artış göstererek tüm günlerde en çok artan miRNA olmuştur. Lopez ve Alvarez tarafından serviks kanseri hücre hattında yapılan bir çalışmayla miR-34c*'nin hücre göçünü inhibe ettiği ve apoptozu arttırdığı ilk defa gösterilmiştir (49).

Yara iyileşmesinin 10. gününde kontrol grubuna göre tedavi grubunda 1,96 kat azalan miR-505'in hedef genlerine Targetscan veritabanından bakıldı. Transkripsiyon faktörü 4 ve 24, TIMP2, PDGF reseptörü gibi yara iyileşmesinde görevli olan genler miR-505 tarafından hedeflenmektedir.

Hipoksi durumunda miR-210'un ekspresyonu artar. Bu artış kapiller benzeri oluşumları başlatarak anjiyogenezi olumlu yönde etkiler (50). Normal şartlar altında endotelial hücrelerde yaygın olarak eksprese olan miRNA'lardan biri miR-320'dir (51). Çalışmamızın 10. gününde kontrole kıyasla tedavi grubunda mir-210'un 1,88 kat ve miR-320'nin 2,56 kat azaldığı görülmüştür. Bu iki miRNA'nın azalması anjiyogeneze de azalma meydana getirir. Histolojik kesitler de anjiyogeneze azalma olduğunu desteklemektedir. Yara iyileşmesinin 10. gününde yaranın olgunlaşma evresi gerçekleşmektedir. Kan damarları oluşumunun azalması beklenen bir süreçtir. Çalışmamızda miR-320'nin ve miR-210'un azalmasıyla anjiyogenezin de azaldığını düşünmekteyiz.

Larva salgısı tedavisi sonucunda anjiyogeneze ve hücre çoğalmasıyla ilgili miRNA'ların yara iyileşmesinin 4. ve 7. gününde azaldığını gözlemledik. Histolojik kesitlerde 4. günde tedavi ve kontrol grubunda yoğun anjiyogeneze sahalarına rastlanılmıştır. MiRNA ekspresyon seviyelerine bakarak, larva tedavisinin kontrol grubundan daha önce anjiyogenezi başlatmış olabileceğini düşünmekteyiz. 4. günde inflamasyonla ilgili genlerin baskılanmasını sağlayan miRNA'larda değişiklikler gözlemlendi. Mikrodizin sonucunda 7. günde tedavi grubunda kollajen miktarını hem azaltacak ve hem de artıracak miRNA'lara rastlanılmıştır. 7. günde histolojik kesitlerde tedavi grubunda kollajenin daha yoğun olduğu ve kollajenlerin lif demetleri oluşturduğu gözlemlendi. Histolojik bulgular sonucunda tedavi grubunda yara iyileşmesinin 7. gününde epitelizasyon gerçekleşmişken kontrol grubunda yara iyileşmesinin 10. gününde epitelizasyon hala tamamlanmamıştır. 10. günde anjiyogeneze ilgili miRNA'larda azalma gözlemlendi. Histolojik bulgumuz da bunu destekler nitelikteydi.

Çalışmamızın sonuçlarının değerlendirilmesini sınırlayan bazı faktörler bulunmaktadır. Larva salgısı tedavisiyle anlamlı değişim gösteren miRNA'ların, hangi mRNA'larla etkileşerek yaraları iyileştirdiğini bulmamız için yolak analizi gibi ileri analizler yapılmalıdır. İleride yapılacak çalışmalarla; larva salgısı tedavisinin kronik yara modeli oluşturularak miRNA ekspresyonu değişikliklerinin incelenmesi, larva

salgısı tedavisinin uygulanma sıklığı arttırılarak yapılacak çalışmalarla değişen miRNA ekspresyonlarının araştırılması, yapılan ekspresyon çalışmalarının RT-PCR gibi yöntemlerle desteklenmesi, sıçan ve insan deri yapılarının özellikle bağ dokusu açısından farklı olması nedeniyle insan çalışmalarında larva salgısı tedavisinin araştırılması bu konuda bizlere daha fazla bilgi verecektir.

Sonuç olarak yara iyileşmesinin her farklı gününde en çok artan ve azalan ilk üç miRNA incelendiğinde ekstrasellüler matriksin yeniden yapılanması, hücre çoğalması ve göçü, anjiyogenez ve inflamasyon süreçleriyle ilişkili olduğu görülmüştür. Bu çalışma literatürde larva salgısı tedavisi ile iyileşen yaralarda miRNA ekspresyonu değişikliklerini tanımlayan ilk çalışmadır. Çalışmamız, normal iyileşme sürecinden farklı olarak larva salgısı tedavisinin miRNA ekspresyon seviyelerini değiştirdiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Banerjee J, Chan YC, Sen CK. MicroRNAs in skin and wound healing. *Physiol Genomics* 2011; **43**: 543–556.
2. Yüksel E. Sistemik meperidin uygulamasının ratlarda kutanöz yara iyileşmesi üzerine etkileri. Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi. Tıpta Uzmanlık Tezi. Kayseri. 2009.
3. Bediz Ölçer A, Gönül N. Perkütan absorpsiyon ve perkütan absorpsiyonu etkileyen faktörler. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 2002; **31 (1)**: 33-49.
4. Alexander A, Dwivedi S, Ajazuddin, Girib TK, Saraf S, Sarafa S, Tripathi DK. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release* 2012; **164 (1)**: 26–40.
5. Sezgin S. Hemostatik ajan Ankaferd'in yara iyileşmesi üzerine etkileri. İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi. Uzmanlık Tezi. Malatya. 2010.
6. Karasu A, Bakır B. Yara ve yara iyileşmesi. *Veteriner Cerrahi Dergisi* 2008; **14 (1)**: 36-43.
7. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine* 1999; **341**: 738-46.
8. Baykal Y. Travmaya cevap (yara iyileşmesi ve enflamasyon). İçinde Baykal Y, Yılmaz AT, Koçar İH, Şen D, editor. *Damar hastalıkları ve embolik fenomenler*. GATA basımevi; 2002. pp. 51-64.
9. Baum CL, Arpey CJ. Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events. *Dermatol Surg* 2005; **31**: 674–686.
10. Bavan L, Midwood K, Nanchahal J. MicroRNA epigenetics: a new avenue for wound healing research. *BioDrugs* 2011; **25**: 27–41.
11. Clark RAF. Fibrin and Wound Healing. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Fibrinogen: XVIth International fibrinogen Workshop. June 2001; **936**: 355–367.
12. Mathieu P, Rodero MP, Khosrotehrani K. Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; **3(7)**: 643-653.
13. Lee RC, Feinbaum RL. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* December 3, 1993; **75**: 843-854.

14. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* February 24, 2000; **403**: 901-906.
15. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack FJ, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* November 2, 2000; **408**: 86-89.
16. Lagos-Quintana, M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; **294**: 853–858.
17. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel, DP. Abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; **294**: 858–862.
18. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; **294**: 862–864.
19. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi* 2011; **38 (1)**: 113-120.
20. Görür A, Tamer L. MikroRNA'ların terapötik kullanımı. *Mersin Univ Sağlık Bilim Derg* 2011; **4(2)**: 1-7.
21. Yeom KH, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Research* 2006; **34 (6)**: 4622–4629.
22. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Feb 5; **105 (5)**: 1516-21.
23. Madhyastha R, Madhyastha H, Nakajima Y, Omura S, Maruyama M. MicroRNA signature in diabetic wound healing: promotive role of miR-21 in fibroblast migration. *Int Wound J* 2011; doi: 10.1111/j.1742-481X.2011.00890.x
24. Tili E, Michaille JJ, Gandhi V ve ark. miRNAs and their potential for use against cancer and other diseases. *Future Oncol* 2007 Oct; **3 (5)**: 521-37.
25. Maurer B, Stanczyk J, Jungel A ve ark. miR-29 is a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010 Jun; **62 (6)**: 1733-43.

26. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M ve ark. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* 2009 Jun 26; **324 (5935)**: 1710-3.
27. Sirekbasan S. Larvaların Laboratuvar Ortamında Üretimi. *17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu (Program ve Özet Kitabı)*. Kars, 4-10 Eylül 2011: s.80-81.
28. Mumcuoğlu KY, Özkan AT. Süpüratif Kronik Yaraların Maggot Debridman Tedavisi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2009; **33(4)**: 307-315.
29. Gupta A. A review of the Use of Maggots in Wound Therapy. *Ann Plast Surg* 2008; **60**: 224–227.
30. Wollina U, Karte K, Herold C, Looks A. Biosurgery in wound healing – the renaissance of maggot therapy. *JEADV* 2000; **14**: 285–289.
31. http://en.wikipedia.org/wiki/Maggot_therapy
32. Whitaker IS, Twine C, Whitaker MJ, Welck M, Brown CS, Shandall A. Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential. *Postgrad Med J* 2007; **83**: 409–413.
33. Chan DCW, Fong DHF, Leung JYY, Patil NG, Leung GKK. Maggot debridement therapy in chronic wound care. *Hong Kong Med J*. 2007; **13**: 382-6.
34. Chambers L, Woodrow S, Brown AP, Phillips PD, Hall M, Church JCT, Pritchard DI. Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *British Journal of Dermatology* 2003; **148**: 14–23.
35. Gouin J, Kiecolt-Glaser JK. The Impact of Psychological Stress on Wound Healing: Methods and Mechanisms. *Immunol Allergy Clin N Am* 2011; **31**: 81–93.
36. Kara B. Yara iyileşmesinde topikal tedavi amaçlı kantaron yağı, susam yağı ve izotonikli pansuman materyallerinin etkinliğinin karşılaştırılması. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi. Uzmanlık tezi. Trabzon. 2011.
37. Van der Plas MJA, van der Does AM, Baldry M, Dogterom-Ballering HCM, van Gulpen C, van Dissel JT ve ark. Maggot excretions/secretions inhibit multiple neutrophil pro-inflammatory responses. *Microbes Infect* 2007; **9**: 507–514.

38. Babu MM. Introduction to microarray data analysis. İçinde Grant RP, editör. *Computational Genomics: Theory and Application*. Norwich, Horizon Press; 2004. pp. 225-249.
39. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Laborurier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. *Cell* March 11, 2005; **120**: 635–647.
40. Müller DW, Bosserhoff AK. Integrin b3 expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma. *Oncogene* 2008; **27**: 6698–6706.
41. Lee DY, Deng Z, Wang CH ve ark. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Dec 18; **104 (51)**: 20350-5.
42. Sun X, İçli B, Wara AK, Belkin N, He S, Kobzik L, Hunninghake GM, Vera MP, Registry MICU, Blackwell TS, Baron RM, Feinberg MW. MicroRNA-181b regulates NF- κ B-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest* 2012; **122(6)**: 1973–1990.
43. Yoon S, Choi YC, Lee Y, Jin M, Jeong Y, Yoon J, Baek K. Characterization of microRNAs regulating cyclooxygenase-2 gene expression. *Genes & Genomics* 2011; **33**: 673-678.
44. Kwok HH, Patrick YKY, Mak NK, Wong RNS. Ginsenoside Rb1 induces type I collagen expression through peroxisome proliferator-activated receptor-delta. *Biochemical Pharmacology* 2012; **84**: 532–539.
45. Shi W, Gerster K, Alajez NM, Tsang J, Waldron L, Pintilie M, Hui AB, Sykes J, P'ng C, Miller N, McCready D, Fyles A, Liu FF. MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Res* 2011 Apr 15; **71(8)**: 2926-37.
46. Koo BH, Longpré JM, Somerville RP, Alexander JP, Leduc R, Apte SS. Regulation of ADAMTS9 secretion and enzymatic activity by its propeptide. *J Biol Chem* 2007 Jun 1; **282(22)**: 16146-54.
47. Würdinger T, Tannous BA, Saydam O, Skog J, Grau S, Soutschek J, Weissleder R, Breakefield XO, Krichevsky AM. miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* 2008 Nov 4; **14 (5)**: 382-93.

48. Rutnam ZJ, Wight TN, Yang BB. miRNAs regulate expression and function of extracellular matrix molecules. *Matrix Biol* 2013 Mar 11; **32(2)**: 74-85.
49. López JA, Alvarez-Salas LM. Differential effects of miR-34c-3p and miR-34c-5p on SiHa cells proliferation apoptosis, migration and invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 Jun 10; **409(3)**: 513-9.
50. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, Capogrossi MC, Martelli F. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J. Biol. Chem* 2008; **283**: 15878–15883.
51. Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* 2007; **100**: 1164–1173.



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2011/ 153

24/11/2011

Sn: Prof. Dr. İlhan ONARAN
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Karar No :2011/ 153
Başvuru :18.11.2011

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, (Biyolog) Yüksek Lisans Öğrencisi Hülya ARKAN'a ait "Lucilia sericata Larvalarının Deneysel Sıçan Yara Modelinde Kullanımı ile İyileşen Yaralarda MikroRNA Profillerinin İncelenmesi " isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Alcy AKDOĞAN KAYMAZ
İ.Ü.HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Doç.Dr.Ufuk ÇAKATAY
Üye

Yard.Doç.Dr.Alper OKYAR
Üye

Yard.Doç.Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Uzm. Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

Mak.Yük.Müh. Dr.Burak OLGUN
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hülya	Soyadı	ARKAN
Doğ.Yeri	Pütürge/MALATYA	Doğ.Tar.	31.05.1987
Uyruğu	T.C.	Email	arkanhulya@gmail.com

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD	2013
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Özel Gaziosmanpaşa Şefkat Lisesi (YDA)	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
Photoshop	Orta

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):