

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FİBRO-PROLİFERATİF SKAR
DOKULARINDA MİR-29 AİLESİ
VARLIĞININ, MİR-29'UN KOLLAJEN
MATURASYONUNA ETKİSİNİN VE
EKSTRASELLÜLER MATRİKS SENTEZİ
İLE İLİŞKİLİ SİNYAL
YOLAKLARINDAKİ ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**

DUYGU HARMANCI KARAGÜLLE

MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2020

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2012970156

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FİBRO-PROLİFERATİF SKAR
DOKULARINDA MİR-29 AİLESİ
VARLIĞININ, MİR-29'UN KOLLAJEN
MATURASYONUNA ETKİSİNİN VE
EKSTRASELLÜLER MATRİKS SENTEZİ
İLE İLİŞKİLİ SİNYAL
YOLAKLARINDAKİ ROLÜNÜN
İNCELENMESİ**

DUYGU HARMANCI KARAGÜLLE
MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. GÜL AKDOĞAN

II. Tez Danışmanı: Dr. Dimitris KLETSAS

(Bu araştırma, DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2016. KB. SAG. 019 sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2012970156

İÇİNDEKİLER

TABLO	vi
ŞEKİL	viii
KISALTMALAR	xii
TEŞEKKÜR	xiii
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Yara nedir?	4
2.2 Deri.....	4
2.3 Yara İyileşmesi.....	6
2.3.1. İnflamasyon	7
2.3.2. Proliferatif Faz.....	8
2.3.3. Yeniden Şekillenme	10
2.4 Anormal Yara İyileşmesi	11
2.4.1. Fibroproliferatif Skarlar	12
2.4.1.1. Hipertrofik Skarlar.....	13
2.4.1.2. Keloid	14
2.5 Deri Fibrozu	15
2.5.1. Kollajen Biyosentezi	16
2.5.2. TGF- β /Smad Sinyal Yolağı.....	18
2.6. mikroRNA'lar ve mikroRNA29 Ailesi.....	20
3.GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1 Araştırmanın Tipi	23
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı	23
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	23
3.4 Araştırmanın Materyali	23
3.5 Araştırmanın Değişkenleri	23
3.6 Veri Toplama Araçları	24

3.6.1. Tez Çalışması Sırasında Kullanılan Araç ve Gereçler.....	24
3.6.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	26
3.6.3. Araştırma Sırasında Kullanılan Yöntemler	27
3.6.3.1. miR29 aile varlığının incelenmesi için dokuların toplanması	28
3.6.3.2. Doku miR29 aile üyeleri ekspresyonlarının Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile belirlenmesi	30
3.6.3.3. Doku miR29 aile üyelerinin lokalizasyonlarının <i>in situ hibridizasyon</i> (ISH) yöntemi ile belirlenmesi	34
3.6.3.4. Toplanan Dokulardan Primer Fibroblast Hücre Kültürlerinin Kurulması	
3.6.3.5. Kurulan Primer Kültürlerde miR29 Transfeksiyon İşlemlerinin Yapılması: Primer Fibroblast Kültürlerinde miR29 ailesi üyelerinin susturulması ...	51
3.6.3.6. Kollajen Maturasyonu Değerlendirilmesi için COL1A, COL3A, FİBRONEKTİN, HSP-47 ve LOXL2 Enzimi Protein Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi ile Analizi	53
3.6.3.7. Kollajen Maturasyonun Değerlendirilmesi için Ekstrasellüler Lizil Oksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	61
3.6.3.8. Kollajen Maturasyonunun Değerlendirilmesi için Ekstrasellüler Fibril Oluşumun Elektron Mikroskopik Olarak Belirlenmesi	62
3.6.3.9. Keloid ve Hipertrofik skar primer fibroblast kültürlerinde miR29 transfeksiyonu ile değişen TGF- β /Smad Sinyal Yolağı ve ilişkili biyomoleküllerin gen ekspresyonlarının Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile belirlenmesi	63
3.6.3.10. Keloid ve Hipertrofik skar primer fibroblast kültürlerinde miR29 transfeksiyonu ile değişen TGF- β /Smad Sinyal Yolağı ilişkili Ekstrasellüler TIMP-1 Protein Düzeylerinin ELISA ile Belirlenmesi	69
3.7 Araştırma Planı ve Takvimi	71
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi	72
3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları.....	72
3.10 Etik Kurul ve DEÜ Bilimsel Araştırma Proje Destek Onayı	72

4. BULGULAR.....	73
4.1 Toplanan keloid, hipertrofik skar ve sağlıklı deri dokularındaki miR29 aile üyelerinin varlıklarının değerlendirilmesi	73
4.1.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenen miR29 Ailesi Ekspresyon Bulguları	73
4.1.2. <i>In Situ Hibridizasyon</i> ile Belirlenen miR29 Ailesi Lokalizasyon Bulguları	74
4.2 Toplanan keloid, hipertrofik skar ve sağlıklı deri dokularından primer fibroblast kültürlerinin kurulması.....	75
4.2.1. Primer Fibroblast Hücre Karakterizasyonu için Immünohistokimya ile Belirlenen HSP47 Protein Ekspresyon Bulguları	76
4.3 Primer fibroblast kültürlerinde miR29 ailesi üyelerinin susturulması: Transfeksiyon Bulguları.....	77
4.4 Primer fibroblast kültürlerinde miR29 aile üyelerinin susturulması ardından COL1A, COL3A, FİBRONEKTİN, HSP-47 ve LOXL2 protein ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi.....	80
4.4.1. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile COL1A Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi.....	80
4.4.2. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile COL3A Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi	81
4.4.3. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile FİBRONEKTİN Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi...83	
4.4.4. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile HSP47 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi	84
4.4.5. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile LOXL2 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi	86

4.5 Primer fibroblast kültürlerinde miR29 aile üyelerinin susturulması ardından ekstraselüler LOX enzim aktivitesinin fluorometrik olarak değerlendirilmesi.....	88
4.6 Primer fibroblast kültürlerinde miR29 aile üyelerinin susturulması ardından fibril oluşumunun elektron mikroskopik olarak değerlendirilmesi.....	89
4.7 Primer fibroblast kültürlerinde miR29 aile üyelerinin susturulması ardından TGF- β , Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, CTGF ve TIMP-1 gen ekspresyonlarının qPCR ile değerlendirilmesi	90
4.7.1 Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile TGF- β Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi	90
4.7.2 Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile Smad2 Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi	92
4.7.3 Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile Smad3 Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi	93
4.7.4 Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile Smad4 Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi	95
4.7.5 Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile Smad7 Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi	96
4.7.6 Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile CTGF Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi.....	97
4.7.7 Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile TIMP-1 Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi.....	99
4.8 Primer fibroblast kültürlerinde miR29 aile üyelerinin susturulması ardından ve TIMP-1 protein ekspresyonunun ELISA ile değerlendirilmesi	100
4.9 Primer fibroblast kültürlerinde miR29 aile üyelerinin susturulması ardından tüm parametrelerdeki değişikliklerin korelasyon analizleri	102
5. TARTIŞMA	104
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	114

7. KAYNAKLAR.....	117
8. EKLER.....	126



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Farklı Dokularda miR29 aile üyelerinin ekspresyon durumları	22
Tablo 2. Araştırma Sırasında Kullanılan Araç ve Gereçler	24
Tablo 3. Revers-Trankripsiyon Reaksiyon İçeriği	32
Tablo 4. miRNA belirlenmesi için Reaksiyon Karışımı İçeriği	33
Tablo 5. miR29 ailesi ekspresyonlarının belirlenmesi için qPCR reaksiyon koşulları	34
Tablo 6. In situ Hibridizasyon Kit İçeriği	36
Tablo 7. ISH yönteminde kullanılan çözeltiler	37
Tablo 8. ISH deney protokolü için hazırlanacak ve otoklavlanacak tampon ve stok çözeltiler	38
Tablo 9. ISH için deney günü-taze hazırlanan çözeltiler	39
Tablo 10. ISH yönteminde Kullanılan Prob Dizileri	39
Tablo 11. Proteinaz K konsantrasyon optimizasyonu	40
Tablo 12. Proteinaz K inkübasyon süresi optimizasyonu	40
Tablo 13. In situ Hibridizasyonda deparafinizasyon adımları	42
Tablo 14. In situ Hibridizasyonda SSC Tamponu ile yıkama adımları	43
Tablo 15. In situ Hibridizasyonda Dehidrasyon Basamakları	45
Tablo 16. Modifiye edilmiş In situ Hibridizasyon deparafinizasyon adımları	46
Tablo 17. BCA analizinde kullanılacak BSA standartlarının Hazırlanması	55
Tablo 18. SDS–PAGE yönteminde ayırıcı jelin (%8 ve %10'luk) hazırlanması	57
Tablo 19. SDS–PAGE yönteminde paketleyici jelin (%4) hazırlanması	57
Tablo 20. Jele yüklenecek örnekler için kullanılan 5X örnek tamponu içeriği	58
Tablo 21. LOX Aktivite ölçümünde kullanılacak 2X LOX reaksiyon karışımı içeriği	61
Tablo 22. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon içeriği	65
Tablo 23. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizlerinde Kullanılan Primer Dizileri	66
Tablo 24. qPCR Reaksiyon Karışımı İçeriği	68
Tablo 25. qPCR reaksiyon koşulları	68
Tablo 26. Tez Çalışmasına İlişkin Araştırma Takvimi	71

Tablo 27. Keloid Fibroblast Hücrelerinde Baskılanmış miR29a ile korele parametreler	102
Tablo 28. Hipertrofik Skar Fibroblast Hücrelerinde Baskılanmış miR29b-2 ile korele parametreler	103
Tablo 29. Fibrotik Hastalıklar ve miR29 ailesi ekspresyonu	106



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Yara (https://app.biorender.com/)	4
Şekil 2. Deri Biyolojisi (BioRender ile tasarlanmıştır. https://app.biorender.com/)	5
Şekil 3. Yara İyileşmesi Fazları (BioRender ile tasarlanmıştır. https://app.biorender.com/)	7
Şekil 4. Hipertrofik Skar (BioRender ile tasarlanmıştır. https://app.biorender.com/)	13
Şekil 5. Keloid (BioRender ile tasarlanmıştır. https://app.biorender.com/)	14
Şekil 6. Deri Fibrozu (BioRender ile tasarlanmıştır. https://app.biorender.com/)	15
Şekil 7. Kollajenin Protein Yapısı	16
Şekil 8. Kollajen Biyosentezi a: çekirdekte kollajen mRNA oluşumu; b: ER'da prokollojen moleküllerinin hidroksillenmesi; c: ER'da prokollojen moleküllerine galaktozil ve glikozil bağlanması; d: Prokollajen moleküllerinin bir araya toplanması; e: HSP47 bağlanması ile Golgiye taşınması; f: peptidazlar tarafından prokollajen moleküllerinin N- ve C- terminal bölgelerinin kesimi; g: tropokollajen oluşumu ve hücre dışına atılımı; h: tropokollajenlerin bir araya toplanması; i: lizil oksidaz enzimi tarafından tropokollajen molekülleri arasında karşılıklı çapraz bağların oluşturulması (BioRender ile tasarlanmıştır. https://app.biorender.com/)	17
Şekil 9. TGF- β /Smad Sinyal Yolağı (BioRender ile tasarlanmıştır. https://app.biorender.com/)	19
Şekil 10. miR29 Ailesi (Lagos-Quintana ve ark.larının makalesinden uyarlanmıştır.)	21
Şekil 11. Teze ilişkin aşamalı deney planı	29
Şekil 12. In situ hibridizasyon şeması	35
Şekil 13. Dokunun Ameliyathaneden Laboratuvara Yolculuğu	49
Şekil 14. Moleküler Ağırlık Standardı (Thermo, ABD)	58
Şekil 15. Keloid (n=2), hipertrofik skar (n=5) ve sağlıklı deri dokularındaki (n=20) miR29 aile üyeleri ekspresyonları. a) miR29a; b) miR29b-1; c) miR29b-2 ve d) miR29-c (*p<0.05).	73
Şekil 16. Keloid dokularında U6 probu ile iki farklı akış izlenerek alınan görüntüler. a) Ticari (Exiqon) olarak satın alınan kit ile alınan görüntü b) Laboratuvarda hazırlanan çözeltilerle alınan görüntü.	75

Şekil 17. Dokudan ayrılan fibroblastlar (14. Gün): Dokulardan ayrılan fibroblastların 14. günde faz kontrast mikroskobu görüntüleri (20x büyütme)	76
Şekil 18. HSP-47 Boyamaları (10x büyütme): İdame edilen kültürlerin fibroblast hücresi olduğunun kanıtlanması için HSP-47 boyaması her bir pasaj için ayrı ayrı yapıldı.	77
Şekil 19. Transfeksiyon deney koşullarının belirlenmesi için yapılan WST-1 testi % Canlılık Bulguları: a) optimum hücre sayısı; b) optimum transfeksiyon reaktif hacmi; c) optimum inhibitör konsantrasyonu	78
Şekil 20. miR29 inhibitörleri ile yapılan transfeksiyona ilişkin qPCR analizi bulguları (transfeksiyon kontrolü: a) Hipertrofik skar fibroblastlarının miR29b-2 inhibitörü ile transfeksiyonu; b) sağlıklı kontrol fibroblastların miR29b-2 inhibitörü ile transfeksiyonu; c) keloid fibroblastlarının miR29a inhibitörü ile transfeksiyonu; d) sağlıklı kontrol fibroblastların miR29a inhibitörü ile transfeksiyonu	79
Şekil 21. Tüm deney setlerinde COL1A Protein Dansitometrik Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile COL1A/ β -aktin oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile COL1A/ β -aktin oranları	80
Şekil 22. Tüm deney setlerinde COL3A Protein Dansitometrik Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile COL3A/ β -aktin oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile COL3A/ β -aktin oranları	82
Şekil 23. Tüm deney setlerinde Fibronektin Protein Dansitometrik Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile Fibronektin/ β -aktin oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile Fibronektin/ β -aktin oranları	83
Şekil 24. Tüm deney setlerinde HSP47 Protein Dansitometrik Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile HSP47/ β -aktin oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile HSP47/ β -aktin oranları	85
Şekil 25. Tüm deney setlerinde LOXL2 Protein Dansitometrik Analiz Bulguları a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile LOXL2/ β -aktin	

oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile LOXL2/ β -aktin oranları _____ 86

Şekil 26. Tüm deney gruplarında Western Blot Yöntemi ile Elde Edilen Fibronektin, COL1A, COL3A, HSP47, LOXL2 Protein Bant Görüntüleri. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile elde edilen bant görüntüleri (1:kontrol, 2:kontrol-miR29a TR, 3:keloid miR29a TR, 4:keloid) b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile elde edilen bant görüntüleri (1:kontrol, 2:kontrol-miR29b-2 TR, 3:skar miR29b-2 TR, 4:skar) _____ 87

Şekil 27. Tüm deney setlerinde ekstraselüler LOX Enzim Aktivitesi Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast supernatantlarında miR29a baskılanması ile ekstraselüler LOX enzim aktivitesi b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile ekstraselüler LOX enzim aktivitesi _____ 88

Şekil 28. Keloid ve hipertrofik skar deney setlerinde ekstraselüler fibril oluşumun değerlendirilmesi. a) miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerindeki geçirimli elektron mikroskopi görüntüsü b) keloid fibroblast hücrelerindeki geçirimli elektron mikroskopi görüntüsü c) miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerindeki geçirimli elektron mikroskopi görüntüsü d) hipertrofik skar fibroblast hücrelerindeki geçirimli elektron mikroskopi görüntüsü _____ 89

Şekil 29. Tüm deney setlerinde TGF- β Gen Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile TGF- β /GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile TGF- β /GAPDH oranları _____ 91

Şekil 30. Tüm deney setlerinde Smad2 Gen Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile Smad2/GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile Smad2/GAPDH oranları _____ 92

Şekil 31. Tüm deney setlerinde Smad3 Gen Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile Smad3/GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile Smad3/GAPDH oranları _____ 94

Şekil 32. Tüm deney setlerinde Smad4 Gen Analiz Bulguları.a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile Smad4/GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile Smad4/GAPDH oranları	95
Şekil 33. Tüm deney setlerinde Smad7 Gen Analiz Bulguları.a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile Smad7/GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile Smad7/GAPDH oranları	96
Şekil 34. Tüm deney setlerinde CTGF Gen Analiz Bulguları.a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile CTGF/GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile CTGF/GAPDH oranları	98
Şekil 35. Tüm deney setlerinde TIMP-1 Gen Analiz Bulguları.a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile TIMP-1 /GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile TIMP-1 /GAPDH oranları	99
Şekil 36. TIMP-1 Standart Kalibrasyon Grafiği:Standart çözeltiler: 2000;1000;500;250;125;62.5 pg/mL	100
Şekil 37. Tüm deney setlerinde TIMP-1 Protein Analiz Bulguları.a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile TIMP-1 protein düzeyleri b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile TIMP-1 protein düzeyleri	101

KISALTMALAR DİZİNİ

HS: Hipertrofik skar
miRNA; miR: mikroRNA
miR29: miRNA29
LOX: Lizil oksidaz
ESM: Ekstraselüler matriks
HSP47: Isı şok proteini 47
TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü
MMP: Matriks metalloproteinaz
TIMP: Doku inhibitör matriks metalloproteinaz
ROT: Reaktif oksijen türleri
GAG: Glikozaminoglikan
HA: Hyaluronik asit
CTGF: Bağ dokusu büyüme faktörü
PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa
IL-4: İnterlökin 4
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
qPCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
ISH: *in situ* hibridizasyon
COL1: Kollajen 1
COL3: Kollajen 3
IFN- γ : Interferon gama
ER: Endoplazmik retikulum
LNA: Kilitli nükleik asit
AP: Alkalen fosfataz:
NBT: 4-nitro-blue-tetrazolium
BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate
HRP: Horseradishperoksidaz
SSC: Sodyum sitrat tamponu
TEM: Geçirimli elektron mikroskobu

TEŞEKKÜR

2009 yılından bu yana öğrencisi olduğum Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nın hayatıma dokunan **tüm öğretim üyelerine,**

İlk tanıştığımız günden bugüne sabrı, hanımefendiliği, saygısı ve koşulsuz sevgisi ile beni sarıp sarmalayan ve hayatı olumlamanın kıymetini öğreten, hayatımda her zaman olmasını arzuladığım saygıdeğer danışmanım **Prof. Dr. Gül Akdoğan'a,**

Bu tez olmasa belki de hiç tanıyamayacağım ve hayran olamayacağım çok değerli, çok çalışkan proje yürütücüm **Prof. Dr. Cenk Demirdöver'e,**

Desteğini ve ilgisini esirgemeyen anabilim dalı başkanım **Prof. Dr. Hüray İşlekel'e,**

En ufak derdimde odasında belirlediğimde sıcacık kahveleri ve sakinleştirip sıraladığı çözüm önerileri için **Doç. Dr. Zahide Çavdar'a,**

Türk Biyokimya Derneği İzmir Şubesi çatısı altında beni kendilerinden ayrı tutmayan ve hep akıllarında, kalplerinde olduğumu bildiğim şahane hocalarım **Prof. Dr. Ferhan Sağın'a, Prof. Dr. Hilal Koçdor'a, Prof. Dr. Aysun Pabuçcuoğlu'na, Prof. Dr. Figen Zihnioğlu'na ve Doç. Dr. Nilgün Yener'e,**

Bir bakışından derdimi de sevincimi de anlayan ve her daim sırtımı sıvazlayan ve yol gösteren canım abim **Dr. Memduh Bülbül'e,**

İlk geldiğim günden beri her derdime derman öğrenci işleri mensuplarından **Beyhan Gürkan'a, Fulya Küçük'e, Neslihan Artunç'a,**

Aynı çalışma grubunda, aynı laboratuvarında çalışmaktan ve başarılarından hep gurur duyacağım, tanıdığım en yardımsever ve odaklı insanlardan biri olan **Ayşe Koçak'a,** Varlık sebeplerim **anne ve babama,**

En az kök ailem kadar bana sahip çıkan ve destekleyen **eşimin ailesine,**

Hayatından, hayatımızdan, yemek sofralarımızdan, tatillerimizden çalıp yaptığım deneylere, okumalara, yazmalara, kurslara, kongrelere, toplantılara, hiç bitmeyecekmiş gibi gelen telefon görüşmelerine fedakârca göğüs gerdiği için oyun arkadaşım, eşim **Noyan Karagülle'ye** sonsuz teşekkürlerimle...

Duygu HARMANCI KARAGÜLLE

ÖZET

Fibro-Proliferatif Skar Dokularında miR-29 Ailesi Varlığının, miR-29'un Kollajen Maturasyonuna Etkisinin Ve Ekstrasellüler Matriks Sentezi İle İlişkili Sinyal Yolaklarındaki Rolünün İncelenmesi

Duygu Harmancı Karagülle

**Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı
35340, Balçova-İzmir
duyguharmanci@gmail.com**

Anormal yara iyileşmesi fibroproliferatif skar oluşumuna neden olabilir. Bunlar hipertrofik skar ve keloidlerdir. Hipertrofik skar, yarada büyümeye devam eden fibrotik bir patolojidir. Keloidler ise yara sınırlarını aşarak büyümeye devam eden fibröz iyi huylu tümörlerdir. Her iki patolojik durumun mekanizmaları halen tam olarak aydınlatılmamıştır. Artan kollajen birikimi ile karakterizedirler. Bu nedenle, kollajen sentezinin hedeflenmesi tedavi için doğru yaklaşım olabilir. miR29 ailesinin fibrotik hastalıklarda etkinliğine ilişkin kanıtlar ortaya çıkmaktadır ve hedef moleküller arasında hücre dışı matriks proteinleri baskındır. Bu çalışmada, miR29 ailesinin fibroproliferatif skarlardaki rolünü, HSP47 ve LOX'in kollajen olgunlaşması ve TGF- β /Smad yolu ile kollajen sentezindeki rolünü inceledik. Fibroproliferatif skar ve sağlıklı kontrol cilt dokularında miR29 ekspresyonlarını belirledikten sonra, fibroproliferatif skar ve cilt fibroblastlarında miR29'u inhibe ettik ve keloid fibroblastlarda baskılanma sonrası COL1A, hipertrofik skarlarda ise COL3A ve HSP47 protein seviyelerinde anlamlı bir artış bulduk. TGF- β /Smad sinyal yolağı da miR29'un bastırılmasıyla aktive edildi. Hipertrofik skarda TIMP-1 geni ve protein düzeyleri artarken, keloidde TIMP-1 gen ekspresyonu artarken protein düzeyi azaldı. Bu bulgular, miR29'un fibroproliferatif skar oluşumunda etkili olduğunu ve bu aktivitenin miR29 ekspresyon seviyesi ile ilgili olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: fibrozis; deri; miR29; HSP-47; LOX; TGF- β /Smad sinyal yolağı

ABSTRACT

Investigation of The Presence of miR-29 Family, Effect of miR-29 on Collagen Maturation and Role in Signaling Pathways Related to Extracellular Matrix Synthesis in Fibro-Proliferative Scars

Duygu Harmancı Karagülle

**Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Molecular Medicine
35340, Balçova-İzmir
duyguharmanci@gmail.com**

Abnormal wound healing can cause fibroproliferative scar formation. These are hypertrophic scarring and keloids. Hypertrophic scar is a fibrotic pathology that continues to grow in the wound. Keloids are fibrous benign tumors that continue to grow beyond the wound boundaries. The mechanisms of both pathological conditions are still not fully elucidated. They are characterized by increased collagen deposition. Therefore, targeting collagen synthesis may be the right approach for treatment. Evidence is emerging for the efficacy of the miR29 family in fibrotic diseases, and extracellular matrix proteins predominate among target molecules. In this study, we examined the role of miR29 family in fibroproliferative scars, the role of HSP47 and LOX in collagen maturation and collagen synthesis by TGF- β / Smad pathway. After determining miR29 expressions in fibroproliferative scar and healthy control skin tissues, we inhibited miR29 in fibroproliferative scar and skin fibroblasts and found a significant increase in COL1A after suppression in keloid fibroblasts, and in COL3A and HSP47 protein levels in hypertrophic scars. The TGF- β / Smad signaling pathway was also activated by the suppression of miR29. While TIMP-1 gene and protein levels increased in hypertrophic scar, TIMP-1 gene expression increased and protein level decreased in keloid. These findings show that miR29 is effective in fibroproliferative scar formation and this activity is related to the level of miR29 expression.

Key words: fibrosis; skin; miR29; HSP-47; LOX; TGF- β /Smad signaling pathway

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yara iyileşmesi, hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme gibi kompleks aşamalardan oluşan normal bir biyolojik süreçtir (1–3). Bu aşamalarda oluşan herhangi bir sorun nedeniyle yaralar bazen aşırı ve düzensiz iyileşme gösterebilirler (4,5). Bu durumda hastalar büyük skarlarla yaşamlarını sürdürmek durumunda kalırlar. Fibroproliferatif skarlar olarak adlandırılan keloidler ya da hipertrofik skarlar bu durumun patolojik tanımıdır (1,6). En basit tanımıyla keloid, fibröz aşırı büyümedir; hipertrofik skar ise keloidin yara sınırları içinde kalmış hali olarak kabul edilirler (7,8). Fibroproliferatif bu durumlarda kollajen sentezinde artış gözlenmiştir (9). Kollajen sentezini kontrol altına almak bu patolojik durumların tedavisi için anahtar bir yol olarak görülmektedir (10). Her iki patolojik durum için altta yatan neden/nedenler halen belirsizliğini korumaktadır (6,9). Bu fibröz durumların patolojilerini açıklamaya çalışan araştırmalar giderek artmaktadır (11–14).

Post-transkripsiyonel gen regülasyonunda önemli rolü olan mikroRNA'lar (miRNA), küçük, kodlama yapmayan RNA'lardır (15). miRNA'lar, hücrelerin yaşamsal süreçlerinin pek çoğunda görev almakla birlikte son dönemde bazı miRNA'ların ifade kayıplarının ya da yokluklarının çeşitli fibrotik bozukluklarla ilişkili olduğuna dair kanıtlar artmaktadır (16,17). Bu miRNA'lardan biri de miRNA29 (miR29) ailesidir (18). miR29 ailesinin ana üç üyesi bulunmaktadır: miR29a, miR29b, miR29c (19). miR29 ailesine olan özel ilgi aile üyelerinin ekstrasellüler matriks (ESM) proteinlerinin sentezini inhibe etme yeteneklerinden ileri gelmektedir (20). miR29 aile üyelerinin anti-fibrotik özelliği bulunduğu *Targetscan* programı ile yapılan taramada ailenin olası hedef molekülleri içinde kollajenlerin büyük yer tutmasıyla da ortaya konmuştur (19–21).

Kollajen, vücudumuzda en fazla miktarda bulunan ve olgunlaşmış olarak sentezlenebilen lifsel ekstraselüler matriks proteindir (22). Fibrotik süreçler, ESM'de kollajen biyosentezindeki artış ile karakterizedir (23). Kollajen biyosentezi, lizil oksidaz (LOX) ve ısı şok proteini -47 (HSP47) gibi intraselüler ve ekstraselüler pek çok faktörün yer aldığı çok basamaklı bir süreçtir (22). LOX ve HSP47, kollajen maturasyonu için esansiyel moleküllerdendir (24). Bir ısı şok proteini ve moleküler

şaperon olan HSP47, endoplazmik retikulumda prokollajene bağlanır ve prokollajenin işlenmesinde önemli rol oynar (25). Bakır bağımlı bir amin oksidaz olan LOX, kollajen ve elastin kovalent çapraz bağlanmalarını lizin ve hidroksilizin kalıntılarının aminoadipik semi aldehitlere oksidatif deaminasyonunu katalizleyerek başlatır (26). ESM stabilitesi, LOX aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir (22). Bu esansiyel moleküller üzerinde, hedef molekülleri arasında kollajenlerin büyük yer tuttuğu miR29 ailesinin etkisinin olabileceği ve çeşitli fibrotik hastalıkların oluşum süreçlerinde rollerinin olabileceği düşünülmektedir (27,28).

Kollajen biyosentezi yanında fibrozis ile ilişkili hastalıkların patogenezinde ön plana çıkan en önemli sinyal yolağı olan TGF- β /Smad sinyal yolağının anormal yara iyileşmesi ve aşırı yara oluşumunda kollajen sentezini uyardığı gösterilmiştir (29). Transforme edici büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1), ESM proteinlerinin sekresyonu, sentezi ve transkripsiyonunu artıran yönde etki gösterirken, ESM degradasyonunu iki ana mekanizma yoluyla azaltır (30,31). İlk mekanizmada TGF- β 1, ESM degradasyonundan sorumlu matriks metalloproteinazları (MMP'ler) inhibe eder ya da ikinci mekanizmayı kullanarak metalloproteinazların dokusal inhibitörlerini (TIMP'ler) teşvik eder (31,32). TGF- β 1'in, organ fibrozislerinde ESM üretiminin ana kaynağı olarak gözlenen fibroblastlar üzerinde de önemli etkileri vardır. Bu yolak, fibroproliferatif skarların oluşum mekanizmalarında da etkin bir sinyal yolağıdır, ancak miR29 ailesinin bu yolak üzerinde nasıl bir etkisi olduğu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (33).

Tüm bu bilgiler ışığında, bu araştırmanın bilimsel soruları: fibro-proliferatif skar dokularında miR29 aile üyelerinin bulunurluğu nedir, ailenin kollajen maturasyonuna ve ESM sentezinden sorumlu sinyal yolakları üzerine etkisi nedir? şeklinde sorulmuş ve "fibro-proliferatif skar dokularında miR29 aile üye/üyleri normal dokudan farklı olarak daha az ifade olmakta ve bu farklılık kollajen maturasyonunu ve ESM sentezinden sorumlu yolakların çalışmasını etkileyerek fibrotik gelişimi alevlendirir," hipotezi kurulmuştur.

Bu araştırmanın amacı, fibro-proliferatif skarlarda miR29 aile üyelerinin: miR29-a, miR29-b-1, miR29-b-2, miR29-c varlığının incelenmesi, ailenin kollajen

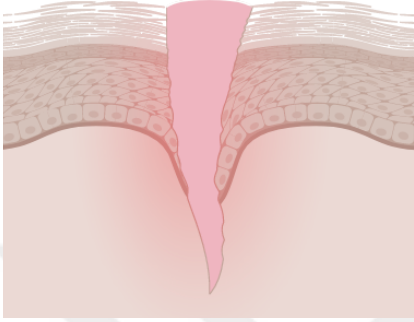
maturasyonuna ve ESM sentezinden sorumlu yolların çalışmasına etkisinin değerlendirilmesidir.

Bu amaç doğrultusunda ulaşılması gereken hedefler aşağıda sıralanmıştır:

- miR29 aile üyelerinin: miR29-a, miR29-b-1, miR29-b-2, miR29-c mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi,
- miR29 aile üyelerinin: miR29-a, miR29-b-1, miR29-b-2, miR29-c dokudaki hücre içi lokalizasyonlarının belirlenmesi,
- Kollajen maturasyonu için gerekli Lizil oksidaz (LOX) aktivitesinin ve protein ekspresyonunun; ayrıca ısı şok proteini-47 (HSP47) protein ekspresyonunun belirlenmesi,
- Tüm deney gruplarında kollajen-1 (COL1), kollajen-3 (COL3) ve fibronektin protein ekspresyonlarının belirlenmesi,
- Tüm deney gruplarında fibril oluşumunun elektron mikroskopik olarak görüntülenmesi,
- Profibrotik moleküller; TGF- β , Smad2, Smad3, Smad4, Bağ doku büyüme faktörü (CTGF), TIMP1 ve Antifibrotik molekül; Smad7 için gen ekspresyonlarının belirlenmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara nedir?



İlk olarak Antik Mısır'da tanımlanan ve tedavi edilmeye başlayan yara, cilt ya da diğer vücut dokularının bütünlüğünün bozulduğu ya da künt kuvvet travmasının kontüzyona neden olması sonucu oluşan açık ya da kapalı harabiyet ifade eden bir terimdir (35,36).

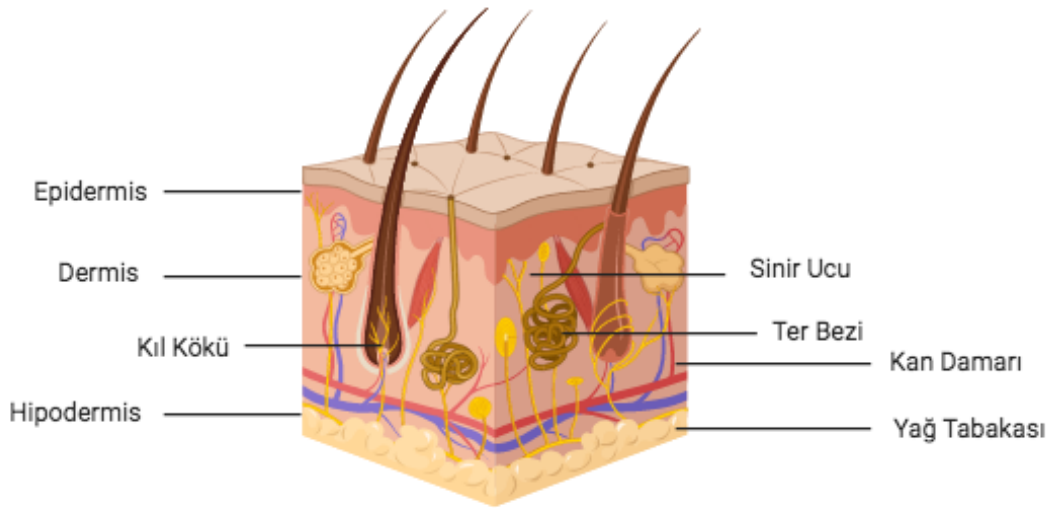
Şekil 1.Yara (<https://app.biorender.com/>)

Genellikle kazalar nedeniyle oluşsalar da ameliyat gibi sebeplerle de oluşmaları mümkündür. Yaralar için oluş zamanına göre (akut, kronik); deri bütünlüğüne göre (açık, kapalı); derinin şekline göre veya bulaş durumuna göre (temiz, kontamine, kirli) pek çok farklı sınıflandırma yapmak mümkündür (34). 1994 yılında Dünya Yara İyileşmesi Derneği tarafından yaranın tanımlanması ve yara iyileşmesinin değerlendirilmesine ilişkin standartlar belirlenmiştir (3). Yara biyolojisi ve fizyolojisinin yanında yara iyileşmesi dinamiğini de anlayabilmek için deri hakkında fikir sahibi olmak önemlidir.

2.2. Deri

Vücudun en büyük organı olan deri, oldukça önemli immün ve koruyucu karakteristikleri olan ilk savunma hattımızdır (35). Değişmeden, skarlaşarak iyileşme yeteneğine sahiptir. Skarlaşma, iç (hasta karakteristikleri, sağlık durumu) ve dış (iyileşen çevre) pek çok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterir. Epidermis, dermis ve hipodermis olarak üç katmandan oluşur. Epidermis ise kendi içinde beş katmana ayrılır: *stratum corneum* (boynuzsu tabaka), *stratum lucidum* (önleyici tabaka),

stratum granulosum (granüler tabaka), *stratum spinosum* ve *stratum basale* (bazal hücre tabakası). Epidermisin kalınlığı dokuya göre değişkenlik gösterir. Bu kalınlık, yara iyileşmesi ve skarlaşma dinamiğini de etkiler (36).



Şekil 2. Deri Biyolojisi (BioRender ile tasarlanmıştır. <https://app.biorender.com/>)

Histolojik olarak deri incelendiğinde, avasküler olan epidermisin %95'inin keratinositlerden oluştuğu görülmektedir. Bazal hücre tabakası bu keratinositlerin ana kaynağıdır. Yara iyileşmesine verilen primer yanıtta bu keratinositler sorumludur. *Stratum basale*, dermisten yukarı uzanan benzer yapılarla birbirine kenetlenen parmak benzeri çıkıntılar gösterir. Yeni iyileşen yaralar ve deri greftleri başlangıçta bu reteridlerden yoksundur; bu da onları erken dönemde makaslama travmasına yatkın hale getirir (37).

Epidermis ayrıca, yağ bezleri, ekrin ter bezleri ve apokrin bezleri ile ilişkili saç folikülleri gibi temel uzantıları da içerir. Piloseböz ünite ve rete sırtları, yeniden üretilip bazal keratinositlere dönüşebilen ve reepitelizasyon süreci için gerekli epitel kök hücreleri içerir. Bu kök hücreler, nispeten farklılaşmadıkları, büyük bir çoğalma potansiyeline sahip oldukları ve yüksek bir kendini yenileme kapasitesine sahip oldukları için kritik öneme sahiptir. Bu kök hücreler, yanık gibi ve hatta dermabrazyon gibi iyatrojenik kaynaklarla yok edildiğinde iyileşme zorlukları görülür. Dermabrazyon

ve yüzey yenileme çok derin olduğunda, apokrin bezlerini ve pikosebasöz birimlerini tahrip ederek uygunsuz iyileşmeye ve sonunda skar oluşumuna neden olabilir (38).

Bir diğer katman olan dermis, deri için en büyük kan kaynağını sağlayan ve apokrin bezleri, ekrin bezleri ve saç folikülleri dahil olmak üzere cildin dermal uzantılarının çoğunu içerir. Bu tabakanın kendisi yüzeysel ve papiller bir dermise ve daha derin retiküler dermise ayrılır. Genel bir kural olarak, bu daha derin retiküler tabakaya yayılan herhangi bir hasar her zaman skar oluşumuna neden olur ve uygun iyileşmeyi sağlamak için tam kalınlıkta greftler veya fleplerle onarım gerektirebilir (37,38).

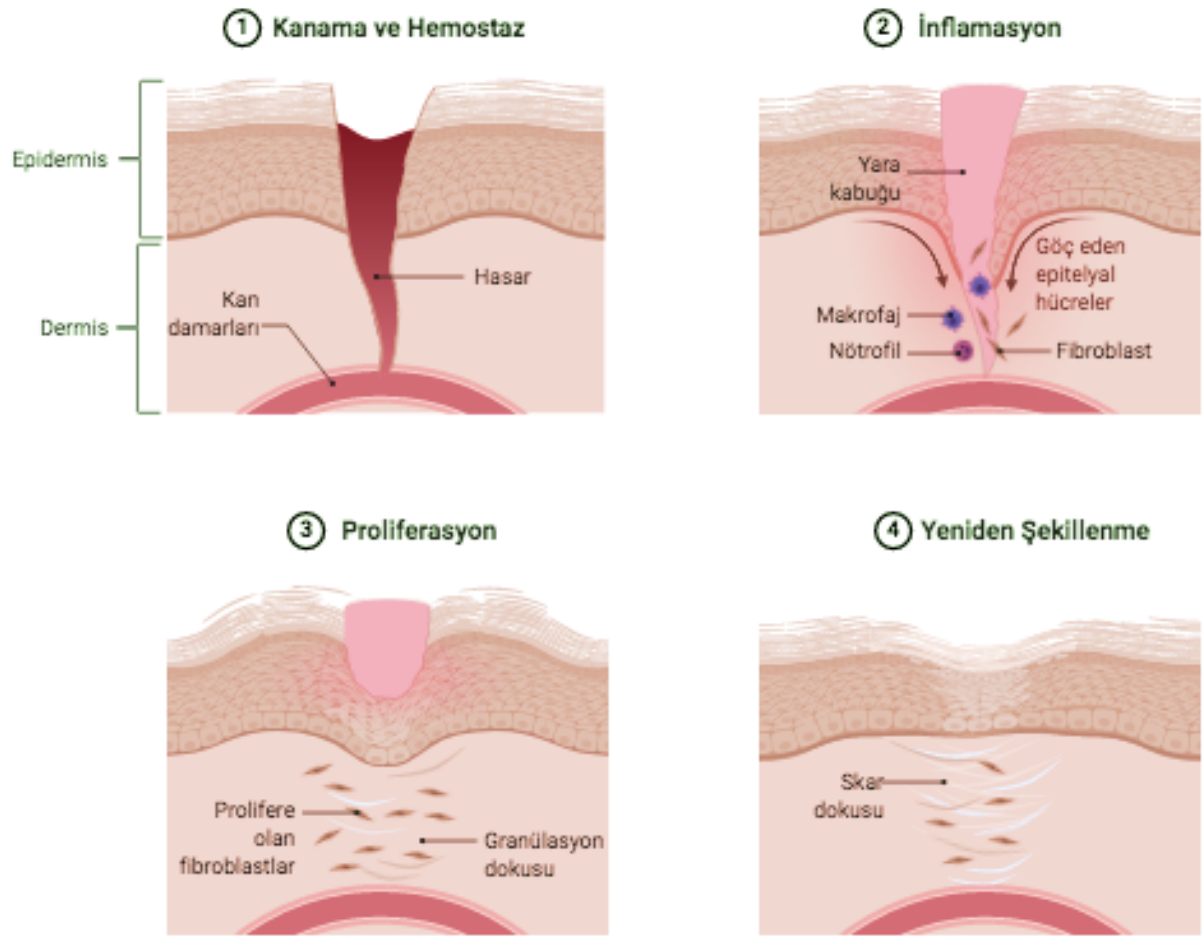
Üçüncü katman hipodermis, esas olarak gevşek bağ dokusundan oluşur. Özellikle proteoglikan ve glikozaminoglikanlar açısından zengindir. Hipodermiste bulunan hücre tipleri fibroblastlar, adipoz hücreler ve makrofajlardır. Hipodermisi oluşturan doku mikrovakuolar bir dokudur ve dokunun yapısal sertliğini dinamik olarak değiştiren interstisyel sıvı için aktif rezervuar görevi görür (39).

Bu üç katman ve içeriklerindeki hücreler yara iyileşmesi sürecinde birbiriyle iç içe geçmiş şekilde ve kol kola çalışırlar.

2.3. Yara İyileşmesi

Vücudumuzdaki kemik hariç tüm epitelyal dokular rejenerasyondan ziyade skar oluşumu ile iyileşirler (40). Bu iyileşme sürecinin birbiri içine geçmiş aşamaları: inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme olarak tanımlanır. Yetişkin insanlarda, optimal yara iyileşmesi şu olayları içerir:

- Hızlı hemostaz,
- Uygun iltihaplanma,
- Mezenkimal hücre farklılaşması, proliferasyonu ve yara bölgesine göç,
- Uygun anjiyojenez,
- Yeniden epitelizasyon,
- İyileşen dokuya güç sağlamak için kollajenin uygun sentezi, çapraz bağlanması ve hizalanması (41).



Şekil 3. Yara İyileşmesi Fazları (BioRender ile tasarlanmıştır. <https://app.biorender.com/>)

İnflamatuar faz sırasında, hemostaz meydana gelir ve akut bir inflamatuvar sızıntı oluşur. Proliferatif faz, fibroplazi, granülasyon, kasılma ve epitelizasyon ile karakterizedir. Son aşama, genellikle skar olgunlaşması olarak tanımlanan yeniden şekillenmedir.

2.3.1. İnflamasyon

İnflamasyon, yara iyileşmesinin ilk aşamasıdır. Doku hasarından sonra, yırtılmış damarlar hemen daralır ve ağırlıklı olarak subendotelden gelen tromboplastik doku ürünleri açığa çıkar. Trombositler toplanır ve ilk hemostatik tıkaçı oluşturur. Pıhtılaşma ve tamamlayıcı kaskadlar başlatılır. İçsel ve dışsal pıhtılaşma yolları, fibrinojeni fibrine dönüştürecek olan trombinin protrombin üzerinden aktivasyonuna

yol açar. Damar içi pıhtılaşma (trombus) oluştuğunda yarada hemostaz sağlanır. Toplanan trombositler degranüle olur. Lokal fibroblastlar, inflamatuvar hücreler için güçlü kemoatraktanlar; endotel hücreleri için aktivasyon faktörleri ve vazokonstriktörler salarlar. İntegrin reseptörleri de trombositlerle birlikte çalışırlar. Böylece dakikalar içinde onarım işlemleri başlatılır. Trombosit faktörlerinin neden olduğu geçici vazokonstriksiyondan sonra, lokal küçük damarlar pıhtılaşma ve kopleman kaskadlarının etkilerine bağlı olarak genişler. Kan damarı geçirgenliği artmasıyla nötrofil ve monositler yara bölgesine çekilir. Nötrofillerin kritik bir işlevi, yara bölgesindeki istilacı mikropların ve hücrel döküntülerin temizlenmesidir, ancak bu hücreler ayrıca bazı ek hasarlara neden olan proteazlar ve reaktif oksijen türleri (ROT) gibi maddeler de üretirler (42).

Makrofajlar yara iyileşmesinde birden fazla rol oynarlar. Erken dönemde, ilave lökositler alarak ve aktive ederek inflamatuvar yanıtı destekleyen sitokinler salgırlar. Ayrıca apoptotik hücrelerin indüklenmesi ve temizlenmesinden sorumludurlar. Böylece iltihabın çözülmesini sağlarlar. Makrofajlar bu apoptotik hücreleri temizledikçe, doku yenilenmesini desteklemek için keratinositleri, fibroblastları ve anjiogenez uyarıcı onarıcı bir duruma fenotipik bir geçiş yaparlar. Bu şekilde makrofajlar, iyileşmenin proliferatif aşamasına geçişi desteklerler (43).

T lenfositler, inflamatuvar hücreleri ve makrofajları takiben yaralara göç ederler ve geç proliferatif/erken yeniden şekillenme fazında pik yaparlar. Yara bölgesinde azalmış T hücresi ya da gecikmiş T hücresi infiltrasyonunun, bozulmuş yara iyileşmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Yara iyileşmesi açısından T lenfositlerin rolü henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Buna rağmen, deride bulunan dendritik epidermal T-hücreleri keratinositler tarafından aktive edilerek çeşitli büyüme faktörlerinin üretimini tetikler. Böylece yara iyileşmesinin korunarak devamı sağlanır (36).

2.3.2. Proliferatif Faz

Proliferatif faz, inflamatuvar fazı takiben ve iç içe geçmiş halde epitelyal proliferasyon ve yara içindeki geçici matriks üzerinde yer değiştirme (yeniden

epitelizasyon) ile karakterizedir. Fibrin ve fibrinojen matriksinin birikmesi ve lokal fibroblastların aktivasyonu ve dönüşümü ile başlar. Başlangıç fibrin-fibrinojen matriksi trombositler ve makrofajlarla doludur. Bu makrofajlar ve lokal hücre dışı matriks, fibroblast aktivasyonunu başlatan büyüme faktörlerini serbest bırakır. Fibroblastlar, yeni oluşan fibrin-fibrinojen matriksini bir yapı iskeleti olarak kullanarak yaraya geçerler. Lokal fibroblastlar, hücre bölünmesi için hazırlık aşamasında aktive olur ve protein sentezini arttırlar. Fibroblastlar çoğaldıkça temiz, enfekte olmayan yaralarda 3 ila 5 gün arasında öne çıkan hücre tipi haline gelirler. Hücre bölünmesi ve çoğalmasından sonra, fibroblastlar hücre dışı matriks ürünlerinin sentezine ve salgılanmasına başlar. İntegrinler, hücre dışı, zar ve hücre içi alanlara sahip transmembran proteinlerdir. Heterodimeriktirler ve aktif protein reseptörünü oluşturmak için etkileşime giren alfa ve beta alt birimlerinden oluşurlar. Ligandlar, büyüme faktörlerini, kollajen, elastin gibi ESM yapısal bileşenlerini ve diğer hücreleri içerir. Ligandlar bağlandıktan sonra, integrin reseptörünün sitoplazmik alanında yapısal bir değişiklik meydana gelir ve fosforilasyon başlar. Sinyal iletimi, transkripsiyon faktör sentezi ve hücresel işlevi destekleyen yeni gen ekspresyonu ile sonuçlanır. Geçici ilk yara matriksi fibrin, glikozaminoglikan (GAG) ve hyaluronik asitten (HA) oluşur. Hyaluronik asit, yapısı nedeniyle hücre göçünü artıran bir matriks sağlar. Fibroblastlar yaraya girip yerleşirken, geçici hyaluronik asitten zengin matriksi sindirmek için hyaluronidaz kullanırlar ve daha sonra da daha büyük, sülfatlanmış GAG'ler biriktirilir. Aynı zamanda, kollajenler, düzensiz bir dizide fibroblastlar tarafından fibronektin ve GAG yapı iskeleti üzerine biriktirilir (41).

Kollajen tip I ve III, hücre dışı matriksin başlıca fibriller proteinleridir. Fibroblastlar tarafından sentezlenirler. Onarıcı dermiste fibroblastlar ve endotel hücreleri, en belirgin hücre tipleridir ve kılcaklı büyümeyi, kollajen oluşumunu desteklerler. Yara yatağında fibroblastlar, hücre dışı matriksin ana bileşenleri olan kollajen, glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar üretir. Güçlü proliferasyon ve ESM sentezinin ardından, yara iyileşmesi yıllarca sürebilen son yeniden şekillenme aşamasına girer (3).

2.3.3. Yeniden Şekillenme

Bu aşamada, yeni oluşan kılcal damarların çoğunda gerileme meydana gelir, böylece yaranın vasküler yoğunluğu normale döner. Yeniden şekillenme aşamasının kritik bir özelliği, ESM'nin normal dokuya yaklaşan mimariye yeniden biçimlendirilmesidir. Ayrıca yara, miyofibroblastlar aracılığıyla tüm süreç boyunca kasılmaya uğrar. ESM, hücreleri hem hasarlı hem de sağlıklıyken destekleyen yapı iskelesidir. ESM dinamiktir ve onarım sürekli olarak yeniden şekillenmektedir. Yeniden şekillenmede, sentez, biriktirme ve bozunma arasında bir denge vardır (44). Lizil oksidaz, moleküller arası kollajen çapraz bağlama enzimidir. Kollajen çapraz bağlanması yara gerilme mukavemetini artırır. Kollajenazlar, jelatinazlar ve stromelizinler ESM bileşenlerini yıkan matriks metalloproteinazlardır. Kollajen birikimi ve yıkımı dengesi, kısmen MMP aktivitesinin düzenlenmesiyle belirlenir. Matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP'ler), MMP'leri spesifik olarak inaktive eder. ESM yeniden şekillenmesi sırasında MMP-TIMP dengesinin düzenlenmesi oldukça önemlidir. Yara iyileşmesinin bir diğer sonucu ise skar oluşumudur. Skar, morfolojik olarak çevreleyen normal doku mimarisine kıyasla doku organizasyonunun yokluğu olarak tanımlanır ve düzensiz kollajen birikimi ile karakterizedir. Fibroblastlar tarafından salgılanan yeni kollajen lifleri, yaralanmadan üç gün sonra ortaya çıkar. Kollajen matriks oluştuğunda, yoğun şekilde paketlenmiş lifler yara bölgesini doldurur. Skardaki nihai kollajen modeli, yoğun şekilde paketlenmiş liflerden biridir ve yara almamış dermiste bulunan retiküler model değildir (43).

Yeniden şekillenme sırasında, yaralar zamanla giderek güçlenir. Yara gerilme direnci, yaralanma sonrası bir ila sekiz hafta arasında hızla artar. Bundan sonra ise daha yavaş bir hızda artar. Doku onarımının nihai sonucu, kırılğan, normal deriye göre daha az elastik olan ve saç kökleri veya ter bezleri gibi herhangi bir deri eki içermeyen skardır. Skarla onarımın en büyük faydası, doku bütünlüğünün nispeten hızlı bir şekilde yenilenmesidir (45).

Özetle yara iyileşmesi, hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenmeden oluşan karmaşık, dinamik biyolojik bir süreçtir. Bu sürece nötrofiller, makrofajlar, lenfositler, keratinositler, fibroblastlar ve endotelial hücreler dahil çok sayıda hücre tipi katılır. Birden fazla faktör, sürecin bir veya daha fazla aşamasını

etkileyerek yara iyileşmesinin bozulmasına neden olabilir. Ayrıca yerel ve sistemik faktörler olarak kategorize edilirler. Süreçteki kesintiler, anormallikler veya uzama, gecikmiş yara iyileşmesine veya iyileşmeyen kronik bir yaraya neden olabilir.

2.4. Anormal Yara İyileşmesi

Fibroz, adhezyonlar ve kontraktürler gibi aşırı yara iyileşmesi durumlarının yanı sıra kronik iyileşmeyen ülserler, tekrarlayan fıtıklar ve yara açılması gibi yetersiz yara iyileşmesi durumlarının tamamı anormal yara iyileşmesi olarak tanımlanır (46). Yara iyileşmesi aşamalarının herhangi birinde ya da birkaçında yaşanan aksaklıklar sonucunda gelişmesi kuvvetle muhtemeldir. Yara iyileşmesinin ilk aşaması sayılan hemostaz basamağında salgılanan büyüme faktörlerinin düzeyindeki bir aşırılık anormal yara iyileşmesini tetikler. Fibrotik durumların açığa çıkmasının ana kaynağı TGF- β 'nın aşırı düzeyi olarak gösterilmiştir (29,30).

İnflamasyon aşamasına baktığımızda bu aşamada etkin rol alan nötrofillerin salgıladığı matriks yıkılıma uğratan enzimlerin düzeylerindeki artışın kronik iyileşmeyen yaraların sebebi olduğu gözlenmiştir (13).

Proliferatif fazda ise fibroblast proliferasyonu baskındır ve TGF- β yara iyileşmesinde ciddi bir oyuncudur. TGF- β aşırı ekspresyonu fibroblast proliferasyonunu artırarak fibroze ve dolayısıyla anormal yara iyileşmesine neden olur (47).

Yeniden şekillenmede, MMP ve inhibitörleri TIMP'lerin dengesi bozulduğunda yara iyileşmesi süreci de bozulur. MMP'ler fazla olduğunda aşırı kollajen birikimi olan durumlar açığa çıkabilir. MMP ekspresyonu da TGF- β ile düzenlenir. Bu nedenle TGF- β ve MMP düzeylerindeki artma ya da azalma kronik yaralarla ya da keloid gibi anormal skarlarla ilişkilidir (4,46).

Bozulmuş iyileşme, yukarıdakilerden farklı olarak oksijenasyon, mikrobiyal varlık ve venöz besleme gibi nedenlerle de ortaya çıkabilir. Aynı zamanda yaranın boyutu, bireysel bağışıklık ve tepkiler, yara bakımı da etkilidir. Sıklıkla karşılaşılan durum, uzamış inflamasyon fazı nedeniyle proliferasyon fazına ilerlenememesidir (48).

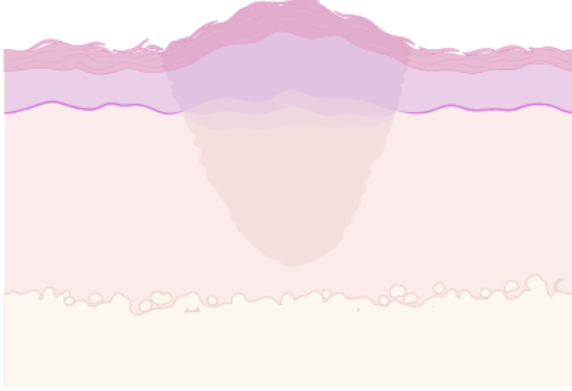
Temel olarak bir yaranın estetikten ziyade işlevselliğini geri kazanmaya yönelik olan skar oluşumu ile iyileşme süreci, karmaşıklığına rağmen oldukça düzenlidir. Bu düzenli sürecin regülasyonunun bozulması orijinal yara sınırlarını aşan aşırı skar oluşumuyla sonuçlanabilir. Bunlara fibroproliferatif skarlar denir.

2.4.1. Fibroproliferatif Skarlar

Genel olarak doku fibrozu yaralanmayı takiben oluşur ve anormal bir yara iyileşmesi süreci sunar. Deri fibrozunun ilerlemesini, fibroblastlarda kronik ya da akut inflamasyon, intrinsik profibrotik değişiklikler izleyebilir ve bu süreç sitokinler, büyüme faktörleri ve farklı hücre tiplerini içerir. Endotel hücreleri hasar gördüklerinde bağışıklık hücrelerini aktive eden belirli sitokinleri salgılar. Sonuç olarak, aktive olan bağışıklık hücreleri fibrotik büyüme faktörleri salgılar. TGF- β , interleukin-4 (IL-4), interferon- γ (IFN- γ) ve tümör nekroz faktörü (TNF- α), bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) de deri fibrozis sürecine katılır. Büyüme faktörlerinin eylemleri nedeniyle fibroblastlar çoğalır ve fibrozis sürecinde miyofibroblastlara farklılaşırlar (9).

Yaralar, iyileşme sürecinde gelişen fibrotik durumlar nedeniyle bazen aşırı iyileşme sergileyebilirler. Uzamış inflamasyon aşamasında durum kontrol altına alındığında proliferasyon ve yeniden şekillenme aşamaları devreye girse bile oluşan skar aşırı ve fibrotik olur. Bu konuda yapılan araştırmalar halen bu durumu açıklamak için yeterli değildir. Bu aşırı iyileşen yaraların yara sınırları içinde olanına hipertrofik skarlar denirken yara sınırlarını aşarak büyüyenlere keloid adı verilir. Bu patolojik durumlar fibrozisle ilişkilidir (14).

2.4.1.1. Hipertrofik Skarlar



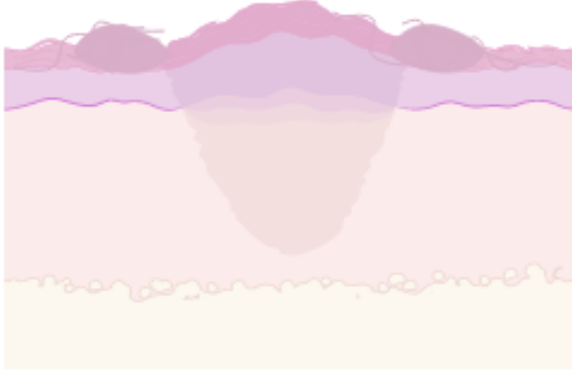
Hipertrofik skarlar (HS), cilt hasarının en yaygın komplikasyonunu temsil eder ve hipervaskülarite, hücre dışı matriks bileşenlerinin patolojik birikimi ile karakterize edilen aşırı kutanöz yara iyileşmesinden kaynaklanır (9).

Şekil 4. Hipertrofik Skar (BioRender ile tasarlanmıştır. <https://app.biorender.com/>)

Optimal ve spesifik herhangi bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir. Yara iyileşmesi patolojisinde temel efektör hücreler olan fibroblastlar ve miyofibroblastların hipertrofik skarların ilerlemesi ve gerilemesi üzerinde etkileri vardır (49). Hipertrofik skarların oluşumu, dermal dokunun proliferasyonu ve fibroblasttan türetilmiş hücre dışı matriks proteinlerinin aşırı birikiminin kalıcı inflamasyon ve fibroz ile sonuçlandığı, yapısal olarak aktif bir yara iyileşmesi proliferatif fazını içerir. Sonuç olarak, orijinal cilt hasarı, işlevsel olmayan bir doku kütlesi ile yer değiştirir (14).

Hipertrofik skarların görülme sıklığı keloidlere göre daha fazladır. Herhangi bir yaşta ve her iki cinsiyette de görülebilirler. Kadınlarda menopoza sonrası gerileme gözlemlendiği olmuştur. Yaralanma, dövme, pirsing (*piercing*), ameliyat, aşı gibi işlemlerden sonra oluşabilirler (12,50).

2.4.1.2. Keloid



Keloid, anormal yara iyileşme yanıtından kutanöz yaralanmaya gelişen fibröz dokunun benign hiperproliferatif büyümesidir (11). Hipertrofik skarlardan farklı olarak keloidler, normal deriyi istila eden orijinal yaranın sınırlarının ötesine uzanır.

Şekil 5. Keloid (BioRender ile tasarlanmıştır. <https://app.biorender.com/>)

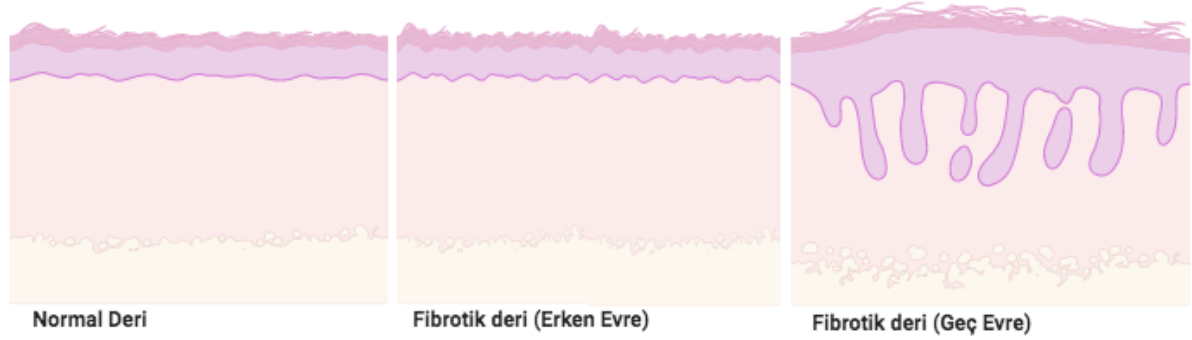
Sert nodüller olarak görünür; genellikle kaşıntılı ve zaman zaman ağrılıdır. Kendiliğinden gerilemez; aksine zamanla büyümeye devam ederler. Tam olarak nedeni bilinmemekle birlikte sıklıkla göğüs, omuz, üst sırt, ense ve kulak memelerinde görülürler. İnsidansı düşük olmakla birlikte siyahilerin keloid geliştirme riski beyazlara göre 15 kat daha fazladır (12).

Patolojisi tam olarak aydınlatılamamış olan keloidlerden elde edilen fibroblastlarda tip I prokollajenin aşırı ifadesi ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), TGF- β , PDGF gibi büyüme faktörlerinin yüksek seviyeleri gözlenmiştir. Artmış kollajen ve MMP üretimi olduğu gösterilmiştir. Genetik yatkınlığı gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (7,51).

Hem keloid hem hipertrofik skar fibroblastlarının uyaranlara verdikleri cevaplar farklıdır. Keloidlerde yüksek kollajen sentez kapasitesi varken hipertrofik skarlar daha yavaş bir artış gösterme eğilimindedirler (6,50). Birbirine benzemekle birlikte klinik görünüşleri, davranışları ve oluşum paternleri farklılık gösterir. Buna rağmen her ikisi için de ESM sentezini kontrol altına almak ve kollajen sentezini baskılamak temel tedavi hedefi olarak görülmektedir. Deri fibrozunun en önemli iki mekanizması olan kollajen sentezi ve düzenleyici yollarının en temeli sayılan TGF- β sinyal yolağını kavramak bu patolojileri daha iyi anlamak için önemlidir (52).

2.5. Deri Fibrozu

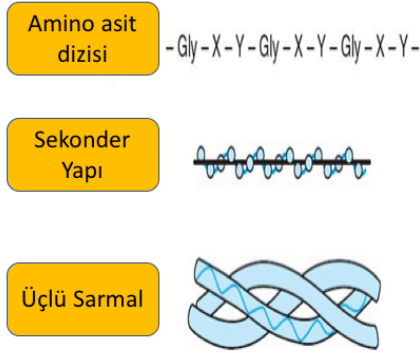
Fibroz, fibroblast proliferasyonu, aşırı sentez ve hücre dışı matriks birikmesi ile karakterizedir. Fibrotik hastalıklar, organ tutulumu yaparak belirli bir organa hasar verebilecek boyuta geçebilir.



Şekil 6. Deri Fibrozu (BioRender ile tasarlanmıştır. <https://app.biorender.com/>)

Deri fibrozu, skleroderma, hipertrofik skar, keloid ve greft-host hastalığı içeren yaygın bir fibrotik hastalıktır. Genellikle hastaların dış görünüşünü etkiler. Deri fibrozunun spesifik mekanizması halen tamamiyla çözülebilmüş değildir (53). Fibroblast aktivasyonu, deri fibrozunda önemli bir anahtar moleküldür. Kronik inflamasyon, enfeksiyon, otoimmün ve alerjik reaksiyonlar ve radyasyon veya kimyasal hasar nedeniyle deri hasarı, fibroblastların kontrolsüz çoğalmasına neden olabilir (23). Derideki fibroblastların kalıcı aktivasyonu, esas olarak kollajen, elastin, glikoprotein ve proteoglikandan oluşan ESM sentezini destekler. Dermiste aşırı ESM birikimi deri fibrozuna neden olur. TGF- β , CTGF, PDGF gibi büyüme faktörleri ve sitokinler fibroblastların aktivasyonunu uyarır. Bunlardan en önemlisi profibrotik bir sitokin olan TGF- β -1'dir (30). TGF- β fibroblast proliferasyonunu tetikler, ESM sentezini düzenler, ESM'nin degradasyonunu inhibe eder ve fibroblastların inflamatuvar hücreler tarafından miyofibroblastlara dönüşümünü uyarır. TGF- β /Smad sinyal yolağının deri fibrotik süreçlerinde etkin olduğu gösterilmiştir (54). Deri fibrozunun olası mekanizmalarını kavrayabilmek için kollajen sentezine ve TGF- β /Smad yolağına yakından bakmak önemlidir.

2.5.1. Kollajen Biyosentezi

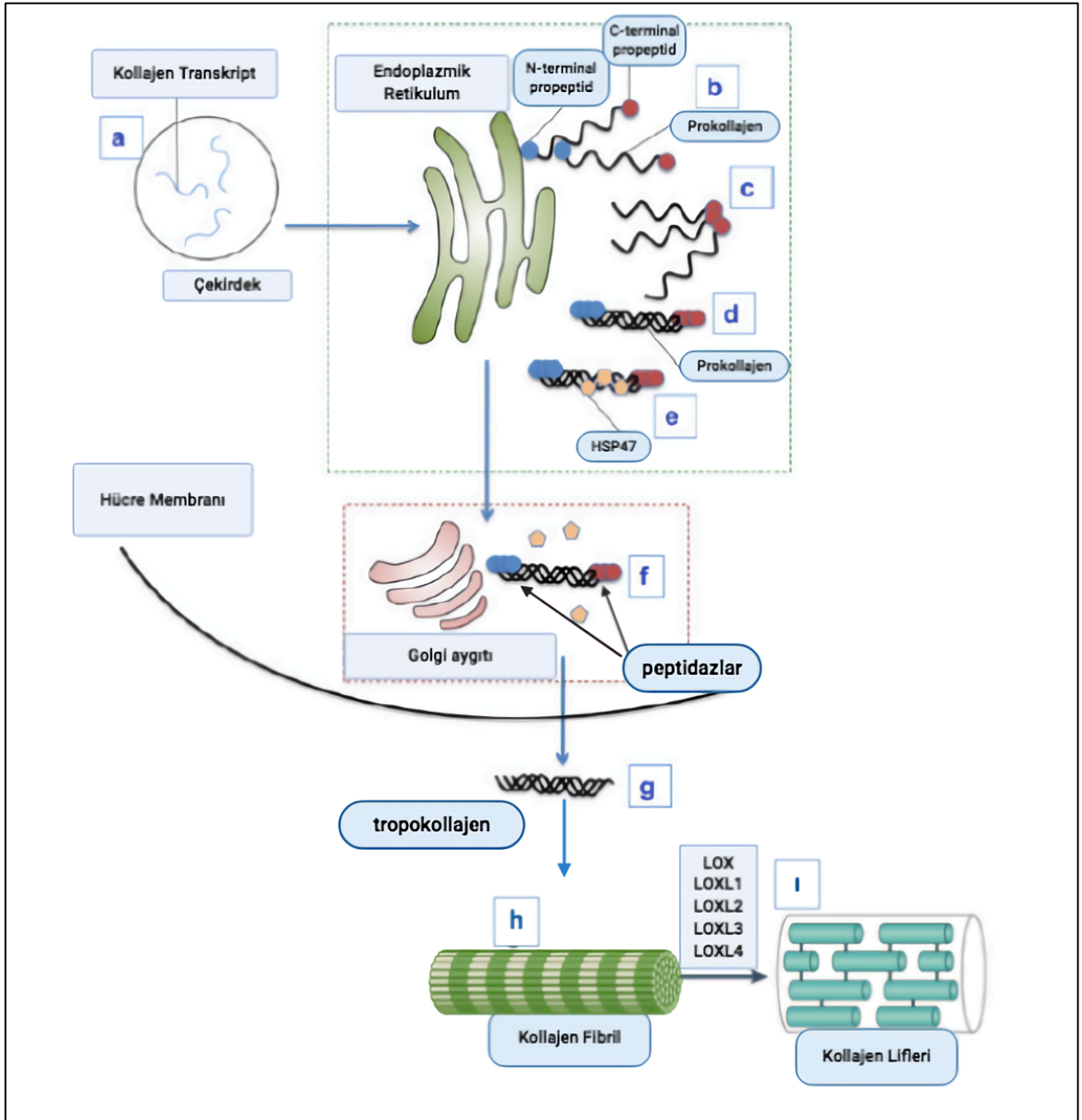


Kollajen, insan vücudunda bulunan toplam proteinin %30'undan fazlasını oluşturan bir biyomoleküldür. Fibroblastlarda, osteoblastlarda, kondrositlerde ve epitel hücrelerinin bir kısmında sentezlenir. Şu ana kadar tanımlanmış 28 farklı kollajen tipi vardır (23,54,55).

Şekil 7. Kollajenin Protein Yapısı

Kollajen biyosentezi, çok sayıda intraselüler ve ekstraselüler faktörü içeren çok basamaklı bir süreçtir. Genellikle, prokollajen molekülleri olarak sentezlenen fibril oluşturan kollajenler üzerinde çalışılmıştır. Ayrı pro alfa zincirleri, üçlü sarmalın oluşması ile durdurulan çok sayıda post-translasyonel modifikasyon (prolin ve lizin kalıntılarının hidroksilasyonu, glikozilasyonu...vb) geçirebilirler (55,56). Bir ısı şok proteini ve moleküler şaperon olan HSP47 endoplazmik retikulumda prokollajene bağlanır (28).

Maturasyon sürecinde prokollajenlerin her iki propeptidi de kesilir. N-propeptid, prokollajen N-proteinazlar tarafından kesilir. Kemik morfogenetik protein-1 (BMP-1) prokollajenlerin C-terminal propeptidlerini keser (22,57). Telopeptidler çapraz bağların oluşacağı bölgeleri içerirler. Bu işlem, lizil oksidaz enzim ailesi tarafından katalizlenen lizil ve hidroksilizil kalıntılarının oksidatif deaminasyonu ile başlatılır (24,58).



Şekil 8. Kollajen Biyosentezi a: çekirdekte kollajen mRNA oluşumu; b: ER’da prokollojen molekülünün hidroksillenmesi; c: ER’da prokollojen molekülüne galaktozil ve glikozil bağlanması; d: Prokollajen molekülünün bir araya toplanması; e: HSP47 bağlanması ile Golgiye taşınması; f: peptidazlar tarafından prokollajen molekülünün N- ve C- terminal bölgelerinin kesimi; g: tropokollajen oluşumu ve hücre dışına atılımı; h: tropokollajenlerin bir araya toplanması; i: lizil oksidaz enzimi tarafından tropokollajen molekülüleri arasında karşılıklı çapraz bağların oluşturulması (BioRender ile tasarlanmıştır. <https://app.biorender.com/>)

“Isı şok yanıtı” ilk olarak 1964’te *Drosophila*’da vurgulanmıştır ve ısı şok proteinleri (HSP’ler) olarak adlandırılan belirli bir protein süper ailesinin ekspresyonuyla karakterizedir. HSP’ler pek çok türde bulunan yüksek oranda korunmuş hücresel

proteinlerdir (59). Normal koşullarda, HSP'ler, yeni sentezlenen proteinlerin katlanmalarına, kararlılıklarına ve organellere taşınmasına yardım etmek için olgun ve olgun olmayan proteinlerle etkileşirler (60).

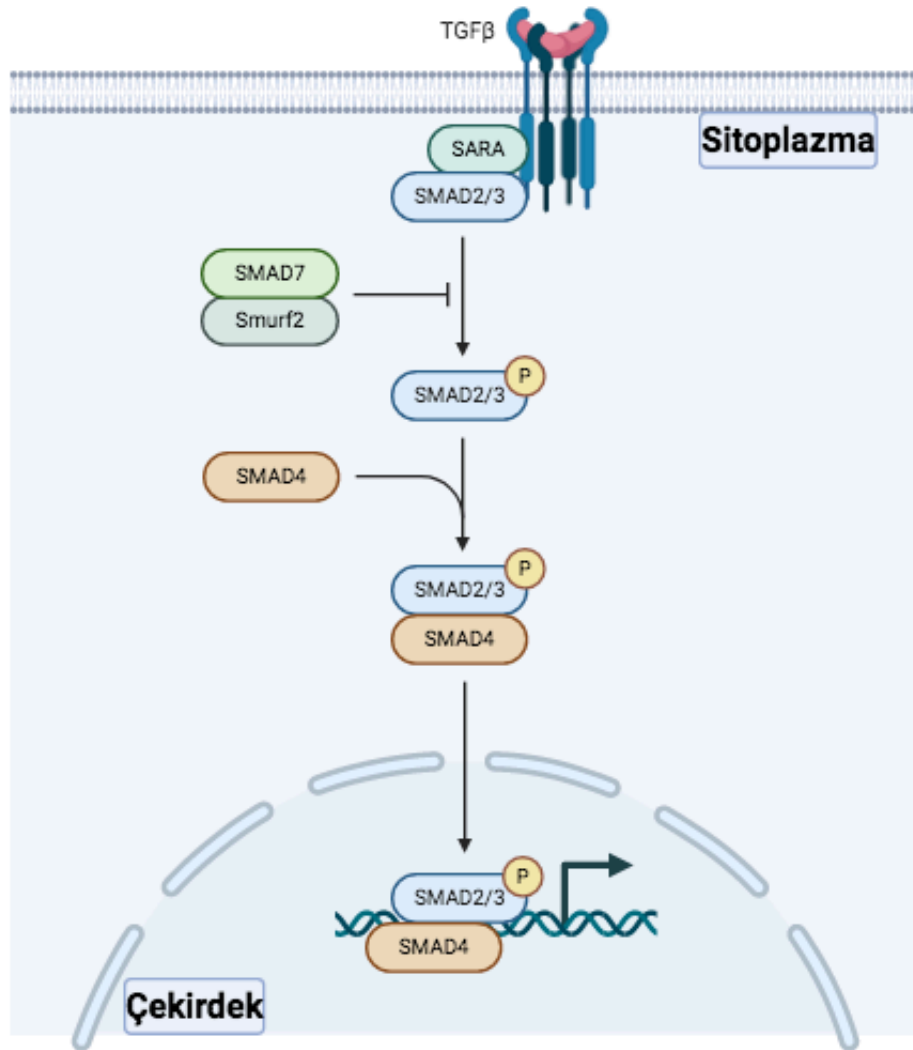
HSP47, endoplazmik retikulumda (ER) yerleşik, kollajen sentezi için gerekli spesifik bir moleküler şaperondur. Serin proteaz inhibitör ailesine (SERPIN) aittir, fakat proteaz inhibitör aktivitesi yoktur (61). Kollajenin işlenmesinde esansiyel rol oynar. Alfa polipeptid zincirinin sentezinden sonra HSP47, üçlü sarmal prokollajen moleküllerinin doğru katlanmasına ve stabilizasyonuna yardım eder. Bu işlem, takip eden sekresyon, kesim ve kollajen fibril formasyonu için oldukça önemlidir. HSP47'nin kollajen maturasyonundaki gerekliliği hem *in vivo* hem *in vitro* olarak ispatlanmıştır (27).

Lizil oksidaz (LOX), bakır-bağımlı bir amin oksidazdır. Kollajen ve elastin kovalent çapraz bağlanmalarını lizin ve hidroksilizin kalıntılarının aminoadipik semi aldehitlere oksidatif deaminasyonunu katalizleyerek başlatır. Bu oldukça reaktif semialdehitler, ekstraselüler matriks stabilitesini sağlamak amacıyla intramoleküler ve intermoleküler kovalent çapraz bağların oluşması için kendiliğinden kondense olurlar (62). LOX aktivitesi, iskelet, pulmoner ve kardiyovasküler sistemlerin bağ dokularının gerilme ve elastik özelliklerinin korunması için gereklidir. LOX preproLOX olarak sentezlenir ve ekstraselüler çevreye salınır. LOX aktivitesinin anormal şekilde artması çoğunlukla fibrotik hastalıklarla ilişkili çözünmez kollajen liflerinin birikimi ile sonuçlanır (27,63,64).

2.5.2. TGF- β /Smad Sinyal Yolağı

Transforme edici büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1), böbrek (65,66), akciğer (67), karaciğer (68,69), deri (70–73) ve kalp (74,75) gibi farklı organlardaki pek çok fibrotik hastalıkta rol oynayan multifonksiyonel, profibrotik bir moleküldür. Büyüme, farklılaşma, ekstraselüler matriks sentezi ve hücre migrasyonu gibi biyolojik süreçlerde yer almanın yanında yara iyileşmesi gibi diğer fizyolojik süreçlerde de etkindir (76).

TGF- β 1, ESM proteinlerinin sekresyonu, sentezi ve transkripsiyonunu artıran yönde etki gösterirken, ESM degradasyonunu iki ana mekanizma yoluyla azaltır. İlk mekanizmada TGF- β 1, ESM degradasyonundan sorumlu matriks metalloproteinazları (MMP'ler) inhibe eder ya da ikinci mekanizmayı kullanarak metalloproteinazların dokusal inhibitörlerini (TIMP'ler) uyarır (77). TGF- β 1'in, organ fibrozisinde ESM üretiminin ana kaynağı olarak gözlenen fibroblastlar üzerinde de önemli etkileri vardır (78).



Şekil 9. TGF- β /Smad Sinyal Yolağı (BioRender ile tasarlanmıştır. <https://app.biorender.com/>)

Fibroblastlarda TGF- β sinyali, aktif TGF- β 'nın TGF- β reseptör II'ye bağlanmasıyla başlar. TGF- β isoformunun bağlanması ardından TGF- β reseptör I ile bir serin/treonin kinaz kompleksi oluşur. Bu kompleksin oluşumu intraselüler Smad kaskadının aktivasyonunu sağlar. Reseptör ilişkili Smad'lerden Smad 2 ve 3'ün fosforilasyonundan sonra bunlar sitoplazmaya salınırlar ve Smad 4 ile heterodimerik kompleks oluştururlar. Aktive olmuş bu kompleks hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol edeceği yere, yani çekirdeğe geçer. Diğer iki Smad molekülü: Smad 6 ve Smad 7, Smad reseptörlerinin aktivasyonunu inhibe ederler, dolayısıyla TGF- β yanıtının negatif olarak düzenlenmesini sağlarlar (76,77,79).

Son yıllarda yapılan çalışmalar TGF- β 'nın fibroproliferatif skar oluşumunda tam bir rolü olduğunu göstermiştir. Keloidal dokuda TGF- β overeksprese olur ve normal otokrin sinyal mekanizmaları ile düzenlenmesi yetersizdir (80). Aynı zamanda, keloid fibroblastlar yüksek oranda büyüme faktörü reseptörüne sahiptirler ve TGF- β gibi büyüme faktörlerine daha çok cevap verirler (81).

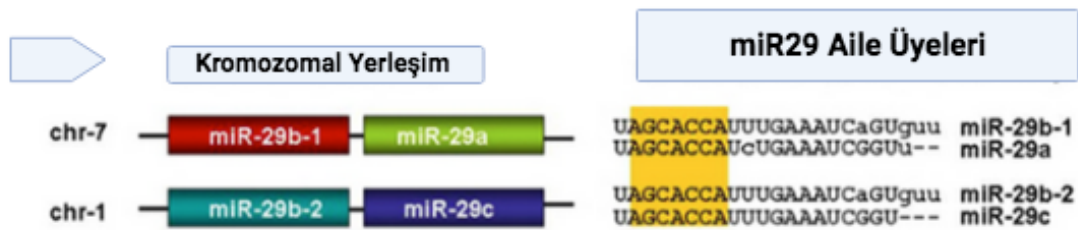
Kollajen sentezini kontrol altına almak ve TGF- β /Smad yolağını düzenlemek deri fibrozu nedeniyle oluşan patolojik durumların tedavisi için anahtar bir yol olarak görülmektedir. Bu bağlamda literatür incelendiğinde ESM komponentlerinin pek çoğunu hedefleyen miR29 ailesi ön plana çıkmaktadır. Kalp, böbrek, karaciğer, deri gibi organlardaki fibrotik süreçlerde etkili olduklarına dair çalışmalar bulunmaktadır (27,82–84).

2.6. mikroRNA'lar ve mikroRNA29 Ailesi

Son yıllardaki çalışmalar transkripsiyon sonrası ve translasyon düzeyinde düzenleme mekanizmasının araçları olan ve mikroRNA (miRNA) denilen küçük RNA moleküllerinin varlığını ortaya koymuştur (85,86). Olgun biçimleri yaklaşık 22 nükleotidden oluşan bu moleküller, primer miRNA (pri-mikroRNA) denilen miRNA gen transkriptlerinden enzimatik yıkımla ortaya çıkan öncü miRNA moleküllerinden (prekürsör miRNA, pre-miRNA) türemektedir. Pri-miRNA'dan pre-miRNA oluşması hücre çekirdeğinde enzimatik olarak gerçekleşmekte ve bu süreçte Drosha, Pasha ve DGCR8 isimli enzimler görev almaktadır. Çekirdekten sitoplazmaya exportin-5

molekölüyle taşınan pre-miRNA'lar burada Dicer enzimiyle olgun miRNA'lara dönüşmektedir (87,88). miRNA'lar hücre sitoplazmasında hedef mRNA'larında belli tanıma bölgelerine bağlanarak mRNA yıkımı ya da translasyonun başlaması ve ilerlemesini baskılama yoluyla protein ekspresyonunu seçici olarak azaltmaktadır (85). Bir miRNA'nın birden çok hedefi olabileceği gibi bir mRNA birden çok miRNA'nın da hedefi olabilmektedir. Bu çeşitlilik gen ve protein ekspresyon düzenlenmesinde hücre işlevlerine yansıyan çok önemli bir basamağı temsil etmektedir. miRNA'lar hücrelerin yaşamsal süreçlerinin pek çoğunda görev almakla birlikte son dönemde bazı miRNA'ların ekspresyon kayıplarının çeşitli fibrotik bozukluklarla ilişkili olduğuna dair kanıtlar ortaya çıkmaktadır (89–91).

miR29 ailesinin ana üç üyesi bulunmaktadır: miR29a, miR29b, miR29c. Ayrıca miR29b'nin iki formu miR29b-1 ve miR29b-2'dir. miR-29a *Lagos-Quintana* ve ark.ları tarafından Hela hücrelerinde bulundu ve bu keşfi takiben miR29b ve miR29c de tanımlandı (92). miR29a ile miR29b-1 ve miR29c ile miR29b-2 arasında iki üç bazlık bir fark vardır. miR29 ailesi sırayla kromozom 7 ve kromozom 1 üzerinde yerleşmiş iki gen tarafından kodlanmış ve transkribe olmuştur (93). miR29 ailesine olan özel ilgi, aile üyelerinin ESM proteinlerinin sentezini inhibe etme yeteneklerinden ileri gelmektedir. Aile üyelerinin anti-fibrotik özelliği bulunmaktadır. Targetscan programı ile yapılan taramada miR29 ailesinin olası hedef molekülleri içinde kollajenler büyük yer tutmaktadır (89–94).



Şekil 10. miR29 Ailesi (Lagos-Quintana ve ark.larının makalesinden uyarlanmıştır.)

Yukarıda belirtildiği gibi miR29 aile üyeleri çeşitli organların fibrotik süreçlerinde etkin rol almaktadırlar: karaciğer (27,94,95), akciğer (21,96), kalp (82,97), böbrek (84,98), sistemik skleroz (83), trabeküler ağ (99) ve kemik yeniden şekillenmesi (100–102).

Aşağıdaki tabloda farklı fibrotik dokularda eksprese olduğu kanıtlanmış miR29 aile üyeleri gösterilmiştir.

Tablo 1. Farklı Dokularda miR29 aile üyelerinin ekspresyon durumları

Fibrotik Doku	miR29 aile üye/üyeleri	Literatür
Fibrotik Karaciğer	miR29b ↓	(90,94,95)
Fibrotik Akciğer	miR29a, miR29b ve miR29c ↓	(21,96)
Fibrotik Kalp	miR29b ↓	(82,97)
Fibrotik Böbrek	miR29b ve miR29c ↓	(84,98)
Sistemik Sklerozlu deri dokusu	miR29a ↓	(83)

Farklı fibrotik süreçlerde miR29 aile üyelerinin azalmış ifadesi gözlenmektedir. miR29 aile üyelerinin bu dokularda normal dokulara kıyasla daha düşük eksprese olmasıyla, bu ailenin hedef proteinleri arasında bulunan kollajenlerin sentezinde artış olduğu gösterilmiştir. miR29'un antifibrotik etkisinin olduğu, anahtar profibrotik moleküllerden biri olan TGF- β tarafından miR29 ekspresyonunun az ifade olması ile de kanıtlanmıştır. miR29 ailesinin bu durumu ESM sentezinden sorumlu yolaklardan TGF- β /Smad yolağını ve bu yolağın down-stream moleküllerini farklı şekillerde etkilemektedir. Sistemik skleroz, kompleks ve sistemik bir hastalık olarak temelde anormal skar oluşumundan farklı seyreder. Fibrotik süreçlerde artışın yanında pek çok farklı organ tutulumu da olmaktadır. Bu nedenle, fibroproliferatif skarlarla ilişkili fibrotik süreçler ayrı değerlendirilmeli ve incelenmelidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma, deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, 2016-2020 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı ve Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Araştırma Laboratuvarında (ARLAB) yürütülmüştür. Patolojik yöntemler için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları ve Elektron Mikroskopi çalışmaları için İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Elektron Mikroskopi Laboratuvarı alt yapısından yararlanılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmada keloid (n=2), hipertrofik skar (n=5) ve sağlıklı deri doku örnekleri (n=20) ile bu örneklerden elde edilen primer kültür hücreleri kullanılmıştır.

3.4. Araştırmanın Materyali

Araştırmada *insan* deri materyali kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişkenler: LOX, HSP-47, TIMP-1, fibril oluşumu, TGF- β , Smad-2, Smad-3, Smad-4, CTGF, Smad-7, col-1, col-3, fibronektin, Ekstraselüler LOX aktivitesi
Bağımsız Değişken: miR-29 ailesi

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Tez Çalışması Sırasında Kullanılan Araç ve Gereçler

Tez çalışmasında kullanılan tüm araç ve gereçler Tablo 2' de verilmektedir.

Tablo 2. Araştırma Sırasında Kullanılan Araç ve Gereçler

Laminer Akışlı Kabinet (Herasafe, safety cabinet, Class 2, Heraus)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı-ARLAB
İnkübatör (Revco)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı-ARLAB
Faz Kontrast inverted mikroskop ve görüntüleme sistemi (Eclipse TS120, Nikon)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı-ARLAB
Otoklav (Hiclave HV-50, Hirayama)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı-ARLAB
Salınımlı santrifüj (Eppendorf)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı-ARLAB
Salınımlı santrifüj (Nüve)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı-ARLAB
Sabit açılı santrifüj (Heraus)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Vorteks (Ika)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Saf su sistemi (Elga)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Elektroforez ve Western blotting sistemi (Bio-Rad)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Mikroplate okuyucu (Synergy HT, Multi-Detection Microplate Reader, BIO-TEK)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB

Işık mikroskobu (Nikon Eclipse C2)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
Işık Mikroskobu Kamerası – Image system	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı
Termal Cyclers (Bio-Rad)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Derin Dondurucu -80°C (Thermo Forma Model 705)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Derin Dondurucu -20°C (Indesit)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Buzdolabı +4°C (Indesit)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Buz makinası (Scotsman AF-100)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Lab Roller (Labnet H5000 rotator)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Karıştırıcı Plak (Labnet)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Ph metre (Hanna)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı-ARLAB
Light Cyclers (Roche 2.0)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB
Rotor Gene (Qiagen)	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı- ARLAB (Geçici süreyle firma tarafından verilmiştir.)
Su Banyosu (Leica HI1210)	Dokuz Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı
Mikrotom (Shandon AS325)	Dokuz Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi

	Patoloji Anabilim Dalı
Parafine Gömme Cihazı (Tissue-Tek AutoTek)	Dokuz Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı
Nanodrop (Thermo)	İzmir Biyotip ve Genom Enstitüsü
Hibridizasyon cihazı (Dako, statspin)	Dokuz Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı
Liyofilizatör (Flexi-Dry MP)	Dokuz Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Elektron Mikroskobu (Zeiss Sigma 500)	İzmir Biyotip ve Genom Enstitüsü

3.6.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Bistüri ucu (Galena, Türkiye)
- DMEM hücre kültür ortamı (Biological Industries, ABD)
- Fetal sığır serumu (FBS) (Biological Industries, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, ABD)
- L-Glutamin (Biological Industries, ABD)
- Fosfatlı tuz tamponu (PBS) (Biological Industries, ABD)
- Tripsin/EDTA (Biological Industries, ABD)
- 10 cm dish (steril petri) (Grenier, Almanya)
- 25 cm²'lik flask (Grenier, Almanya)
- 75 cm²'lik flask (Grenier, Almanya)
- Serolojik pipetler (2;5;10;25 mL) (Isolab, Almanya)
- Steril pipet uçları (10;100;200;1000 µL) (Thermo, ABD)
- Qiazol (Qiagen, Almanya)
- miRNA için RNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya)
- miRNA için cDNA sentez kiti (Qiagen, Almanya)
- miR29 ailesi primerleri (Qiagen, Almanya)
- miRNA için SYBR Green PCR kit (Qiagen, Almanya)

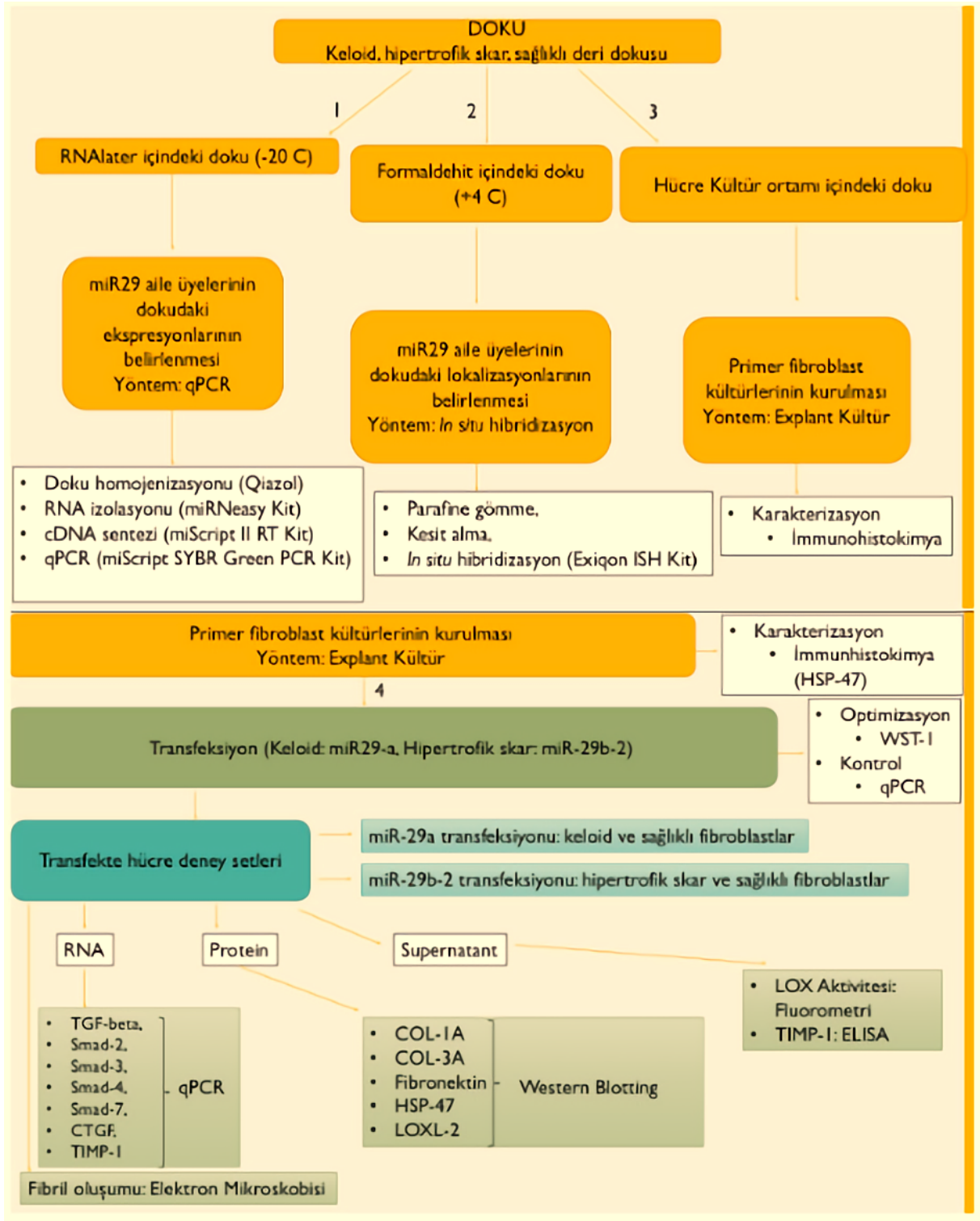
- *İn situ* hibridizasyon kiti (Exiqon/Qiagen, Almanya)
- miRNA LNA problemleri (Exiqon/Qiagen, Almanya)
- miRNA inhibitörleri (Qiagen, Almanya)
- Hiperfect transfeksiyon reaktifi (Qiagen, Almanya)
- WST-1 reaktifi (Roche, İsviçre)
- HSP-47 primer antikor (Santacruz, ABD)
- LOXL2 primer antikor (Santacruz, ABD)
- COL1A primer antikor (Santacruz, ABD)
- COL3A primer antikor (Santacruz, ABD)
- Fibronektin primer antikor (Santacruz, ABD)
- Beta- aktin primer antikor (Santacruz, ABD)
- HRP bağlı sekonder antikor (Santacruz, ABD)
- Protein Ladder (Thermo, ABD)
- RNA izolasyon kiti (BioRad, ABD)
- cDNA sentez kiti (BioRad, ABD)
- SYBR Green PCR master mix (BioRad, ABD)
- 15 ml'lik falkon tüp (IsoLab, Almanya)
- 50 ml'lik falkon tüp (IsoLab, Almanya)
- TIMP-1 ELISA kiti (YLBiont, Çin)
- LOX Aktivite kiti (Abcam, İngiltere)
- Askorbik asit (Sigma, Almanya)
- RNAlater (Qiagen, Almanya)
- Formalin (Sigma, Almanya)

3.6.3. Araştırma Sırasında Kullanılan Yöntemler

Bu çalışma, üç aşamalı olarak tasarlanmıştır. İlk aşamasında toplanan keloid, hipertrofik skar ve sağlıklı deri dokularında miR29 aile üyelerinin varlıkları araştırılmış ve bu aşamadan elde edilen bulgular kullanılarak kollajen maturasyonu ve TGF- β /Smad sinyal yolağına miR29 ailesinin etkisi incelenmiştir. Bu adımlar ulaşılması gereken hedefler doğrultusunda sırasıyla özetlenmiştir.

3.6.3.1. miR29 aile varlığının incelenmesi için dokuların toplanması

Çalışmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalına başvuran ve anabilim dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Cenk Demirdöver tarafından değerlendirilen iki keloid ve beş hipertrofik skar tanısı alan olgulardan elde edilen deri örnekleri; kontrol olarak yine Dokuz Eylül Üniversitesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalına başvuran ve doku çıkarılacak sağlıklı tüm estetik olgulardan elde edilen 20 adet deri örneği dahil edildi (103). Çalışma planlanırken yapılan güç analizi ile örneklem büyüklüğü, seçilen evren açısından nadir hastalıklar söz konusu olduğundan, ortalama farklar dikkate alınarak hesaplandığında $n=2$ çıkmıştır. Buna rağmen deneyin tüm aşamaları göz önünde bulundurulduğunda ve fibroproliferatif skarlar üzerinde yapılmış diğer çalışmalardaki n değerleri dikkate alındığında ($n=1-8$) hastalardan alınacak doku sayısı 5 olarak belirlenmiştir (104–107); ancak keloid deri örneklerinde bu sayıya ulaşmak mümkün olamadı. Tüm gönüllülerden bilgilendirilmiş gönüllü olur formu alındı (EK1). Toplanan dokular ile devamında kurgulanan deney planı Şekil 11.'de gösterilmiştir.



Şekil 11. Teze ilişkin aşamalı deney planı

3.6.3.2. Doku miR29 aile üyeleri ekspresyonlarının Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile belirlenmesi

Yöntemin Prensipleri: PCR, bir DNA zincirinin bilinen iki parçası arasında uzanan özel bir DNA bölümünün enzimatik olarak çoğaltıldığı *in vitro* bir tekniktir (108). Oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boyanın verdiği sinyal izlenir.

Bu yöntemle toplanan keloid, hipertrofik skar ve sağlıklı deri dokularındaki miR29a, miR29b-1, miR29b-2 ve miR29c düzeyleri belirlendi. Bunun için aşağıdaki adımlar izlendi:

- a. Doku homojenizasyonu,
- b. RNA izolasyonu,
- c. RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi,
- d. cDNA sentezi,
- e. SYBR Green PCR Karışımı ile qPCR analizi

a. Doku Homojenizasyonu (109): Toplanan dokuların RNeasy lünesine alınan kısımları bir gece boyunca +4 °C’de inkübe edildikten sonra analiz süresine kadar -20 °C’de saklandı. Homojenizasyon için Qiazol (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Qiazol, fenol/guanidin bazlı bir reaktiftir ve organik ekstraksiyon adımları ile RNA’ya verimli bir şekilde ulaşmayı sağlar.

Uygulama basamakları:

1. Doku örnekleri oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve RNeasy lünesi içinden alınarak 2 mL’lik V tabanlı ependorflara aktarıldı.
2. Üstlerine çelik bilye ve doku miktarına göre on katı olacak şekilde 700-1000 µL arasında qiazol eklendi.
3. Tissue Lyser II (Qiagen, Almanya) cihazında 1 dakika boyunca homojenize edildi.
4. Elde edilen homojenat 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

Bu aşamadan sonra RNA izolasyonuna devam edildi.

b. RNA İzolasyonu (110): Homojenize edilen dokulardan miRNA içeren RNA izolasyonu için miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Burada prensip,

guanidin-izotiyosiyanat lizinin gücü ile silika membran saflaştırılmasının birleştirilmesiyle yüksek kaliteli RNA elde edilmesidir.

Uygulama basamakları:

1. Homojenize edilen doku örnekleri üzerine 0.2 mL kloroform eklenerek hafifçe alt-üst edildi.
2. Ardından oda sıcaklığında faz ayrımı için 3 dakika beklendi.
3. 12000 g'de 15 dakika boyunca +4 °C'de santrifüjlendi.
4. Bu aşamadan sonra üst faz kolona eklendi ve 12000 g'de santrifüj işlemi yapıldı.
5. 0.7 mL %70 etanol eklenerek 10000 g'de 30 s santrifüjlendi.
6. Toplam iki farklı yıkama işlemi ardından (0.7 mL RW1+10000 g 30 s, 0.5 mL RPE + 10000 g 2 dakika) kolon yeni bir tüpe aktarıldı ve kalan sıvıların uzaklaştırılması için 1 dakika 10000 g'de santrifüje tabi tutuldu.
7. Kolon yeni bir kapaklı toplama tüpüne aktararak 40 µL RNAz içermeyen su eklendi ve 1 dakika boyunca 10000g'de santrifüjlenerek RNA toplandı.
8. Elde edilen RNA kullanılabildiği kadar – 80°C'de saklandı.

c. RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi (111): Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflık durumları spektrofotometrik olarak Nanodrop cihazı (Thermo, Almanya) kullanılarak belirlendi. Bir nükleik asit olan RNA 260 nm dalga boyunda maksimum absorbanza sahiptir. 280 nm'de ise proteinler maksimum absorbanş gösterir. 230 nm'de yapılan ölçüm ile kontaminasyon belirlenir. Saflık değeri (OD_{260}/OD_{280}) 1.8 ila 2 arasında olmalıdır.

Uygulama basamakları:

1. Cihazda RNA ölçümü seçeneği seçildikten sonra kör okuması için 2 µL RNAz içermeyen su kullanılarak sıfırlama yapıldı.
2. Ardından her bir RNA örneğinden de 2 µL eklenerek sırayla ölçüm yapıldı.
3. RNA konsantrasyonları ng/µL cinsinden elde edildi.

Bu aşamadan sonra konsantrasyonu bilinen RNA örnekleri kullanılarak cDNA sentezi yapıldı.

d. cDNA sentezi (112): Konsantrasyonu bilinen RNA'lardan cDNA sentezi için miScript II RT Kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Buradaki amaç, 1-100 ng toplam RNA'dan tek iplikli cDNA'sının ön amplifikasyonunun yapılmasıdır.

Uygulama basamakları:

1. Kalıp RNA örnekleri buz üstünde çözündürüldü. Aynı zamanda kit içeriğinde yer alan 10x miScript Nucleics Mix ve 5x miScript HiSpec Buffer da oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı.
2. İlk olarak revers-transkripsiyon master karışımı buz üzerinde hazırlandı. İçeriği Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Revers-Trankripsiyon Reaksiyon İçeriği

İçerik	Hacim/Reaksiyon
5x miScript HiSpec Tampon	4 µL
10x miScript Nükleik Asit Karışımı	2 µL
RNAz içermeyen su	Değişken
miScript Revers-Transkriptaz Karışımı	2 µL
Kalıp RNA (en son eklenir)	Değişken (20 ng'a karşılık gelen hacim)
Toplam Hacim	20 µL

3. Karışıma kalıp RNA en son eklenerek karıştırıldı. Bu aşamalarda işlemler hep buz üzerinde devam ettirildi.

4. Thermal Cycler (BioRad, ABD) cihazında 60 dakika 37 °C’de ve 5 dakika 95 °C’de cDNA sentezi gerçekleştirildi.
5. Örnekler kullanılabileceği kadar – 20°C’de saklandı.

Bu aşamadan sonra cDNA örnekleri kullanılarak miR29 aile üyelerinin ekspresyonlarının belirlenmesi için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu işlemine geçilmiştir.

e. SYBR Green PCR Karışımı ile qPCR analizi (113): Tek iplik cDNA sentezi ardından, elde edilen bu cDNA’ların kalıp olarak ve ilgili genlere spesifik primer karışımlarının kullanılması ile RT-PCR deney setleri kuruldu. Bunun için miScript Primer Assays (Qiagen, Almanya) ve miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Kontrol geni olarak U6 seçildi.

Uygulama basamakları:

1. İlk olarak reaksiyon karışımı Tablo 4’teki gibi hazırlanmıştır.

Tablo 4. miRNA belirlenmesi için Reaksiyon Karışımı İçeriği

İçerik	Hacim/Reaksiyon
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µL
10x miScript Universal Primer	2 µL
10x miScript Primer Assay	2 µL
RNAz içermeyen su	Değişken
Kalıp cDNA (en son eklenir)	Değişken (20 ng için 0.4 µL)
Toplam Hacim	20 µL

2. Hazırlanan reaksiyon karışımı kapiller tüplere paylaştırılarak her birine cDNA ilave edildi.
3. Roche 2.0 Real Time PCR (Roche, İsviçre) cihazına tüpler yerleştirilip reaksiyon koşulları sisteme tanımlandı.
4. Bu aşamada cDNA miktarı, sıcaklık ve döngü sayısı için ayrı ayrı optimizasyonlar yapıldı.
5. Reaksiyon koşulları Tablo 5'teki gibidir.

Tablo 5. miR29 ailesi ekspresyonlarının belirlenmesi için qPCR reaksiyon koşulları

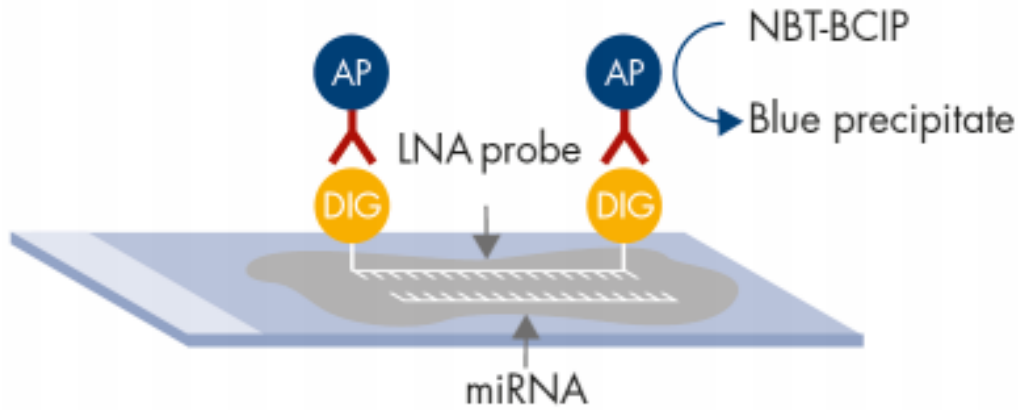
Aşama	Zaman	Sıcaklık	Döngü Sayısı
Başlangıç Aktivasyon basamağı	15 dakika	95 °C	
Denatürasyon	15 s	94 °C	45 döngü
Uzama	30 s	55 °C	
Birleşme	30 s	70 °C	

6. Elde edilen bulgular $\Delta\Delta C_T$ yöntemine göre analiz edildi ve kontrol olarak kullanılan U6'ya oranlanarak değerlendirildi. Bulgular, kat değişim olarak hesaplandı.

3.6.3.3. Doku miR29 aile üyelerinin lokalizasyonlarının *in situ* hibridizasyon (ISH) yöntemi ile belirlenmesi

Yöntemin Prensibi: *In situ* Hibridizasyon (ISH), belirli bir nükleik asit dizisinin doku veya hücre içerisinde bulunduğu yeri tespit etmeye yönelik bir tekniktir. Yöntem, hibridizasyon sıcaklığında önemli bir artışa ve böylece miRNA tespiti için gerekli kısa problemler için artırılmış şiddete izin veren, bi-siklik RNA analogları olan kilitli nükleik asitlerin (LNA) kullanımına dayanır (114,115). LNA'lar, DNA oligonükleotitlerinin hibridizasyon özelliklerini önemli ölçüde geliştiren bi-siklik yüksek afiniteli nükleotit analoglarıdır.

Bu yöntemle, toplanan ve parafine gömülen keloid, hipertrofik skar ve sağlıklı deri dokularındaki miR29a, miR29b-1, miR29b-2 ve mir29c'nin doku lokalizasyonları miRCURY LNA microRNA ISH Optimizasyon Kiti kullanılarak belirlendi. Temel olarak bu kit kullanılarak mikroRNA'ların proteinaz K ile maskelenmesi böylece double-DIG-işaretli LNA problemlerinin mikroRNA sekansına hibridize olması sağlandı. Digoksininler, Alkalen Fosfataz (AP) enzimi ile konjuge olmuş spesifik bir anti-DIG antikoru tarafından tanınırlar. 4-nitro-blue-tetrazolium (NBT) ile konjuge edilmiş çözünebilir AP substratı 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP), AP tarafından su ve alkolde çözünmeyen koyu mavi NBT-BCIP çökeltisine dönüştürülür.



Şekil 12. *In situ* hibridizasyon şeması

Bunun için aşağıdaki adımlar izlendi:

- Doku parafine gömme,
- Kesit alma,
- Tüm reaktif ve kit içeriğinin hazırlanması,
- Optimizasyon işlemleri (proteinaz K konsantrasyonu, inkübasyon süresi, U6 prob konsantrasyonu, hibridizasyon sıcaklığı, hibridizasyon süresi, substrat konsantrasyonu, her bir prob konsantrasyonu)
- In situ* Hibridizasyon

a. Doku Parafine Gömme: Bu işlemin temel amacı, formalin solüsyonu içinden alınan dokuların herhangi bir şekil bozukluğuna yol açılmaksızın ince kesitler halinde

çalışılabilir formlarının elde edilmesidir.

Uygulama basamakları:

1. Toplanan ve formalin içinde bekletilen dokular kasetlere alındı.
2. Kasetler otomatik döküm merkezine yerleştirilerek sıcak parafinle gömme işlemi tamamlandı.

b. Kesit alma: Parafine gömülen dokular soğutulup kenarları temizlendikten sonra mikrotom yardımıyla 5 mikronluk kesitler alındı.

Uygulama basamakları:

1. Su banyosu 50 °C 'ye getirildi.
2. Mikrotom ayarları yapılarak uygun bıçak takıldı.
3. Parafine gömülü dokuya ön traşlama işlemi yapıldı.
4. Traşlama ardından 5 mikron kalınlığında kesitler alındı.
5. Kesitler alındıkça su banyosunda açılarak lamlara yapışmaları sağlandı.

c. Tüm reaktif ve kit içeriklerinin hazırlanması: Aşağıdaki tablolarda yer alan tüm reaktifler ayrı ayrı hazırlanarak farklı zamanlarda kullanılabilecek şekilde tüplere pay edildi. Üretici firmanın tavsiyesine göre kullanılan reaktifler ve hazırlanan çözeltiler +4°C ya da -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 6. *In situ* Hibridizasyon Kit İçeriği

miR29 ailesine özgü miRNA LNA problar (double DIG işaretli) (25 µM)
Scrambled LNA prob (double DIG işaretli, negatif kontrol) (25 µM)
U6 LNA prob (5' DIG işaretli, pozitif kontrol) (0.5 µM)
Hibridizasyon Tamponu (2X)
Proteinaz K (liyofilize)

Stok Proteinaz K'yı çözmek için: 600 µL 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) kullanıldı.

Hazırlanışı: Stok 1M Tris tampon'undan (pH 8.0) yola çıkılarak önce 10 mL (100 mM) ara stok hazırlandı (1ml stoktan alınıp 9 ml dH₂O ile tamamlandı).

Ara stoktan aynı şekilde 10 mM çözelti alınıp pH ayarı yapıldı (1 mL ara stok üzeri 9 ml' ye tamamlandı).

ISH Protokolü için gerekli olan reaktifler

Tablo 7. ISH yönteminde kullanılan çözeltiler

Antikor çözeltisi	bloklama	%0,1 Tween, %2 Sheep serum, %1 BSA içeren PBS	15 mL PBS-T içine 300 µL sheep serum eklendi ve 5 ml'si dilüsyon çözelti için ayrıldı. Kalan 10 mL içine %30'luk 330 µL BSA eklenerek hazırlandı.
Antikor dilue edici çözelti		%0,05 Tween, %1 sheep serum, %1 BSA içeren PBS	Ayrılan 5 mL bloklama çözeltisi içine 5 mL PBS eklendi. Böylece tween oranı %0,05 ve sheep serum %1 oldu. Son olarak %30'luk BSA'dan 330 µL eklendi.
Sheep-anti-DIG-AP		Roche	Antikor dilüsyon çözeltisi kullanılarak 1:800 oranında dilüe edildi (1:500-1:2000).
NBT/BCIP Tabletler		Roche	Kullanmadan hemen önce taze hazırlandı. 10 mL milli-Q su içinde

		çözünerek içine 20 µL levamisol stok çözeltisi eklendi. Işıktan korunarak oda sıcaklığında saklandı.
Levamisol	AP aktivitesini bloklamak için kullanıldı. Stok çözelti 100 mM hazırlandı.	240,8 mg levamisol tartılıp RNaz içermeyen su ile 10 ml'ye tamamlandı.

Tablo 8. ISH deney protokolü için hazırlanacak ve otoklavlanacak tampon ve stok çözeltiler

Proteinaz-K Tamponu	900 mL RNaz içermeyen suya 5 mL 1M Tris-HCl (pH 7.4); 2 mL 0,5 M EDTA; 0,2 mL 5 M NaCl eklendi ve 1000 mL'ye tamamlandı. Otoklavlanarak kullanıldı.
20x Sodyum sitrat tamponu (SSC) pH 7	800 mL RNaz içermeyen su içinde 175,3 g NaCl (3M); 88,2 g trisodyum sitrat (300 mM); pH 7'ye ayarlandı, 1 L'ye tamamlandı.
SSC Çözeltileri	5X SSC (1L=250 mL 20X SSC+750 mL RNaz içermeyen su) 1X SSC (1L= 50 mL 20X SSC +950 mL RNaz içermeyen su) 0.2X SSC (1L= 10 mL 20x SSC +990 mL RNaz içermeyen su)
PBS-T (%0,1), pH 7,4	1 mL Tween-20 1L PBS'e eklendi, otoklavlandı.
KTBT (AP durdurma çözeltisi)	900 mL RNaz içermeyen su içine 7,9 g Tris-HCl (50mM); 8.7 g NaCl (150mM); 0,75 g KCl (10mM) eklendi. 1000 mL'ye tamamlandı. Otoklavlandı.

Tablo 9. ISH için deney günü-taze hazırlananan çözeltiler

Proteinaz-K-reaktifi	15 µg/mL son konsantrasyon için: 7,5 µL proteinaz K stok çözeltisi 10 mL proteinaz K tamponu içine eklendi.			
Hibridizasyon karışımı (microRNA ISH tamponu ve LNA deteksiyon problemleri)	2x microRNA ISH tamponu RNaz içermeyen su ile 1:1 dilüe edildi. Her bir prob için uygun miktar 2 mL non-stick RNaz içermeyen tüplere konuldu. Problar 90 °C'de 4 dakika boyunca denatüre edildi. Tüpler santrifüje konularak kısa bir süre santrifüjlendi. Her bir tüpün üzerine 2 mL microRNA ISH tamponu eklendi.			
Prob	Son prob konsantrasyonu	Prob hacmi	Seyreltme faktörü	1x microRNA ISH tampon hacmi
LNA U6 snRNA (0.5 µM)	1 nM	4 µL	1:500	2 mL
LNA Scramble miR prob (25 µM)	40 nM	3.2 µL	1:625	2 mL

Tablo 10. ISH yönteminde Kullanılan Prob Dizileri

Prob	Dizi	T_m (°C)
U6 snRNA kontrol	5'-DIG/CACGAATTTGCGTGTCATCCTT/DIG-3'	84
LNA scrambled microRNA kontrol	5'-DIG/GTGTAAACACGTCTATACGCCCA/DIG-3'	87

d. Optimizasyon işlemleri:

Tüm protokol boyunca izlenen optimizasyon basamakları aşağıdaki gibidir:

1. Hibridizasyon sıcaklığı ve Proteinaz-K uygulamasının ayarlanmasıyla LNA U6 prob ile protokol parametrelerinin optimize edilmesi

Uygun Proteinaz-K uygulama aralığı

Proteinaz-K uygulama derecesi fiksasyona ve dokunun kaynağına bağlıdır. Proteinaz-K uygulama basamağı için farklı konsantrasyon ve süreler denendi.

Optimal proteinaz-K koşullarını ayarlamak için, LNA U6 snRNA probu ile testlere başlandı. 1.0-4.0 nM konsantrasyonlar kullanılarak ISH protokolü yapıldı.

Konsantrasyon ayarlaması

Tablo 11. Proteinaz K konsantrasyon optimizasyonu

İnsan FFPE	Fiksasyon	Sıcaklık	Proteinaz-K	Süre
	Rutin formalin	37°C	5-50 µg/mL	10 dk

Süre ayarlaması

Tablo 12. Proteinaz K inkübasyon süresi optimizasyonu

İnsan FFPE	Fiksasyon	Sıcaklık	Proteinaz-K	Süre
	Rutin formalin	37°C	15 µg/mL	5-30 dk (her 5 dakika)

Önerilen Optimal değerler: Kite önerilen 15 µg/mL konsantrasyon ve 10 dakika iken, bu çalışmada 30 µg/mL ve 30 dakika olarak Proteinaz K uygulamasında en verimli sonuç alındı.

2. Optimize protokol parametrelerini kullanarak double-DIG LNA microRNA kontrol problemleri ile kontrol çalışması yapılması

ISH duyarlılık düzeyinin belirlenmesi

ISH Protokolünün performansının duyarlılığının belirlenmesi için, LNA U6 snRNA probunun farklı dilüsyonları (1.0-4.0 nM) hazırlandı.

Hibridizasyon sıcaklığı, süresi ve substrat konsantrasyonu için ayarlamalar da probun yukarıda verilen farklı konsantrasyonları üzerinden yapıldı.

3. Hibridizasyon sıcaklığının belirlenmesi

Bir ISH probunun optimal performansı sinyal-gürültü oranıyla ilişkilidir. LNA içeren problemler, eğer hibridizasyon sıcaklığı çok düşükse yüksek oranda benzer sekanslara hibritlenme potansiyeline sahiptirler.

Hibridizasyon sıcaklığının belirlenmesi için 50-60 °C aralığında her seferinde 2 °C artırarak denemeler yapıldı.

4. Hibridizasyon süresinin optimizasyonu

Kitin önerdiği 1 saatlik süre dışında 2-4 saat ve tüm gece boyunca hibridizasyon da çalışıldı.

5. Substrat konsantrasyonunun ayarlanması

Kitin önerdiği dışında substrat konsantrasyonu 2 katına çıkarılarak da çalışıldı.

f. ***In situ* Hibridizasyon:** Tüm optimizasyon adımları ve deney setleri için aşağıdaki ISH uygulama adımları gerçekleştirildi. İşleme başlamadan önce slaytlar 10 dakika boyunca 70 °C sıcaklıkta etüvde bekletildi.

1. Basamak. Deparafinizasyon: Oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Tablo 13. *In situ* Hibridizasyonda deparafinizasyon adımları

Basamak	Çözelti	Süre
1	Ksilen	5 dakika
2	Ksilen	5 dakika
3	Ksilen	5 dakika
4	%99.9 Etanol	10 kez daldırma
5	%99.9 Etanol	10 kez daldırma
6	%99.9 Etanol	5 dakika
7	%96 Etanol	10 kez daldırma
8	%96 Etanol	5 dakika
9	%70 Etanol	10 kez daldırma
10	%70 Etanol	5 dakika
11	PBS	2-5 dakika

2. Basamak: Proteinaz K ile 30 dakika 37°C’de inkübasyon

Proteinaz K çalışmanın hemen öncesinde hazırlandı. 30 µg/mL konsantrasyonda Proteinaz K doku kesitini tamamen kaplayacak şekilde (yaklaşık olarak 300 µL/slayt) uygulandı. 30 dakika boyunca 37°C’de Dako Hibridizer’de inkübe edildi.

3. Basamak: PBS ile yıkama

Slaytlar iki kez PBS ile yıkandı.

4. Basamak: Hibridizasyon

Slaytlar düz bir yüzeye kondu ve 50 µL hibridizasyon karışımı uygulandı. Belirlenen prob konsantrasyonlarında uygun hazırlıklar yapıldı. Hava kabarcıkları oluşmasından kaçınarak cover slip ile slaytlar kapatıldı. Hibridizer’e konularak tüm gece boyunca sürecektir hibridizasyon programı başlatıldı.

5. Basamak: Coverslip'lerin uzaklaştırılması

5X SSC hazırlandı. Coverslipler dikkatlice ayrılarak bu tamponun içine kondu. Coverslip'lerin ayrılmadığı durumda doğrudan tampon içine kondu ve kendiliğinden ayırım sağlandı.

6. Basamak: Slaytların SSC tamponu ile yıkanması

Slaytlar şalelerde aşağıdaki tablodaki sırayla yıkandı. Yeterli yıkama şiddetinin sağlanması için yıkamalar hibridizasyon sıcaklığına ayarlanmış bir su banyosuna yerleştirilmiş şalelerde gerçekleştirildi.

Tablo 14. *In situ* Hibridizasyonda SSC Tamponu ile yıkama adımları

Basamak	Tampon	Süre (dk)	Sıcaklık
1	5X SSC	5	Hyb sıcaklığı
2	1X SSC	5	Hyb sıcaklığı
3	1X SSC	5	Hyb sıcaklığı
4	0.2X SSC	5	Hyb sıcaklığı
5	0.2X SSC	5	Hyb sıcaklığı
6	0.2X SSC	5	Oda sıcaklığı

7. Basamak: Hidrofobik bariyer uygulaması

Slaytlar PBS içeren şalelere aktarıldı. Doku kesitlerinin çevresine Dako-pen ile hidrofobik bariyer uygulandı. Bu ve sonraki immünohistokimya adımları boyunca doku kesitlerinin kurumasına izin verilmedi.

Önemli Not: 8-15. Basamaklar nemli ortamda gerçekleştirildi.

8. Basamak: Bloklama

Slaytlar nemli ortamda bloklama solüsyonu ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

9. Basamak: Anti-DIG reaktifinin uygulanması

Bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak anti-DIG reaktifi (sheep anti-DIG-AP 1:800) oda sıcaklığında 60 dakika boyunca uygulandı.

10. Basamak: Yıkama

Slaytlar PBS-T ile 3 kez 3 dakika boyunca yıkandı.

11. Basamak: AP Substrat uygulaması

Taze hazırlanmış AP substrat kesitlere uygulandı ve ışıktan korunarak 30°C'de 2 saat nemli ortamda inkübe edildi.

12. Basamak: KTBT Uygulaması

Slaytlar KTBT tamponu ile 2x5 dakika boyunca reaksiyonu durdurmak için inkübe edildi.

13. Basamak: Yıkama

Su ile 2x1 dakika boyunca yıkama yapıldı.

14. Basamak: *Nuclear Fast Red* ile boyama

Uygulamadan hemen önce *nuclear fast red* boyası filtrelendi ve çözünmemiş boya parçacıkları uzaklaştırıldı. Dokunun boyutuna göre 200-300 µL *nuclear fast red* 1 dakika boyunca uygulandı.

15. Basamak: Musluk suyu ile durulama

Slaytlar nemli ortamdan çıkarılarak musluk suyu içeren şaleler içine alındı. 10 dakika boyunca dikkatli bir şekilde akan su altında durulandı.

16. Basamak: Dehidrasyon

Slaytlar aşğıdaki tabloya göre etanol çözeltileri ile dehidrate edildi. Temiz kâğıt havlulara slaytlar yerleştirildi.

Tablo 15. *In situ* Hibridizasyonda Dehidrasyon Basamakları

Basamak	Çözelti	Süre
1	%70 etanol	10 kez daldırma
2	%70 etanol	1 dakika
3	%96 etanol	10 kez daldırma
4	%96 etanol	1 dakika
5	%99.9 etanol	10 kez daldırma
6	%99.9 etanol	1 dakika

17. Basamak: Lam üzerine slaytların yerleştirilmesi

Slaytlar bir-iki damla su bazlı *mounting medium* ile lam üzerine yerleştirildi. Arada hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi.

18. Basamak: Mikroskopi

Gece boyunca beklendi ve ertesi gün slaytlar ışık mikroskobu ile görüntüldü.

Elde edilen görüntüler beklenen düzeyde olmadığı için kit içeriğinden ayrı olarak laboratuvarında kendi hazırladığımız çözeltilerle ve modifiye edilmiş işlem basamakları ile tekrarlandı.

1. Basamak. Deparafinizasyon: Oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Tablo 16. Modifiye edilmiş *In situ* Hibridizasyon deparafinizasyon adımları

Basamak	Çözelti	Süre
1	Ksilen	2x3 dakika
2	Ksilen: %99.9 Etanol (1:1)	3 dakika
3	%99.9 Etanol	2x3 dakika
4	%95 Etanol	3 dakika
5	%70 Etanol	3 dakika
6	%50 Etanol	3 dakika
7	Akan musluk altında	10 kez daldırma
8	PBS	5 dakika

2. Basamak: Proteinaz K ile 30 dakika 37°C'de inkübasyon

Proteinaz K çalışmanın hemen öncesinde hazırlandı. 30 µg/mL konsantrasyonda Proteinaz K doku kesitini tamamen kaplayacak şekilde (yaklaşık olarak 300 µL/slayt) uygulandı. 30 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi.

3. Basamak: %20 Asetik Asit ile Çalkalama

Proteinaz K ile inkübasyon sonrası slaytlar soğuk asetik asit içinde 20 saniye boyunca çalkalandı.

4. Basamak: PBS ile yıkama

Slaytlar üç kez üç dakika boyunca PBS ile yıkandı.

5. Basamak: Pre-Hibridizasyon

Slaytlar düz bir yüzeye kondu ve 200-300 µL hibridizasyon tamponu uygulandı. Oda sıcaklığında 4 saat boyunca bekletildi.

6. Basamak: Hibridizasyon

Proplar PCR tüplerinde 95°C'de 4 dakika denatüre edilip buz üzerine alındı. 50 µL hibridizasyon karışımı hazırlanarak tüm gece boyunca 60°C'de hibridizasyon cihazında bekletildi.

7. Basamak: Yıkama işlemleri

5X SSC tamponu hazırlandı. 60°C'de su banyosuna kondu ve slaytlar içine eklenerek coverslip'ler dikkatlice uzaklaştırıldı. 0.2X SSC tamponu hazırlandı ve 60°C'de su banyosuna konuldu. 1 saat boyunca slaytlar içinde bekletildi.

B1 Çözeltisi: 0.1 M Tris (pH 7.5) /0.15 M NaCl hazırlandı (100 mL 1M Tris ve 30 mL 5M NaCl alınarak pH ayarlandı ve 1 L'ye tamamlandı). Slaytlar oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bu çözeltide bekletildi.

8. Basamak: Bloklama

Slaytlar nemli ortamda bloklama çözeltisi ile oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi. Slayt sayısına göre bloklama çözeltisi hazırlandı.

Bloklama çözeltisi için: 2 mL FCS (inaktive edilmiş) +18 mL B1 Çözeltisi + %10 Tween-20 karıştırıldı.

9. Basamak: Anti-DIG reaktifinin uygulanması

Bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak anti-DIG reaktifi (sheep anti-DIG-AP 1:800) +4 °C'de tüm gece boyunca uygulandı.

10. Basamak: Slaytların B1 çözeltisi ile yıkanması

Slaytlar 3 x 5 dakika boyunca B1 çözeltisi ile yıkandı.

11. Basamak: Reaksiyon Oluşumu

B3 çözeltisi hazırlandı ve slaytlar 10 dakika boyunca bu çözelti ile inkübe edildi.

B3 Çözeltisi için: 200 mL 0.5 M Tris; 200 mL 0.5 M NaCl; 50 mL 1M MgCl₂ ayrı ayrı hazırlanıp karıştırıldıktan sonra 1L'ye tamamlanarak 0.45 µm'lik filtreden geçirildi.

NBT/BCIP substrat tableti 10 mL B3 Çözeltisi içinde çözüldü içerisine 200 µL 100 mM levamisol ve %10 Tween-20 ilave edildi.

Hazırlanan bu karışım slaytlara uygulandı ve slaytlar karanlık ve nemli bir ortama kaldırıldı.

Bu aşamadan sonra renk oluşumu gözlenene kadar 4 gün boyunca slaytlar kontrol edildi.

12. Basamak: Yıkama

Mavi renk oluşumu gözlenince reaksiyon durduruldu ve 3 x 10 dakika boyunca PBS-T ile yıkama yapıldı.

13. Basamak: *Nuclear Fast Red* ile boyama

Uygulamadan hemen önce *nuclear fast red* boyası filtrelendi ve çözünmemiş boya parçacıkları uzaklaştırıldı. Dokunun boyutuna göre 200-300 µL *nuclear fast red* 1 dakika boyunca uygulandı.

14. Basamak: Lam üzerine slaytların yerleştirilmesi

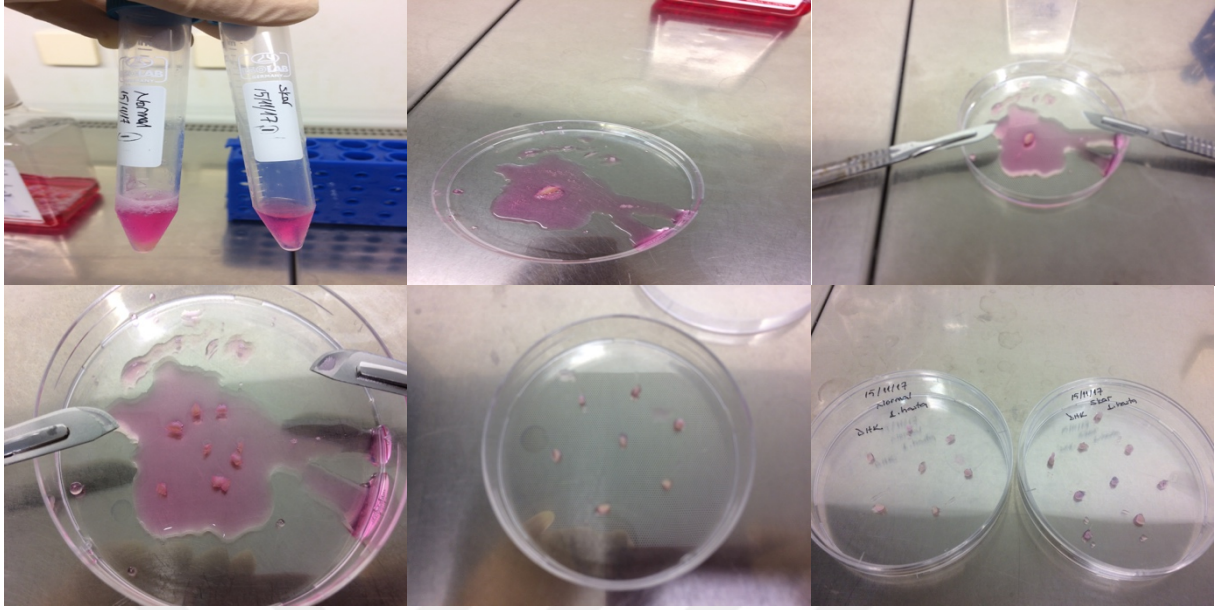
Slaytlar bir-iki damla su bazlı *mounting medium* ile lam üzerine yerleştirildi. Arada hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi.

15. Basamak: Mikroskopi

Slaytlar ışık mikroskobu altında incelendi.

3.6.3.4. Toplanan Dokulardan Primer Fibroblast Hücre Kültürlerinin Kurulması

Toplanan keloid, hipertrofik skar ve sağlıklı deri doku örneklerinden primer fibroblast hücre kültürleri kuruldu (116). Bu işlem için uygulanan temel basamaklar Şekil 13'de verilmiştir.



Şekil 13. Dokunun Ameliyathaneden Laboratuvara Yolculuğu

Deri biyopsisinden primer fibroblast kültürü

1. Ameliyathaneden alınan doku örneği 10 mL ortam ile doldurulmuş 15 mL'lik santrifüj tüpüne konularak hızlıca laboratuvar ortamına getirildi.
2. Doku PBS ile yıkandı.
3. Bistüri ile 1mm²'den küçük olmasına gayret edilerek parçalara ayrıldı.
4. Parçalanmış doku boş steril petri kabına yerleştirildi.
5. Yerleştirilmiş doku parçaları aralarında 0,5-1cm mesafe olacak şekilde kabın her tarafına eşit bir şekilde dağıtıldı.
6. 2-3 dk dokunun kaba yapışması için beklendi. Bazı durumlarda petri kabı önden Fetal Siğir Serumı (FBS) ile kaplandı.
7. Her doku parçasının üzerine birkaç damla ortam eklendi ve dokunun kaba yapışıp yapışmadığı kontrol edildi.
8. Normalde eklenen miktarın yarısı kadar (4-5 mL) kültür kaplarına ortam yavaşça ilave edildi.
9. Kültür kapları 37°C, 95% nem, 5% CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı ve 3-4 gün boyunca hiç dokunmaksızın inkübe edildi.

10. 3-4 günün sonunda kültürler kontrol edildi. Daha sonra hücre ortamına 2-3 ml taze ortam eklenip inkübasyona devam edildi.
11. İnkübasyona devam ederken gün aşırı hücreler kontrol edildi ve 1 haftanın sonunda hücre ortamı değiştirildi.
12. Sonraki haftada 2 kez hücreler beslendi.
13. 2-3 haftanın sonunda hücreler tripsinizasyona hazır hale geldi.
14. Kültür ortamı çekilerek hücre ve eksplantlar 2-3 ml PBS ile yıkandı.
15. 2 ml 0.05% Trypsin-EDTA her kültür kabına eklendi ve 3-4 dakika inkübatörde kabın içine dağılması için beklendi. Bu süre sonunda mikroskopta hücrelerin yuvarlaklaşıp kaptan ayrıldığı gözlemlendi.
16. Trypsin-EDTA içindeki hücreler T75 flask içine alındı ve üzerine 10 ml ortam eklendi. Eksplantların bulunduğu kültür kabı da 2-3 ml ortam ile temizlenerek fibroblastların alındığından emin olundu.
17. Kalan eksplantlara 5 ml ortam eklenerek daha fazla fibroblast elde etmek üzere işlemler tekrarlandı.

a. Kurulan Primer Fibroblast Kültürlerinin Karakterizasyonu: İmmünohistokimya Yöntemi ile HSP47 Protein Varlığının Gösterilmesi

Yöntemin Prensipleri: İmmünohistokimya, belirli bir proteinin doku veya hücre içerisinde bulunurluğunu tespit etmeye yönelik antijen-antikor ilişkisine dayalı bir tekniktir (117). Primer hücre kültürleri ile çalışıldığında dokudan kaynaklı hücre heterojenitesi olabileceğinden çalışılan hücrenin doğru hücre olduğundan emin olmak önemlidir. HSP47, deri fibroblast belirteçlerinden biridir. Bu nedenle kurulan primer fibroblast kültürlerinin karakterizasyonu için HSP47 belirteci incelendi.

Uygulama Basamakları

1. Hücreler 10 kuyulu ve ayrılabilir slaytların üzerine ekildi.
2. Ertesi gün hücrelerin yapıştığı gözlemlendikten sonra hücre ortamı uzaklaştırıldı.
3. PBS ile yıkama yapıldı.
4. Bir gün önceden -20°C'de soğutulmuş olan metanolle 10 dakika boyunca oda

sıcaklığında fiksasyon yapıldı.

5. PBS ile 3x5 dakika boyunca yıkama işlemi tekrarlandı.
6. Bloklama çözeltisi (%1 BSA içeren PBS) hazırlandı.
7. 1 saat boyunca bloklama işlemi yapıldı.
8. Bloklama çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra 400 µL HSP47 primer antikoru 1:50 oranında dilüe edilerek slaytlara eklendi ve 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.
9. 3x5 dakika PBS ile yıkama işlemi yapıldı.
10. Sekonder antikor da bloklama çözeltisi içinde 1:50 oranında dilüe edilerek uygulandı ve 1 saat inkübasyona bırakıldı.
11. Bu esnada DAB substrat ve DAB çözeltisi karışımı 1:1 oranda hazırlandı.
12. Bloklama işlemi ardından PBS ile yıkama işlemi yapıldı.
13. Hazırlanan DAB:DAB substrat karışımı 80µL olacak şekilde slaytlara eklendi ve 10 dakika beklendi.
14. Yıkama işlemleri yapıldı ve *mounting medium* ile slaytlar kapatıldı.
15. Işık Mikroskobu altında inceleme yapıldı.

3.6.3.5. Kurulan Primer Kültürlerde miR29 Transfeksiyon İşlemlerinin Yapılması: Primer Fibroblast Kültürlerinde miR29 ailesi üyelerinin susturulması

Yöntemin Prensipleri: Transfeksiyon, saflaştırılmış nükleik asitlerin ökaryotik hücrelere sokulması işlemidir (101). Burada dokudan gelen bulgulardan faydalanılarak keloid fibroblast hücrelerinde miR29-a ve hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde miR29b-2 transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyon işlemi için Qiagen miR29 family inhibitörleri ve Hiperfect Transfection reaktifi kullanıldı.

24 kuyulu plaklarda gerçekleştirilen transfeksiyon işlemi için hücre sayısı ve transfeksiyon reaktifi ve inhibitör konsantrasyonu ayrı ayrı optimize edildi. Transfeksiyon kontrolü gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile yapıldı.

Optimizasyon adımları:

1. Ekim yapılacak hücre sayısının belirlenmesi:

24 kuyulu plaklara $0.4 - 1.0 \times 10^5$ aralığında hücreler ekildi. Bu hücelere ertesi gün hiçbir reaktif eklenmeden WST-1 canlılık testi yapıldı (optimizasyonun adımlarının sonunda yöntem detayları anlatılmıştır). En yüksek absorbansı veren hücre sayısı transfeksiyon yapılacak sayı olarak belirlendi.

2. Transfeksiyon Reaktif Miktarının belirlenmesi:

Ekim yapılacak hücre sayısı belirlendikten sonra bu hücelere kuyu başına 3-9 μL Hiperfect Transfection reaktifi eklenerek 24 saat beklendi. Ertesi gün yine WST-1 testi ile hücre canlılıkları kontrol edildi. Hücelere inhibitör etki yaratmayan miktar tespit edildi.

3. Kullanılacak inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi:

Ekim yapılacak hücre sayısı ve transfeksiyon reaktifi miktarı belirlendikten sonra ilgili inhibitör konsantrasyonun belirlenmesi için 200;100;20;25 nM konsantrasyonlarda denemeler yapıldı. İnhibitör etki yaratmayan konsantrasyon WST-1 testi ile belirlendi.

a. WST-1 ile Hücre Canlılık Testi

WST-1 [2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfopenil)]-2H-tetrazolyum tuzu redüksiyonu yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin WST-1 boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntem mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu soluk kırmızı renkli WST-1 boyası koyu sarı formazan ürününe dönüşmektedir. Bu yöntem hücrelerin WST-1 boyasıyla inkübasyonu ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır (118).

Kit içeriği: WST-1 Boya Çözeltisi (Roche, İsviçre)

Uygulama Basamakları:

1. 24 kuyulu plaklara hücreler ekildi.
 2. Ertesi gün içinde 400 µL besiyeri bulunan her kuyuya 40 µL WST-1 boyası eklendi ve WST-1'in ortama iyice karışması için 5-10 sn el ile sallanarak karıştırıldı.
 3. Plaklar üzeri alüminyum folyo ile sarılarak 37°C'de %5 CO₂, %95 hava içeren inkübatörde 2 saat bekletildi.
 4. Ölçüm öncesi 1 dakika çalkalayıcıda bırakıldı.
 5. ELISA plak okuyucusunda 440 nm ve 600 nm referans dalga boyunda absorbans okutulması yapıldı.
- **Hesaplama: % Canlılık** = $[\text{Örnek Abs} - \text{Kör Abs} / (\text{Ortalama Kontrol Abs} - \text{Ort. Kör Abs})] \times 100$

Transfeksiyon İşlem Basamakları:

1. Canlılık testi sonuçlarına göre elde edilen optimum sayıda hücre ekimi yapıldı.
2. Ertesi gün serumu azaltılmış ortamla hücre kültür ortamı değiştirildi.
3. Transfeksiyon karışımı kuyu başına 1.5 µL inhibitör, 3 µL reaktif olacak şekilde hazırlandı ve 10 dakika oda sıcaklığında kompleks oluşumu için inkübe edildi.
4. Oluşan kompleksler hücrelerin üzerine yavaşça eklendi ve hücreler 2 saat boyunca oda sıcaklığında 1000 rpm'de santrifüjlendi.
5. Hücreler 72 saat boyunca transfeksiyona tabi tutuldu.

Transfeksiyon kontrolü için dokuda miR29 aile üyeleri ekspresyonlarının belirlenmesinde kullanılan kitler kullanılarak baskılanma düzeyleri belirlendi (Bk. 3.6.3.2/ Sy. 30).

3.6.3.6. Kollajen Maturasyonu Değerlendirilmesi için COL1A, COL3A, FİBRONEKTİN, HSP-47 ve LOXL2 Enzimi Protein Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi ile Analizi

Yöntemin Prensibi: Western Blot analizi, poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılmış olan protein karışımının içinde düzeyi ölçülmek istenen proteine özgü antikorunun kullanılmasına dayanan protein düzeyi belirleme yöntemidir. Western blot analizi; poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinlerin ayrılması, proteinlerin

membrana transferi ve ilgili proteinlerin görünür ve düzeyi ölçülebilir hale getirilmesi şeklinde üç aşamadan oluşmaktadır (119).

Bu çalışmada, transfekte edilmiş ve edilmemiş keloid, hipertrofik skar ve normal fibroblast hücrelerinde **COL1A**, **COL3A**, **FİBRONEKTİN**, **HSP-47** ve **LOXL2 enzimi** protein ekspresyon düzeyleri western blotting ile belirlendi.

a. Protein Saflaştırılması

1. Primer Kültür örnekleri RIPA buffer ile (Sigma Aldrich, Almanya) ile vortekslenerek homojenize edildi.
2. Homojenizasyon sırasında 30 dakika boyunca örnekler buz üzerinde tutuldu.
3. Her 5 dakikada bir vorteks işlemi yapıldı.
4. Toplam protein ekstraktları western blotting yönteminde kullanılmak üzere temiz tüplere aktarıldı ve -80 °C'de saklandı.

b. Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması

Elde edilen proteinin ölçümünde biçinkonik (BCA) protein ölçüm yöntemi kullanıldı (120). Bu amaçla Thermo marka (Kat No: BCA, Protein assay Kit, 2325) protein analiz kiti kullanıldı. Yöntemde, bakır sülfat BCA çözeltisine eklendiğinde elma yeşili renk oluşturmakta; bu çözelti protein çözeltisine ilave edildiğinde, proteinin peptid bağları ile etkileşerek, alkali koşullar altında iki değerlikli Cu^{2+} iyonları bir değerlikli Cu^+ iyonlarına indirgenerek mavi-mor renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

Protein standartı olarak bidistile su içinde 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ve $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında sığır serum albumini (BSA) standartları hazırlandı. Standartların hazırlanışı Tablo 17'de gösterilmiştir.

Tablo 17. BCA analizinde kullanılacak BSA standartlarının Hazırlanması

Final Konsantrasyon	BSA miktarı*	dH₂O
0 µg/mL	0µL	100 µL
100 µg/mL	10µL	90 µL
200 µg/mL	20µL	80 µL
400 µg/mL	40µL	60 µL
600 µg/mL	60µL	40 µL
800 µg/mL	80µL	20 µL
1000 µg/mL	55 µL	0 µL

(* Stok BSA çözeltisi 1mg/mL konsantrasyonunda olduğunda geçerli değerlerdir)

1. Standartlardan ve örneklerden 25'er µL 96 kuyucuklu plağa konuldu.
2. Çalışma çözeltisi; BCA çözeltisi (biçinkonik asit çözeltisi, sodyum karbonat, sodyum bikarbonat ve sodyum tartarat) ve bakır sülfat çözeltisi 1:50 oranında karıştırılmasıyla hazırlandı.
3. Her bir kuyucuğa 200 µL çalışma çözeltisi eklendi.
4. 37 °C'de 30 dakika bekletildi.
5. Örnek absorbanları 562 nm'de okundu.
6. Protein konsantrasyonları standart grafiği kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar µg/mL olarak ifade edildi.

Kuyu başına 15 µg protein örneği, ilgili proteinin moleküler ağırlığına göre oranı %8 veya %10'luk olarak belirlenen SDS-PAGE jel ile elektroforeze tabi tutularak ayrımlandı. Elektroforez işlemi sabit akımda önce 100 daha sonra 120 V voltajda gerçekleştirildi. Daha sonra poliviniliden diflorür (PVDF) membranına transfer edildi. Transfer işlemi sabit voltajda membran büyüklüklerine göre ayarlanan akım değerinde tüm gece boyunca gerçekleştirildi. Transfer sonrası bir saat süreyle bloklama tamponunda inkübe edildi. Yıkama aşamalarından sonra örnekler HRP ile işaretli sekonder antikor ile inkübe edilip tekrar yıkandı ve membran bir film kasedine aktarıldı. Görüntüleme için kemiluminesans yöntemine dayanan ECL kiti kullanıldı.

Kemiluminesans görüntü UVP jel dökümantasyon sistemi kullanılarak elde edildi. Tüm bu aşamalar ayrıntılarıyla aşağıda anlatılmıştır.

c. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Jelinin Hazırlanması

1. Çalışmalara jellerin hazırlanması ile başlandı. 12x12 cm boyutlarında iki cam düzlem sisteme yerleştirilip sıkıştırılarak jel kalıbı hazırlandı.
2. Sızıntı olup olmadığı su ile kontrol edildikten sonra bir pipet yardımıyla Tablo 18'de gösterildiği gibi ayırıcı jel monomer karışımının polimerizasyonu amonyum persülfat (APS) ve tetrametiletildiamin (TEMED) eklenerek gerçekleştirildi ve pipet yardımıyla hazırlanan jel çözeltisi iki cam arasındaki boşluğa camın bir kenarından sızdırılarak döküldü. Poliakrilamid jeller monomerik akrilamidin poliakrilamid zincirlerine polimerizasyonu ve N,N'-metilen- bis akrilamid tarafından çapraz bağlanması sonucu oluşmaktadır. Polimerizasyon reaksiyonu APS'nin eklenmesi ile başlatılmaktadır. Reaksiyon APS'den serbest radikallerin oluşmasını katalize eden TEMED ile hızlandırılmaktadır.
3. Jelin üst sınırının düzgün olması için hava ile temas eden yüzeyine propanol eklendi.
4. Jel polimerize olduktan sonra üstteki propanol boşaltılıp su ile yıkandı.
5. Paketleyici jel çözeltisi Tablo 19'de belirtildiği gibi hazırlandı ve ayırıcı jelin üstüne eklendi. 12 kuyulu tarak 45 ° açı ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde iki cam arasına yerleştirildi. Polimerizasyona bırakıldı.

Tablo 18. SDS–PAGE yönteminde ayırıcı jelin (%8 ve %10'luk) hazırlanması

JEL BİLEŞENLERİ	%8	%10
Saf su	7.5 mL	6.4 mL
Akrilamid/Bisakrilamid (%29.2/%0.8 w/v)	4.2 mL	5.25 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	4.0 mL	4.0 mL
%10 SDS	0.16 mL	0.16 mL
%10 (w/v) Amonyum persülfat	0.16 mL	0.16 mL
TEMED	0.016 mL	0.016 mL
Total karışım	16.0 mL	16.0 mL

Tablo 19. SDS–PAGE yönteminde paketleyici jelin (%4) hazırlanması

JEL BİLEŞENLERİ	HACİM
Saf su	6.00 mL
Akrilamid/Bis-akrilamid (%29.2/%0.8 w/v)	1.33 mL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.50 mL
%10 SDS	0.10 mL
%10 (w/v) amonyum persülfat	0.10 mL
TEMED	0.01 mL
Total karışım	10.00 mL

d. Örnek Hazırlanması

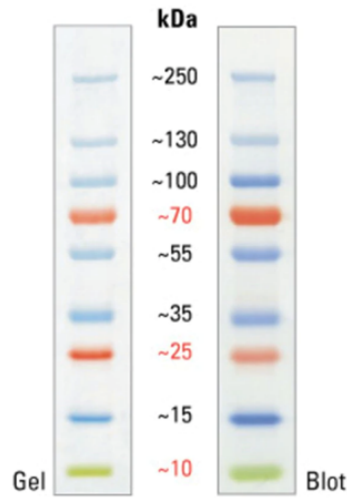
Kuyucuk başına 30 μL 'de yaklaşık 15 μg protein olacak biçimde örnekler hazırlandı. Örnekler hazırlanırken 5X örnek tamponu son konsantrasyonu 1X olacak şekilde hesaplama yapıldı. Örnekler 95 $^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika denatüre edildi.

Tablo 20. Jele yüklenecek örnekler için kullanılan 5X örnek tamponu içeriği

Gliserol	4.5 mL
Brom Fenol Mavisi	9 mg
Merkaptoetanol	2.4 mL
%20 SDS	3 mL
1 M Tris Tamponu (pH 6.8)	3.75 mL
dH ₂ O	1,35 mL
Toplam	15 mL

e. Jelin Yüklenmesi

Paketleyici jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartıldı. İki cam arasında bulunan contalar çıkartılarak elektroforez tankı içine yerleştirildi ve 1 litre 1X yürütme tamponu (yürütme tamponu stok: Tris 15.1 g, Glisin 72 g, SDS 5 g, dH₂O 1000 mL'de) ile dolduruldu. Kuyulara protein örnekleri ve moleküler ağırlık standartı (Thermo PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 26619) yüklendi.



Şekil 14. Moleküler Ağırlık Standardı (Thermo, ABD)

f. Elektroforetik Yürütme

Örnek yüklendikten hemen sonra sistem kapatıldı. Örnekler ayırıcı jele girinceye kadar 100 Volt gerilim uygulandı. Örnek ayırıcı jele geçtikten sonra ise gerilim 120 Volt'a çıkarıldı. Brom fenol mavisi jelin alt ucuna varınca akım kesildi ve jel tanktan uzaklaştırıldı.

g. Proteinlerin Membrana Transferi

Çalışmamızda ıslak transfer tekniği kullanıldı. Bu amaçla, BioRad marka elektroblotlama sistemi kullanıldı.

1. Transferde kullanılacak polivinilidendiflorid (PVDF) membran metanol ile doyuruldu. Filtre kağıtları (1703956 Thick blot paper 15x20cm) 1X transfer tamponu (Transfer stok çözeltisi: Tris 30.3 g, Glisin 14 g, dH₂O, Total hacim 1000 mL) ile ıslatıldı.
2. Western sandviçi hazırlandı: 2 adet filtre kağıdı (+) yüklü bloğa yerleştirildi, üzerine membran (Millipore, İmmobilon P, Kat No: IPVH09120; Sigma) ardından poliakrilamid jel yerleştirildi. Daha sonra filtre kağıtları transfer solüsyonu ile ıslatılarak en üste kondu. Bu aşamalar sırasında arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. (-) Yüklü blok kapatılarak 200 mA sabit akımda tüm gece boyunca transfer gerçekleştirildi. Transfer işlemlerini sonlandırmak için güç kaynağı kapatıldı ve sistemin kapağı açıldı. Membran dikkatlice alındı.

h. Bloklama

Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla bloklama yapıldı. Süt tozu ve BSA'nın farklı konsantrasyonları denenerek en uygun konsantrasyon (%5 BSA ve %7 süt tozu) seçildi. Bu sonuçlar doğrultusunda, transfer sonrası proteinleri bağlamış olan membran, bloklama çözeltisi içinde 60 dakika oda sıcaklığında bloke edildi. Bu süre sonunda membran üç kez % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi (yıkama çözeltisi) ile 10 dakika süre ile yıkandı.

i. Primer Antikor İle İnkübasyon

% 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde %5'lik BSA ve %7'lik süt tozu taze hazırlandı. Bloklama sonrasında membranlar, sırasıyla 1/250 oranında dilüe edilmiş

COL1A (Santa Cruz, sc-59772); 1:100 oranında dilüe edilmiş COL3A (Santa Cruz, sc-271249); 1:100 oranında dilüe edilmiş LOXL-2 (Santa Cruz, sc-293427); 1:250 oranında dilüe edilmiş HSP47 (Santa Cruz, sc-13150); 1:100 oranında dilüe edilmiş fibronektin (Santa Cruz; sc-8422) ve 1:500 oranında dilüe edilmiş aktin antikor (Santa Cruz, sc-47778) içeren BSA ve süt tozu çözeltiğinde +4 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Bu süre sonunda ortamdaki bağlanmamış antikor, yıkama çözeltisi (%0.05 NP-40 içeren %10 PBS) ile 3 kez 10 dakika süre ile oda sıcaklığında yıkandı.

j. Sekonder antikor ile inkübasyon

Yıkama sonrasında membran primer antikor tanıyan sekonder antikor (m-IgGK BP-HRP, Santa Cruz, sc-516102) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikorlar 1/500 oranında %0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde hazırlandı. Bu sürenin sonunda membran tekrar yıkama çözeltisi ile 10 dakika süre ile 3 kez yıkandı.

k. Görüntüleme

Tüm yıkamalar sonrasında protein bantlarının görünür hale getirilmesi amacıyla Perkin Elmer marka (NEL100001EA) ECL plus kiti kullanıldı (sinyal oluşturma çözeltisi: kit içindeki peroksit ve enhancer solüsyonları 1mL:1mL oranında karıştırılarak hazırlandı). Kit, *horseradish* peroksidaz enziminin hidrojen peroksit varlığında substratı olan luminolü oksitlemesi ve luminolün uyarılmış durumdan bazal duruma geçerken film üzerinde kemilüminesans ışımaya oluşturma ilkesine dayanmaktadır. Bu filmlerin dansitometrik incelenmesi, protein düzeyinin belirtilmesini sağlamaktadır.

Film aşaması: Kaset içine şeffaf dosya yerleştirildi ve bu dosyanın içine membran kondu. Üzerine sinyal oluşturma çözeltisi eklendi. Kaset (Amersham, RPN 11649) içerisine karanlık odada film (Kodak Biomax Light Film, Katolog No: 1788207) yerleştirildi. Film banyo işlemleri karanlık odada yapılarak görüntü alındı.

I. Dansitometrik Analiz

Protein bant yoğunlukları Image Studio Lite Analysis Software (LICOR) programında değerlendirildi. Veriler β -aktine oranlanarak standardize edildi.

3.6.3.7. Kollajen Maturasyonun Değerlendirilmesi için Ekstrasellüler Lizil Oksidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Ekstrasellüler Lizil oksidaz aktivitesi fluorometrik bir kit olan *Lysyl Oxidase Activity Assay Kit (Fluorometric) (ab112139) (Abcam, İngiltere)* ile ölçüldü. Bu kitin çalışma mekanizması; LOX substratı, örnekte bulunan LOX tarafından dönüştürülmekte ve böylece hidrojen peroksit açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan hidrojen peroksit de Horseradishperoksidad (HRP) tarafından dönüştürülen kırmızı floresan substrat kullanılarak tespit edilir. Oluşan floresans Ex/Em=540/590 nm'de ölçülür.

Uygulama Basamakları:

1. 24 kuyulu plaklara ekilen ve transfekte edilen tüm deney gruplarından 72 saatin sonunda hücre ortamları toplandı.
2. Toplanan ortamlar 13000 g'de 10 dakika boyunca +4 °C'de santrifüj edildi ve süpernatantlar toplandı.
3. Kit içeriğinde *assay buffer* oda sıcaklığına gelene kadar beklendi.
4. Bu esnada kit içeriğinde liyofilize olarak sağlanan *horseradish peroxidase* enzimi hazırlandı. Bunun için 1 mL assay buffer kullanıldı ve 50 U/mL HRP stok çözeltisi hazırlanmış oldu.
5. Kit içeriğinde liyofilize halde bulunan HRP Substratı ise 100 μ L DMSO ile çözüldü. Böylece 250x HRP Substrat stok çözeltisi elde edildi.
6. Hazırlanan bu çözeltiler kullanılarak 2x LOX Reaksiyon Karışımı Tablo 21'deki gibi hazırlandı.

Tablo 21. LOX Aktivite ölçümünde kullanılacak 2X LOX reaksiyon karışımı içeriği

250X HRP Substrat Stok Çözeltisi	20 µL
50 U/mL HRP Stok Çözeltisi	20 µL
Assay Buffer	5 mL
Toplam Hacim	5.040 mL*

*Bu miktar 96 kuyulu bir plak için yeterlidir.

- Her bir kuyuya 50 µL örnek eklendi. Kör olarak assay buffer kullanıldı. Örneklerle herhangi bir dilüsyon yapılmasına ya da konsantre edilmesine gerek olmadığı ön denemelerle belirlendi.
- İçinde örnek olan her kuyuya hazırlanan LOX reaksiyon karışımından 50 µL eklendi.
- Plak ışıktan korunarak 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- Fluorometrik temelli bir ölçüm olduğundan eksitasyon dalga boyu 540, emisyon dalga boyu 590 nm olacak şekilde ölçüm yapıldı.
- Veriler kör değerleri çıkarıldıktan sonra ortalama $\pm$ standart sapma biçiminde verildi.

3.6.3.8. Kollajen Maturasyonunun Değerlendirilmesi için Ekstasellüler Fibril Oluşumun Elektron Mikroskopik Olarak Belirlenmesi

Kollajen maturasyonun değerlendirilmesinde kollajen fibrillerinin oluşumunun gözlenmesi amacıyla geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile inceleme yapıldı.

Uygulama Basamakları:

1. 24 kuyulu plaklara ekilen ve transfekte edilen tüm hücre gruplarının besi yerlerine askorbik asit fosfat (136 µg/mL) ilave edilerek kültüre edildi.
2. 72 saatin sonunda ortamlar uzaklaştırılarak hücreler toplandı.
3. Karnovski solüsyonuna (pH 7. 4) konulan hücre pelletleri +4°C'de bir gece fikse edildi.
4. 0,1 M sodium fosfat tamponu ve 0,1 M sükroz karışımında 3 kez 15 dk yıkama işlemi gerçekleştirildi.

5. Pelletler sodyum fosfat tampon içindeki %2 osmiyum tetraoksit (pH 7.4) çözeltisi ile 90 dk karanlık ortamda post fiksasyon için muamele edildi.
6. Daha sonra hücre pelletleri yumuşak agar içerisine gömüldü.
7. 0,1M sodyum fosfat tamponu (pH 7. 4) ile 3 kez 15 dk yıkandı.
8. %50 aseton ile 2 kez 15 dk dehidratasyon yapıldı.
9. Hücre blokları %70 aseton, %0,5 uranilasetat ve %1 fosfotungstik asit karışımı ile +4°C'de kontrast oluşturma amaçlı bir gece boyunca bırakıldı.
10. Ertesi gün sırasıyla %80, 90 ve 96'lık aseton ile 2 kez 15 dk muamele edildikten sonra %100'lük asetonunda 2 kez 20 dk tutuldu.
11. Propilen oksitte 2 kez 15 dk bekletilen hücre blokları sırasıyla 2:1, 1:1 ve 1:2 oranında hazırlanan propilen oksit: epon karışımlarında 30 dk bekletildi.
12. Epon solüsyonunda +4°C'de bir gece bırakıldı.
13. Ertesi gün hazırlanan yeni epon solüsyonunda 48 saat 65°C'de polimerizasyon için inkübe edildi.
14. Daha sonra hücre bloklarından yarı ince kesitler ultramikrotom (Leica Ultracut R) aracılığı ile alındı.
15. Alınan yarı ince kesitler toluidin mavisi boyaması yapılarak ışık mikroskopunda (Olympus CX41) görüntülendi.
16. Daha sonra ince kesitler alınarak kontrastlaması yapıldı ve elektron mikroskobu (Zeiss Sigma 500) ile görüntülendi.

3.6.3.9. Keloid ve Hipertrofik skar primer fibroblast kültürlerinde miR29 transfeksiyonu ile değişen TGF- β /Smad Sinyal Yolağı ve ilişkili biyomoleküllerin gen ekspresyonlarının Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile belirlenmesi

Yöntemin Prensipleri: PCR, bir DNA zincirinin bilinen iki parçası arasında uzanan özel bir DNA bölümünün enzimatik olarak çoğaltıldığı *in vitro* bir tekniktir (108). Oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boyanın verdiği sinyal izlenir.

Bu yöntemle toplanan keloid, hipertrofik skar ve sağlıklı deri dokularından elde edilen primer fibroblast kültürlerinin sırasıyla miR29a ve miR29b-2 transfeksiyonu sonrasında TGF- β , Smad-2, Smad-3, Smad-4, Smad-7, CTGF, TIMP-1 gen

ekspresyonları belirlendi. Bunun için aşağıdaki adımlar izlendi:

- a. Hücrelerden RNA izolasyonu,
- b. RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi,
- c. cDNA sentezi,
- d. SYBR Green PCR Karışımı ile qPCR analizi

a. Hücrelerden RNA İzolasyonu: Hücrelerden RNA izolasyonu için Aurum Total Mini Kit (BioRad, ABD) kullanıldı.

Uygulama basamakları:

1. Kit içeriğinde sağlanan lizis çözeltisi üzerine 500 μ L β -merkaptoetanol ilave edilerek kullanıma hazır hale getirildi. Benzer şekilde düşük şiddetli yıkama çözeltisine de 80 mL %100 etanol eklenerek hazırlandı.
2. Kit içeriğinde liyofilize halde bulunan DNaz 250 μ L 10 mM Tris (pH 7.5) içinde çözündürülerek hazırlandı.
3. Hücrelerin ortamları alındıktan sonra PBS ile yıkama yapıldı.
4. Hücrelerin üzerine 350 μ L lizis çözeltisi eklenerek lize edildi ve tüplere alındı.
5. Her bir tüpe 350 μ L %70 etanol ilave edilerek tüpler alt-üst edildi.
6. Ardından 2 mL'lik kapaksız tüplere kolonlar yerleştirildi ve örnekler kolonlara aktararak 10000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Yıkama tüpü boşaltıldı ve kolon yeniden yerleştirildi.
7. 700 μ L düşük şiddetli yıkama solüsyonu kolonlara eklendi ve 10000 g'de 30 saniye santrifüj edilip yıkama tüpü boşaltıldı.
8. Her bir örnek için 5 μ L DNaz I- 75 μ L DNaz dilüsyon solüsyonundan oluşan karışım hazırlanarak 80 μ L kolonlara eklenerek 25 dakika beklendi.
9. 700 μ L yüksek etkili yıkama solüsyonu kolonlara eklenerek 10000 g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Yıkama tüpü boşaltıldı.
10. 700 μ L düşük etkili yıkama solüsyonu bir kere daha kolonlara eklendi ve 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Yıkama tüpü boşaltıldı.
11. 2 dakika fazla santrifüj yapılarak kalan sıvı kısımlar uzaklaştırıldı.

12. Kolon 1,5 mL kapaklı tüpe aktarıldı ve 40 µL elüsyon solüsyonu kolona eklenerek 1 dakika beklendi. 2 dakika süreyle santrifüj yapılarak RNA toplandı.
13. Elde edilen RNA kullanılabileceği kadar – 80°C’de saklandı.

b. RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi (110): Elde edilen RNA’ların konsantrasyonları ve saflık durumları spektrofotometrik olarak Nanodrop cihazı (Thermo, Almanya) kullanılarak belirlendi. Bir nükleik asit olan RNA 260 nm dalga boyunda maksimum absorbanza sahiptir. 280 nm’de ise proteinler maksimum absorbanse gösterir. 230 nm’de yapılan ölçüm ile kontaminasyon belirlenir. Saflık değeri (OD_{260}/OD_{280}) 1.8 ila 2 arasında olmalıdır.

Uygulama basamakları:

1. Cihazda RNA ölçümü seçeneği seçildikten sonra kör okuması için 2 µL RNaz içermeyen su kullanılarak sıfırlama yapıldı.
2. Ardından her bir RNA örneğinden 2 µL eklenerek sırayla ölçüm yapıldı.
3. RNA konsantrasyonları ng/µL cinsinden elde edildi.

Bu aşamadan sonra konsantrasyonu bilinen RNA örnekleri kullanılarak cDNA sentezi yapıldı.

c. cDNA sentezi: Konsantrasyonu bilinen RNA’lardan cDNA sentezi için iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad, ABD) kullanıldı. Buradaki amaç, 100 fg-1 µg toplam RNA’dan tek iplikli cDNA’sının ön amplifikasyonunun yapılmasıdır.

Uygulama basamakları:

1. Kalıp RNA örnekleri buz üstünde çözündürüldü. Aynı zamanda kit içeriğinde yer alan 5x iScript Reaction Mix ve iScript Reverse Transcriptase da oda sıcaklığında çözünmeye bırakıldı.
2. Hazırlanan reaksiyon karışımının içeriği Tablo 22’de verilmiştir. 100 ng cDNA elde etmek için her bir RNA örneği için ayrı hesaplama yapılmıştır.

Tablo 22. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon içeriği

İçerik	Hacim/Reaksiyon
5x iScript Reaction Mix	4 µL
iScript Reverse Transcriptase	1 µL
RNAz içermeyen su	Değişken
Kalıp RNA (en son eklenir)	Değişken (20 ng'a karşılık gelen hacim)
Toplam Hacim	20 µL

3. Karışıma kalıp RNA en son eklenerek karıştırıldı. Bu aşamalarda işlemler hep buz üzerinde devam ettirildi.
4. Thermal Cycler (BioRad, ABD) cihazında 5 dakika 25 °C'de, 20 dakika 46 °C'de ve 1 dakika 95 °C'de cDNA sentezi gerçekleştirildi.
5. Örnekler kullanılabildiği kadar – 20°C'de saklandı.

Bu aşamadan sonra cDNA örnekleri kullanılarak TGF- β , Smad-2, Smad-3, Smad-4, Smad-7, CTGF, TIMP-1 gen ekspresyonlarının belirlenmesi için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu işlemine geçilmiştir.

d. SYBR Green PCR Karışımı ile qPCR analizi: Tek iplik cDNA sentezi ardından, elde edilen bu cDNA'ların kalıp olarak ve ilgili genlere spesifik primer karışımlarının kullanılması ile RT-PCR deney setleri kuruldu. Bunun için tasarlanan primer dizileri Oligomer firmasına sentezlettiirildi. İlgili primer dizilimleri Tablo 23'de verilmiştir. Ayrıca SsoAdvanced Universal Inhibitor Tolerant SYBR Green Supermix (BioRad, ABD) kullanıldı. Kontrol geni olarak GAPDH seçildi.

Tablo 23. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizlerinde Kullanılan Primer Dizileri

Oligo Adı	Baz Dizisi 5'-3'	Optimize edilen Tm (°C)
TGF- β -Forward	TGGCGATACCTCAGCAACC	60
TGF- β -Reverse	CTCGTGGATCCACTTCCAG	
Smad-2-Forward	CCTTCAGTGC GTTGCTCAAGCATGTCATA	65
Smad-2-Reverse	AATGCTAATGAACAGAAGAGTTGTTACAT	
Smad-3-Forward	TGCGTCTCCAGTCATCTGTAAGAG	61
Smad-3-Reverse	TGAATGCAACTGACTACATAAACCAA	
Smad-4-Forward	GGGCAAGACTGCAAAC TTTTATAT	59
Smad-4-Reverse	AAATTCTCTATACAAAGTCACTGCCAAT	
Smad-7-Forward	CTGCAACCCCATCACCTTA	60
Smad-7-Reverse	CCAGAAGAAGTTGGGAATCTGA	
CTGF-Forward	GTTTGGCCCAGACCCAACT	60
CTGF-Reverse	GGAACAGGCGCTCCACTCT	
TIMP-1-Forward	TTGTGGGACCTGTGGAAGTA	58
TIMP-1-Reverse	CTGTTGTTGCTGTGGCTGAT	

Uygulama basamakları:

1. İlk olarak tüm kit içeriği oda sıcaklığına getirildi ve örnekler buz üstünde çözdürüldü.
2. Reaksiyon karışımı Tablo 24'teki gibi hazırlandı.

Tablo 24. qPCR Reaksiyon Karışımı İçeriği

İçerik	Hacim/Reaksiyon
SsoAdvanced Universal Inhibitor-Tolerant SYBR Green Supermix (2x)	10 µL
Forward ve reverse primerler	2 µL
RNAz içermeyen su	Değişken
Kalıp cDNA (en son eklenir)	Değişken (20 ng için 4 µL)
Toplam Hacim	20 µL

3. Hazırlanan reaksiyon karışımı tüplere paylaştırılarak her birine cDNA ilave edildi.
4. Rotor-Gene Real Time PCR (QIAGEN, Almanya) cihazına tüpler yerleştirilip reaksiyon koşulları sisteme tanımlandı.
5. Bu aşamada cDNA miktarı, sıcaklık ve döngü sayısı için ayrı ayrı optimizasyonlar yapıldı.
6. Reaksiyon koşulları Tablo 25'teki gibidir.

Tablo 25. qPCR reaksiyon koşulları

Aşama	Zaman	Sıcaklık	Döngü Sayısı
Polimeraz Aktivasyonu	3 dakika	98°C	
Denatürasyon	15 s	98°C	
Uzama	30 s	55-60 °C	45-50
Birleşme	30 s	70 °C	
Melting Curve Analizi	65-95 °C aralığında 0.5 °C artarak 5 saniyede bir		

7. Elde edilen bulgular $\Delta\Delta C_T$ yöntemine göre analiz edildi ve kontrol olarak kullanılan GADPH'a oranlanarak değerlendirildi. Bulgular, kat değişim olarak hesaplandı.

3.6.3.10. Keloid ve Hipertrofik skar primer fibroblast kültürlerinde miR29 transfeksiyonu ile değişen TGF- β /Smad Sinyal Yolağı ilişkili Ekstrasellüler TIMP-1 Protein Düzeylerinin ELISA ile Belirlenmesi

Ekstrasellüler TIMP-1 protein düzeyleri kolorimetrik bir kit olan Human Tissue Inhibitors of metalloproteinase 1 ELISA Kit (YLA0461HU) (YLBIONT, Çin) ile ölçüldü. Bu kitin çalışma prensibi sandviç enzim immünassay temeline dayanır. TIMP-1 monoklonal antikorlu ile kaplı kuyulara eklenen örneklerdeki TIMP-1 antikor ile etkileşir ve sonra biotin işaretli anti-TIMP-1 antikorları streptavidin-HRP ile kompleks oluşturur. Arka arkaya substrat ilavesi ile mavi renk sarıya döner. Bu sarı rengin şiddeti TIMP-1 konsantrasyonu ile orantılıdır. 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılır.

Uygulama Basamakları:

1. 24 kuyulu plaklara ekilen ve transfeke edilen tüm deney gruplarından 72 saatin sonunda hücre ortamları toplandı.
2. Toplanan ortamlar 13000 g'de 10 dakika boyunca +4 °C'de santrifüj edildi ve süpernatantlar toplandı.
3. Kit içeriğindeki tüm çözeltiler oda sıcaklığına gelene kadar beklendi.
4. Kit üreticisinin önerdiği şekilde standart çözeltiler (2000;1000;500;250;125;62.5 pg/mL) hazırlandı.
5. Kitte çalışılacak uygun örnek konsantrasyonunun belirlenmesi için ön deneme yapıldı. Bunun için kör, maksimum konsantrasyondaki standart (2000 pg/mL), minimum konsantrasyondaki standart (62.5 pg/mL), örneğin kendisi, 1:2 ve 1:10 dilüe edilmiş örnekler için ön çalışma yapıldı. Yapılan çalışma sonucunda örneğin dilüe edilmiş hallerinin kullanılmasının standart eğrisinin sınırları içinde kalacağı belirlendi.
6. Plak üzerinde standartlar için ayrılan kuyulara çift kuyu olacak şekilde 50 µL standart eklendi.
7. Örnek kuyularına 40 µL örnek ilavesi ardından 10 µL TIMP-1 antikor ilavesi yapıldı. Standart ve örnek kuyularına 50 µL streptavidin-HRP eklendi. Tüm plak çalkalanarak örneklerin karışması sağlandı. 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
8. Bu arada kitin içeriğinde sağlanan çıkan 20 mL'lik 30X'lik yıkama çözeltisi 600 mL 1X olacak şekilde dilüe edilerek hazırlandı.
9. 60 dakikanın ardından yıkama solüsyonu kullanılarak plak 5 kez yıkandı ve çözelti tamamen uzaklaştırıldı.
10. Yıkama aşamasından sonra 50 µL chromogen solution A her bir kuyuya ve ayrıca kör kuyusuna da ilave edildi. Ardından, 50 µL chromogen solution B kör kuyusu dahil tüm kuyulara eklendi ve karıştırıldı. Yeniden plak üstü kapatılarak ve ışıktan korunmak için alüminyum folyo ile sarılarak 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
11. Bu sürenin sonunda 50 µL durdurma çözeltisi tüm kuyulara eklendi ve renk maviden sarıya döndü.
12. 450 nm dalga boyunda BioTek Elisa Reader kullanılarak ölçüm alındı.

13. Standart eğrisinden yola çıkılarak örneklerdeki ekstraselüler TIMP-1 protein konsantrasyonları pg/mL cinsinden hesaplandı (Bk. 4.9.; Sy.100).

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

DeneySEL çalışmalar 2016-2020 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Ayrıntılı çalışma planı Tablo 26' te verilmiştir.

Tablo 26. Tez Çalışmasına İlişkin Araştırma Takvimi

Kasım 2015-2016 Temmuz	Araştırmanın Etik Kurul Onayı İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 26.11.2015 tarih ve 283-SBKAEK protokol numaralı 2015/21-06 no.lu kararı ile onay alınmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2016.KB.SAG.019 protokol numarası ile maddi olarak desteklenmiştir.
2016 Ağustos-2017 Mayıs	Projenin malzeme satın alımları tamamlanmıştır.
2016 Ağustos-2018 Mayıs	Doku Toplama Çalışmaları ve Primer Hücre Kültürü çalışmaları yapılmıştır.
2017 Haziran-2017 Aralık	Projenin ilk aşamasının qPCR deneyleri tamamlanmıştır.
2018-2020	Çalışmayla ilişkili tüm deneySEL çalışmalar aşamalı olarak tamamlanmıştır.
2019-2020	Orpheus kapsamında değerlendirilmesi amacıyla tezle ilgili çalışmalar yayımlanmıştır. Tez yazım süreci tamamlanmıştır.

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma bulgularının istatistiksel analizi, SPSS için Windows istatistik programının 24.0 versiyonu ve GraphPad kullanılarak yapılmıştır. Deneyler üç farklı zamanda üç tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart hata biçiminde verilmiştir. Verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal Wallis testi kullanılarak yapılmış ve Kruskal Wallis testinden elde edilen p değerleri istatistiksel olarak anlamlı çıktığında Mann Withney U karşılaştırma testi ve Dunn's post-test kullanılmıştır. Bulgular arası korelasyon analizi için Spearman testi uygulanmıştır. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel bulgular güç analiziyle birlikte değerlendirilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu araştırma nadir görülen patolojik durumlarla ilişkili olduğundan toplanan doku sayısını artırmak mümkün olamamıştır. Daha fazla dokudan elde edilecek verilerle normal dağılım sağlanabilir ve bulgular istatistiksel olarak daha iyi yorumlanabilirdi. Ancak mevcut literatürde $n=1-8$ (80,91,106,107) doku sayısında çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmanın bir diğer kısıtı ise primer kültürlerle çok uzun süre çalışmanın mümkün olmamasıdır. Pasaj ilerledikçe hücreler senesense girdiklerinden tekrarlanabilir veri elde edilememektedir. Bu patolojik durumlarla ilişkili standart bir hayvan modeli de olmadığından ve hatta keloidler yalnızca insanlarda görüldüklerinden kurulan hipotezleri bir hayvan çalışması ile test etmek söz konusu değildir. Bu bağlamda incelendiğinde araştırma mevcut hipotezlerin test edildiği en uygun deneysel tasarıma sahiptir.

3.10. Etik Kurul ve DEÜ Bilimsel Araştırma Proje Destek Onayı

Araştırmanın Etik Kurul Onayı İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 26.11.2015 tarih ve 283-SBKAEK protokol numaralı 2015/21-06 no.lu kararı ile onay alınmıştır (EK2). Gönüllülerden Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu ile izin alınarak dokular elde edilmiş ve çalışılmıştır (EK1).

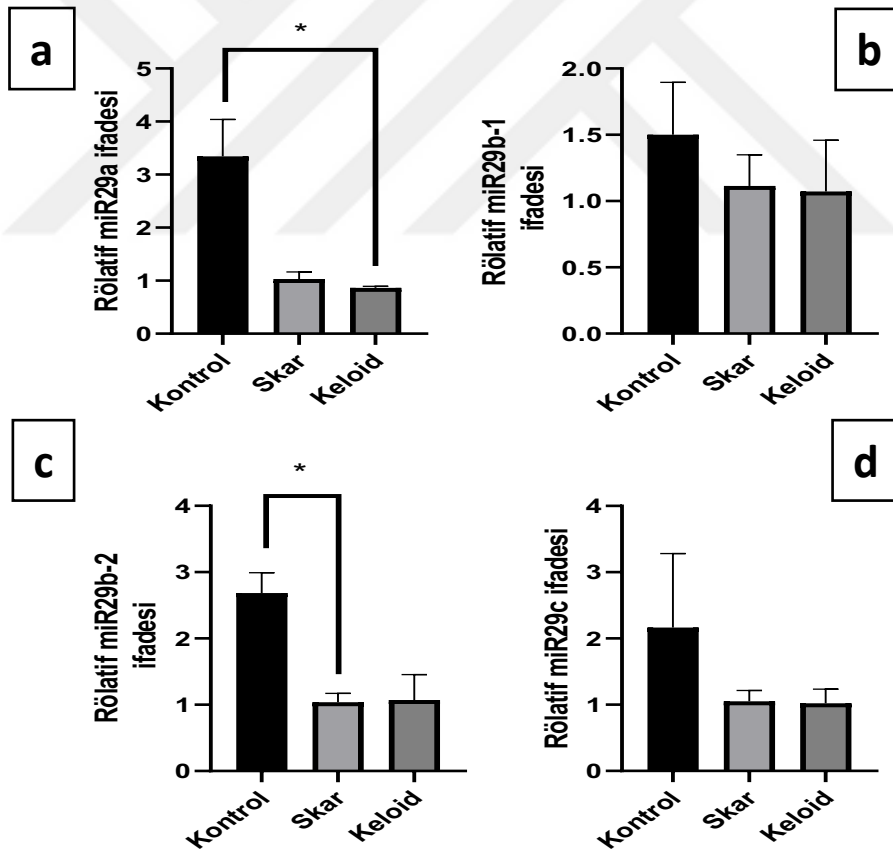
Ayrıca araştırma 20 Temmuz 2016 tarihinde DEÜ-BAP tarafından desteklenmiştir (2016. KB. SAG. 019).

4. BULGULAR

4.1. Toplanan keloid, hipertrofik skar ve sağlıklı deri dokularındaki miR29 aile üyelerinin varlıklarının değerlendirilmesi

4.1.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenen miR29 Ailesi Ekspresyon Bulguları

Toplanan ve homojenize edilerek RNA'ları izole edilen ve işlenen örneklerdeki miR29a, miR29b-1, miR29b-2 ve miR29c düzeylerine ait bulgular Şekil 15'de özetlenmiştir:



Şekil 15. Keloid (n=2), hipertrofik skar (n=5) ve sağlıklı deri dokularındaki (n=20) miR29 aile üyeleri ekspresyonları. a) miR29a; b) miR29b-1; c) miR29b-2 ve d) miR29-c (*p<0.05).

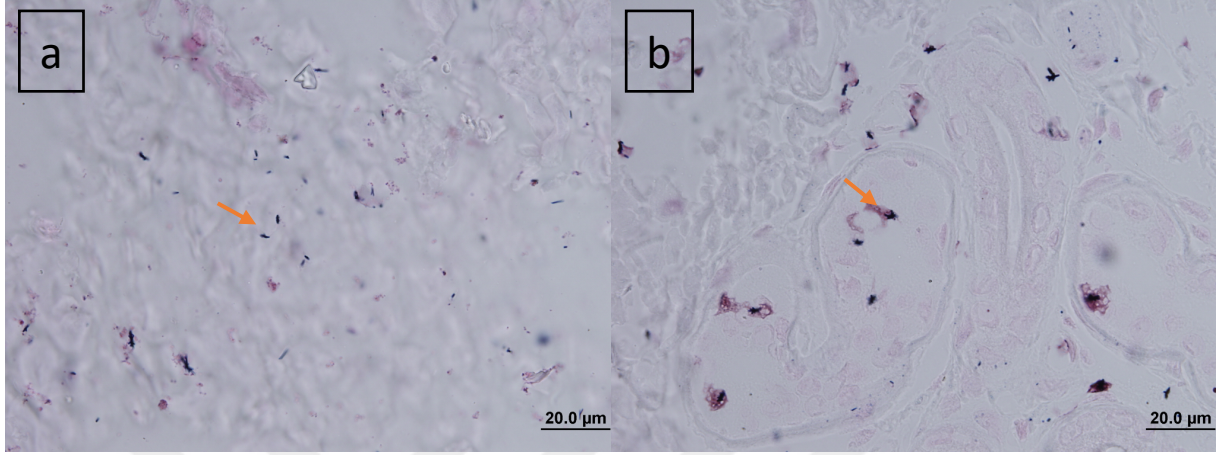
- miR-29a ifadesi kontrol dokularına göre kıyaslandığında hem keloid hem hipertrofik skar dokularında düşük bulunmuştur. miR29a ifadesinin keloid dokularındaki düşüklüğü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 15-a) (p:0.0316).
- miR29b-1 ifadesi kontrol dokularına göre kıyaslandığında hem keloid hem hipertrofik skar dokularında düşük bulunmuştur, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 15-b).
- miR-29b-2 ifadesi kontrol dokularına göre kıyaslandığında hem keloid hem hipertrofik skar dokularında düşük bulunmuştur. miR29b-2 ifadesinin hipertrofik skar dokularındaki düşüklüğü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 15-c) (p:0.009).
- miR29c ifadesi kontrol dokularına göre kıyaslandığında hem keloid hem hipertrofik skar dokularında düşük bulunmuştur, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 15-d).

4.1.2. *In Situ* Hibridizasyon ile Belirlenen miR29 Ailesi Lokalizasyon Bulguları

Toplanan ve formaline alınarak saklanan dokular parafine gömülmüştür. Parafine gömülü dokulardaki miR29a, miR29b-1, miR29b-2 ve miR29c lokalizasyonları belirlenmesi için hem ticari olarak satın alınmış kit kullanılarak hem de laboratuvarda hazırlanan çözeltiler kullanılarak iki farklı akış izlenmiştir. İzlenen protokoller doğrultusunda kontrol probu olarak tasarlanan ve deney koşullarının belirlenmesi için optimizasyon adımlarında kullanılan U6 ile yapılan denemeler sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 16'da gösterilmiştir.

Bu bulgulara göre kit ile ISH akışı izlendiğinde U6 probunun hibridize olmadığı, görünen çökeltilerin ise artefakt olduğu gözlenmiştir (Şekil 16-a). Laboratuvarda hazırlanan ve aşamaları modifiye edilen akış izlendiğinde U6 probunun sitoplazmada görünmeye başladığı gözlenmiştir (Şekil 16-b). Ancak aynı akış tekrar izlendiğinde ve farklı doku çalışıldığında tekrarlanabilir sonuç alınamamıştır. Yapılan ve değiştirilen tüm parametreler ve farklı dokulardaki çalışmalar sonucunda da deney koşullarının optimizasyonu mümkün olmamıştır. Firma ile iletişime geçilerek yeni

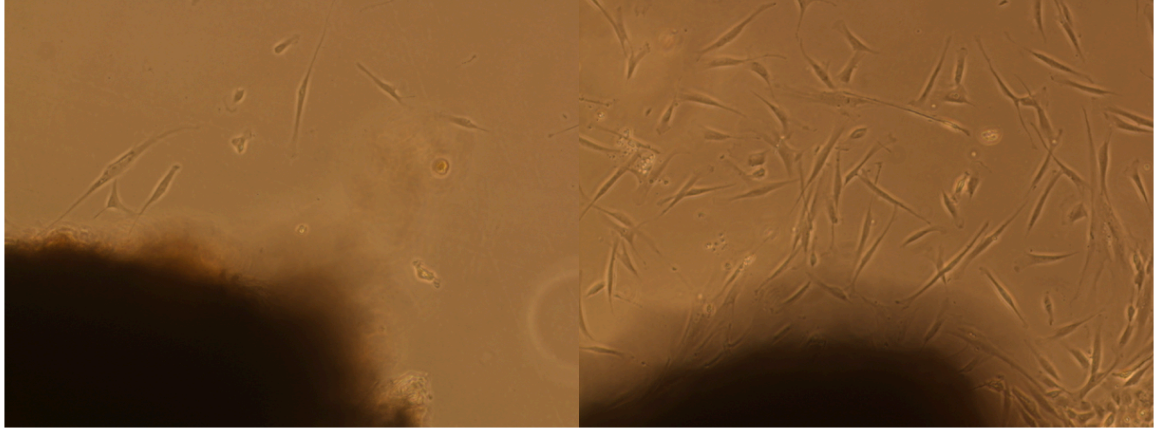
prob temin edilmek istenmiştir, ancak firma el değiştirdiğinden teknik destek almak da mümkün olamamıştır.



Şekil 16. Keloid dokularında U6 probu ile iki farklı akış izlenerek alınan görüntüler. a) Ticari (Exiqon) olarak satın alınan kit ile alınan görüntü b) Laboratuvarda hazırlanan çözeltilerle alınan görüntü.

4.2. Toplanan keloid, hipertrofik skar ve sağlıklı deri dokularından primer fibroblast kültürlerinin kurulması

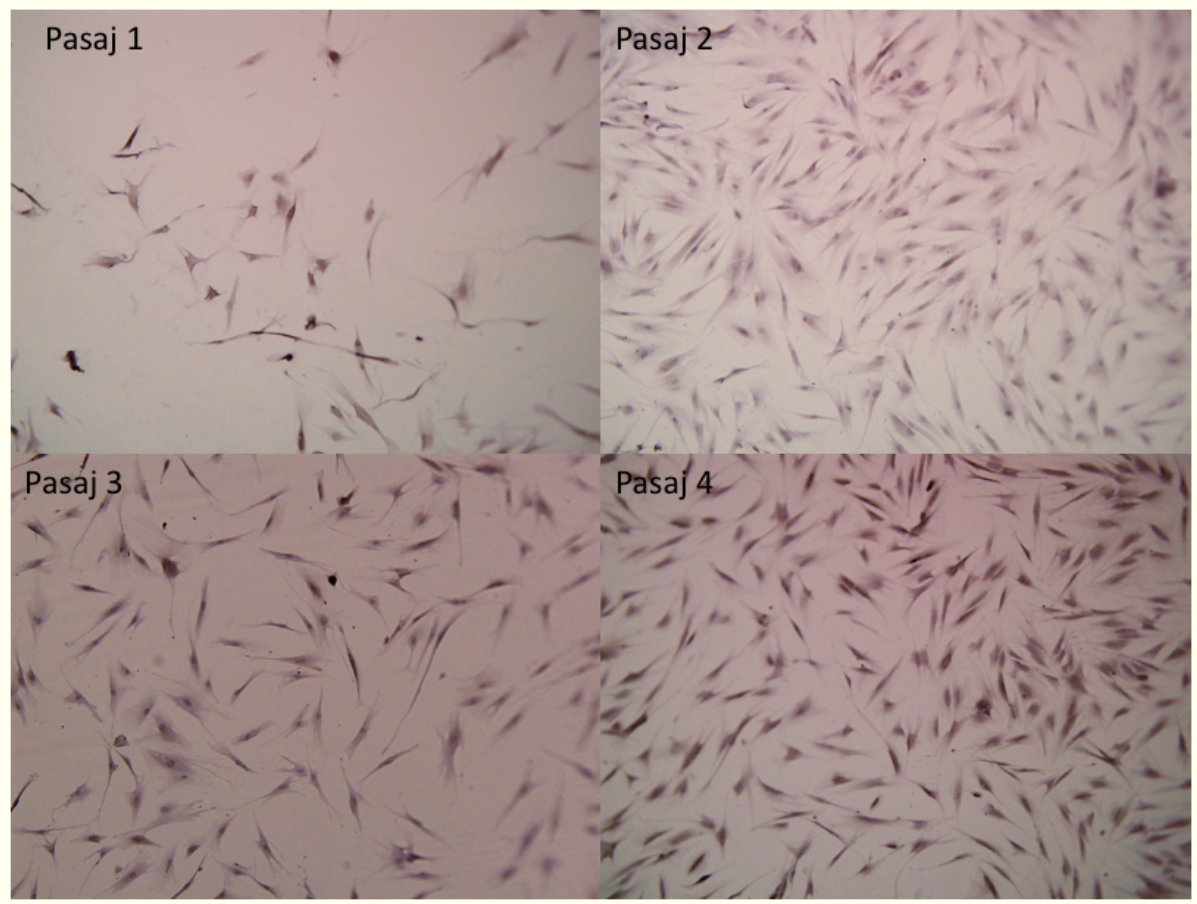
Toplanan ve kültür ortamı içine alınarak ameliyathaneden hızlıca laboratuvara getirilen dokularla explant kültür yöntemi ile elde edilen fibroblast hücrelerinin 14. gündeki görüntüleri Şekil 17’de gösterilmiştir.



Şekil 17. Dokudan ayrılan fibroblastlar (14. Gün): Dokulardan ayrılan fibroblastların 14. günde faz kontrast mikroskobu görüntüleri (20x büyütme)

4.2.1. Primer Fibroblast Hücre Karakterizasyonu için Immünohistokimya ile Belirlenen HSP47 Protein Ekspresyon Bulguları

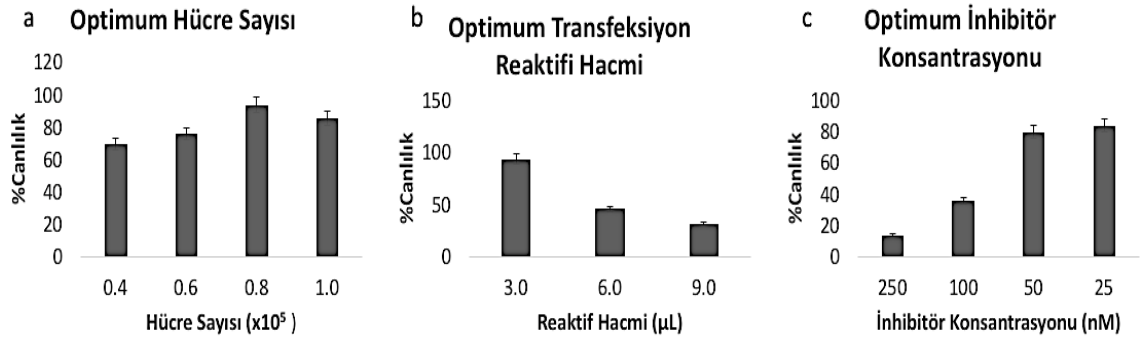
Elde edilen fibroblast kültürlerinin karakterizasyonu için immünohistokimya yöntemi kullanılarak HSP-47 boyaması yapıldı. Boyama sonuçları başarılı bir şekilde primer fibroblast hücresi üretildiğini gösterdi. Morfolojik olarak mekik şeklinde görünmelerinin yanında HSP47'nin kahverengi boyanması ile fibroblastlar karakterize edilmiştir.



Şekil 18. HSP-47 Boyamaları (10x büyütme): İdame edilen kültürlerin fibroblast hücresi olduğunun kanıtlanması için HSP-47 boyaması her bir pasaj için ayrı ayrı yapıldı.

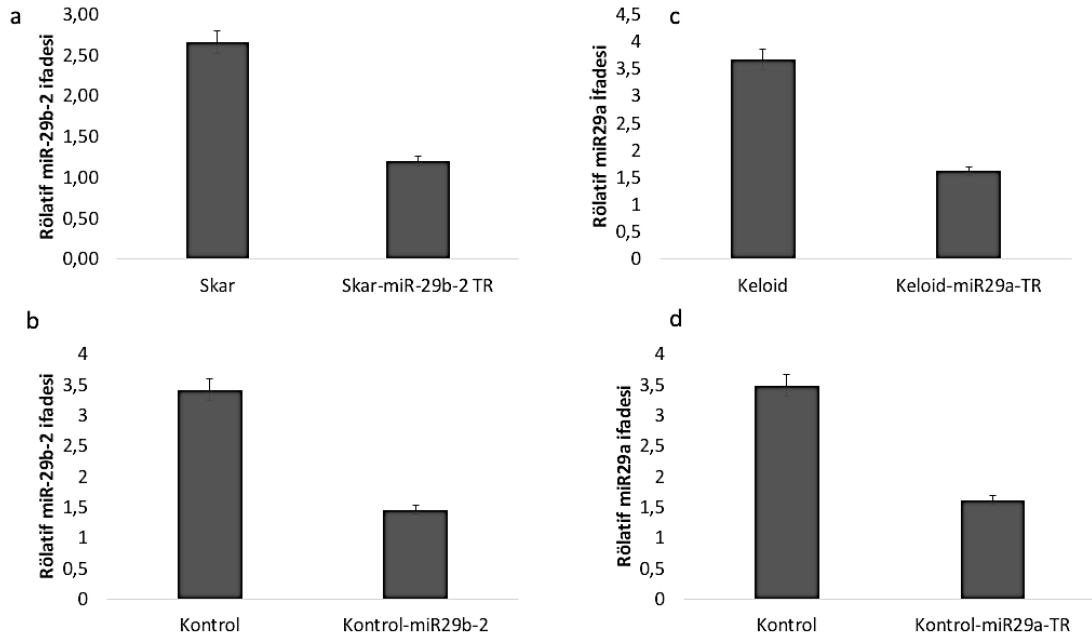
4.3. Primer fibroblast kültürlerinde miR29 ailesi üyelerinin susturulması: Transfeksiyon Bulguları

Dokulardan elde edilen veriler doğrultusunda keloid primer fibroblast hücreleri miR29a ile ve hipertrofik skar primer fibroblast hücreleri miR29b-2 ile sağlıklı deri fibroblastları ise her iki miR29 aile üyesi ile inhibitörler eşliğinde transfekte edilmiştir. Transfeksiyon için gerekli optimizasyon adımlarına ilişkin bulgular ve transfeksiyon sonrası kat değişim değerleri ile ilişkili bulgular Şekil 19 ve Şekil 20’de verilmiştir.



Şekil 19. Transfeksiyon deney koşullarının belirlenmesi için yapılan WST-1 testi % Canlılık Bulguları: a) optimum hücre sayısı; b) optimum transfeksiyon reaktif hacmi; c) optimum inhibitör konsantrasyonu

- WST-1 test bulgularına göre optimum hücre sayısı 8×10^4 olarak belirlendi.
- WST-1 test bulgularına göre optimum transfeksiyon reaktif hacmi $3.0 \mu\text{L}$ olarak belirlendi.
- WST-1 test bulgularına göre optimum inhibitor konsantrasyonu 50-25 nM aralığında belirlendi ve 50 nM olarak kullanıldı.



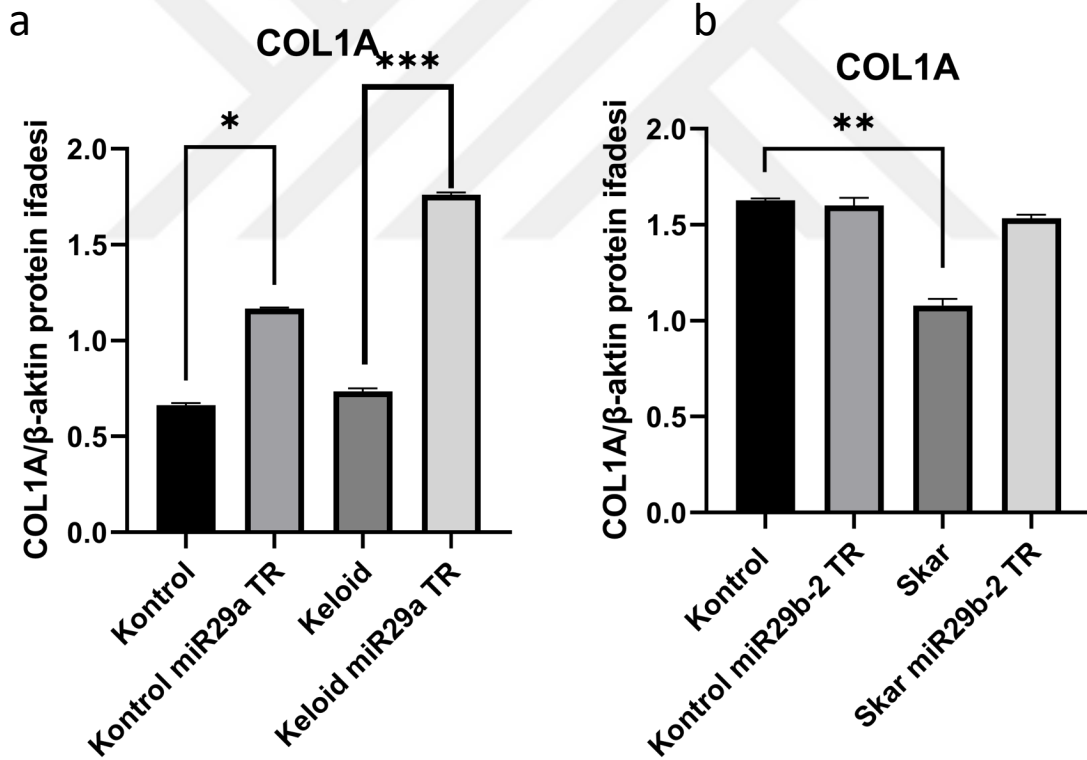
Şekil 20. miR29 inhibitörleri ile yapılan transfeksiyona ilişkin qPCR analizi bulguları (transfeksiyon kontrolü: a) Hipertrofik skar fibroblastlarının miR29b-2 inhibitörü ile transfeksiyonu; b) sağlıklı kontrol fibroblastların miR29b-2 inhibitörü ile transfeksiyonu; c) keloid fibroblastlarının miR29a inhibitörü ile transfeksiyonu; d) sağlıklı kontrol fibroblastların miR29a inhibitörü ile transfeksiyonu

- qPCR analiz bulgularına göre hipertrofik skar fibroblast hücreleri %45 oranında miR29b-2 ile transfekte oldu.
- *qPCR analiz bulgularına göre sağlıklı kontrol fibroblast hücreleri %42 oranında miR29b-2 ile transfekte oldu.*
- qPCR analiz bulgularına göre keloid fibroblast hücreleri %44 oranında miR29a ile transfekte oldu.
- qPCR analiz bulgularına göre sağlıklı kontrol fibroblast hücreleri %46 oranında miR29a ile transfekte oldu.

4.4. Primer fibroblast kültürlerinde miR29 aile üyelerinin susturulması ardından COL1A, COL3A, FİBRONEKTİN, HSP-47 ve LOXL2 protein ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi

4.4.1. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile COL1A Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde kollajen maturasyonunu değerlendirmek için çalışılan COL1A'nın, β -Aktin ile oranlanmasıyla semi-kantitatif olarak belirlenen protein ekspresyonlarına ilişkin dansitometrik analiz bulguları Şekil 21'de gösterilmiştir.

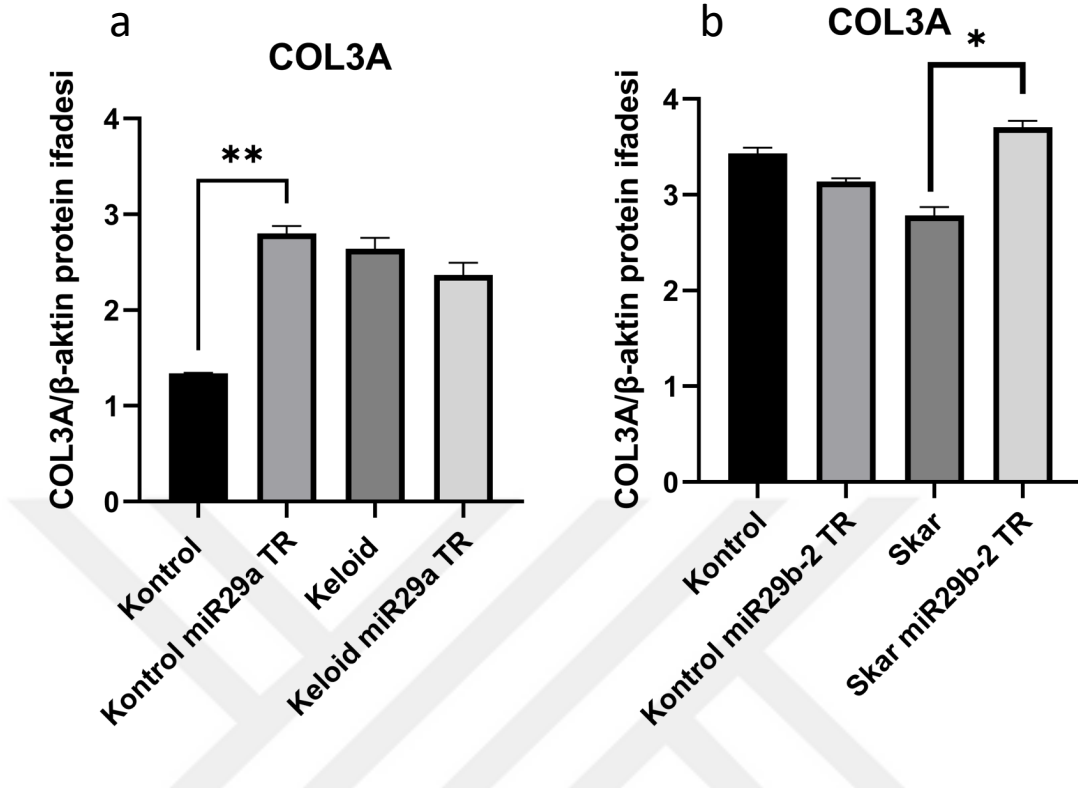


Şekil 21. Tüm deney setlerinde COL1A Protein Dansitometrik Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile COL1A/β-aktin oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile COL1A/β-aktin oranları

- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla COL1A protein düzeyinde anlamlı artma olduğu gösterildi (p:0.0192).
- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla COL1A protein düzeyinde anlamlı artma olduğu gösterildi (p:0.0264).
- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla COL1A protein düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- Western Blotting analiz bulgularına göre hipertrofik skar fibroblast hücreleri ile sağlıklı kontrol fibroblast hücreleri COL1A protein seviyeleri arasında anlamlı fark bulundu (p:0.0054).

4.4.2. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile COL3A Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde kollajen maturasyonunu değerlendirmek için çalışılan COL3A'nın, β -Aktin ile oranlanmasıyla semi-kantitatif olarak belirlenen protein ekspresyonlarına ilişkin dansitometrik analiz bulguları Şekil 22'de gösterilmiştir.



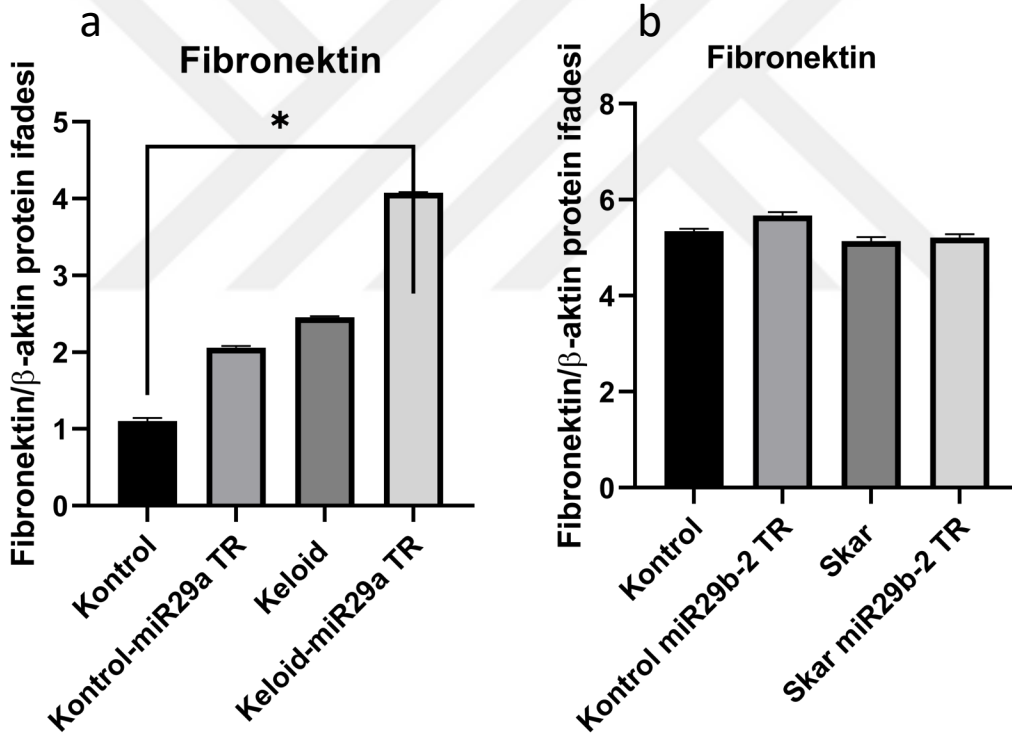
Şekil 22. Tüm deney setlerinde COL3A Protein Dansitometrik Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile COL3A/ β -aktin oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile COL3A/ β -aktin oranları

- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla COL3A protein düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla COL3A protein düzeyinde anlamlı artma olduğu gösterildi (p:0.0033)
- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla COL3A protein düzeyinde anlamlı artma olduğu gösterildi (p:0.0011).

- Western Blotting analiz bulgularına göre hipertrofik skar fibroblast hücreleri ile sağlıklı kontrol fibroblast hücreleri COL3A protein seviyeleri arasında anlamlı fark saptanmadı.

4.4.3. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile FİBRONEKTİN Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde kollajen maturasyonunu değerlendirmek için çalışılan Fibronektin'in, β -Aktin ile oranlanmasıyla semi-kantitatif olarak belirlenen protein ekspresyonlarına ilişkin dansitometrik analiz bulguları Şekil 23'te gösterilmiştir.



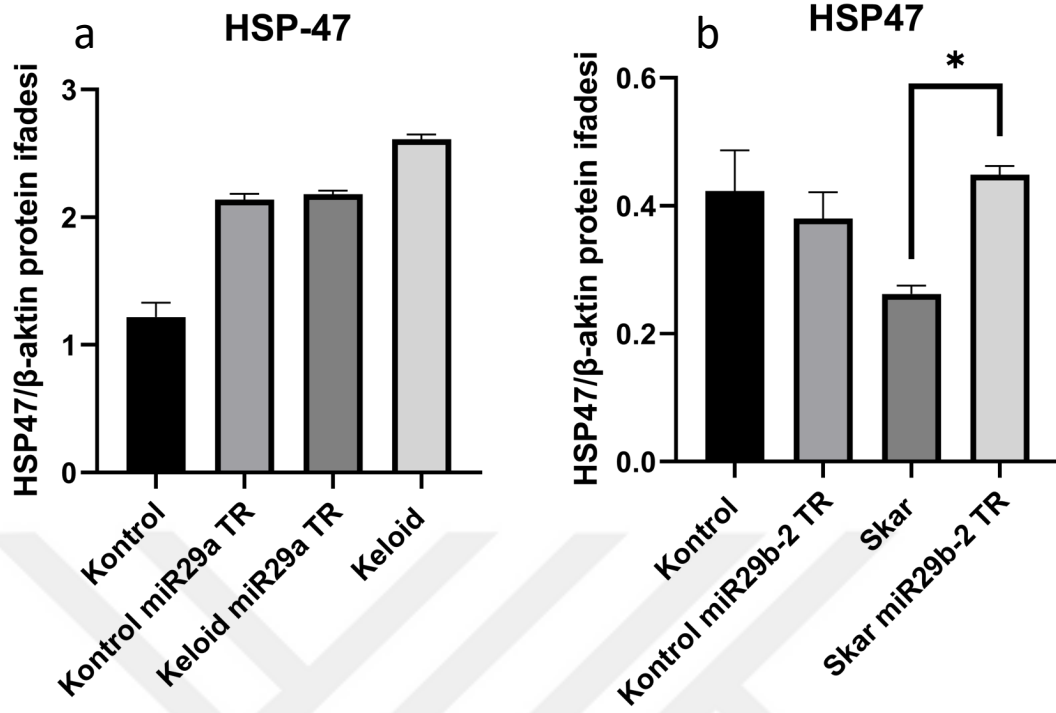
Şekil 23. Tüm deney setlerinde Fibronektin Protein Dansitometrik Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile Fibronektin/ β -aktin oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile Fibronektin/ β -aktin oranları

- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfeke edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla fibronektin protein düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla fibronektin protein düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- Western Blotting analiz bulgularına göre kontrol fibroblast hücreleri ile keloid fibroblast hücreleri kıyaslandığında fibronektin protein düzeyinde anlamlı artma belirlendi (p:0.0223).
- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla fibronektin protein düzeyinde anlamlı değişiklik gözlenmedi.

4.4.4. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile HSP47 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde kollajen maturasyonunu değerlendirmek için çalışılan HSP47'nin, β -Aktin ile oranlanmasıyla semi-kantitatif olarak belirlenen protein ekspresyonlarına ilişkin dansitometrik analiz bulguları Şekil 24'te gösterilmiştir.

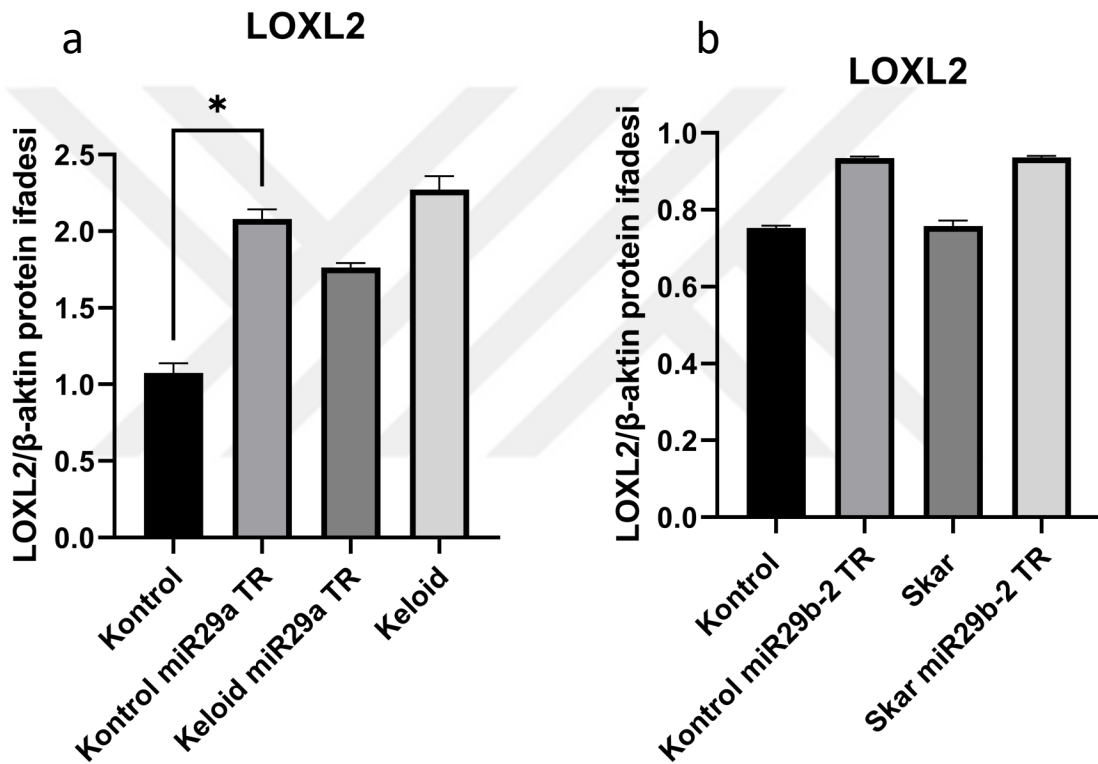


Şekil 24. Tüm deney setlerinde HSP47 Protein Dansitometrik Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile HSP47/β-aktin oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile HSP47/β-aktin oranları

- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla HSP47 protein düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla HSP47 protein düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- Western Blotting analiz bulgularına göre kontrol fibroblast hücreleri ile keloid fibroblast hücreleri kıyaslandığında HSP47 protein düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla HSP47 protein düzeyinde (artış yönünde) anlamlı fark belirlendi (p:0.0426).

4.4.5. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile LOXL2 Protein Ekspresyonlarının Western Blot ile Değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde kollajen maturasyonunu değerlendirmek için çalışılan LOXL2'nin, β -Aktin ile oranlanmasıyla semi-kantitatif olarak belirlenen protein ekspresyonlarına ilişkin dansitometrik analiz bulguları Şekil 25'te gösterilmiştir.

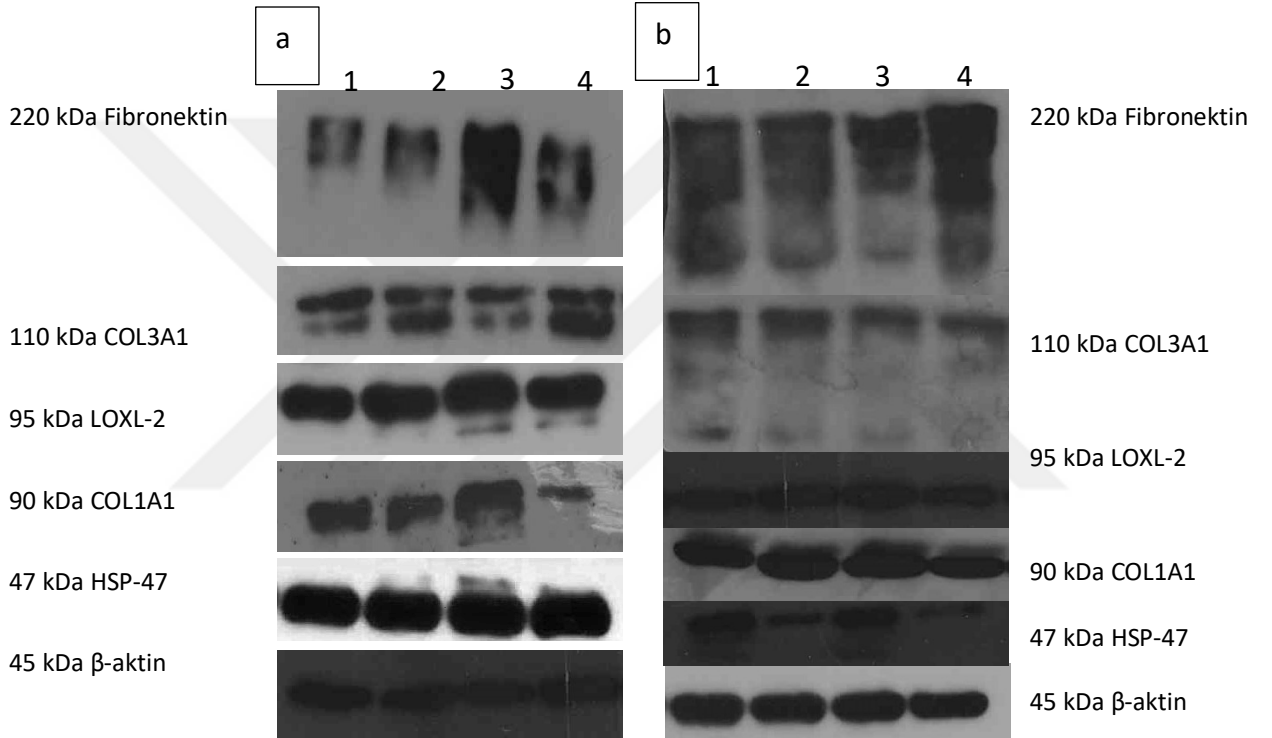


Şekil 25. Tüm deney setlerinde LOXL2 Protein Dansitometrik Analiz Bulguları a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile LOXL2/ β -aktin oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile LOXL2/ β -aktin oranları

- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfeke edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla LOXL2 protein düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfeke edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla LOXL2 protein düzeyinde anlamlı artış saptandı (p:0.028).
- Western Blotting analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfeke edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla LOXL2 protein düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

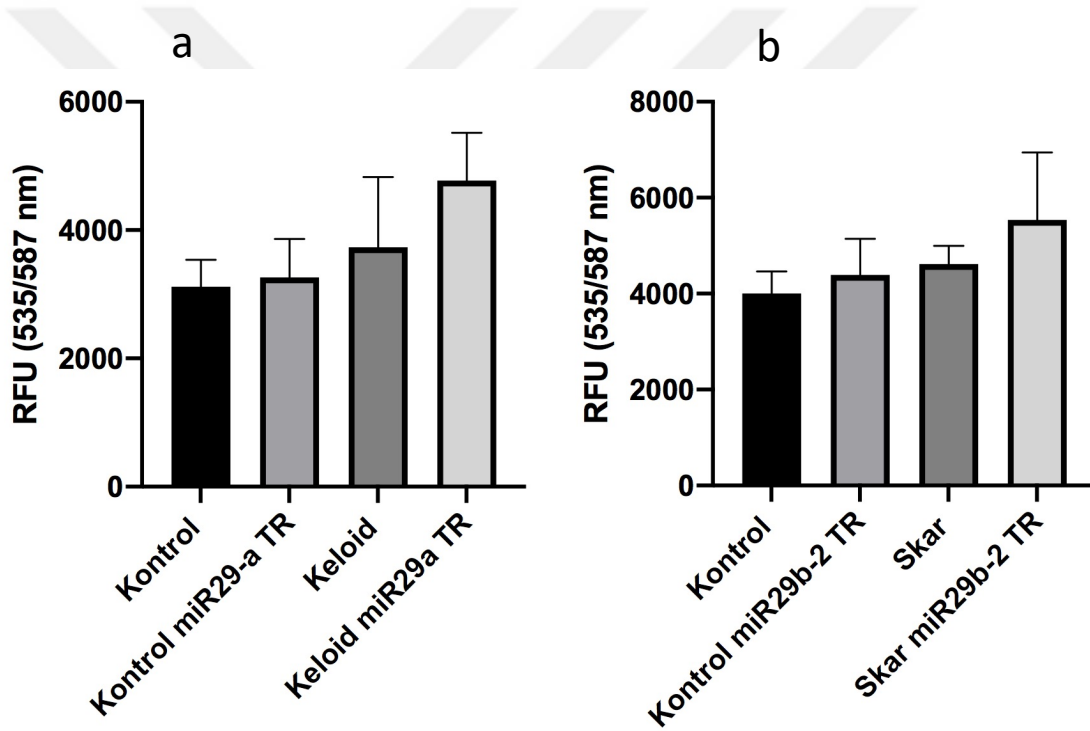
Tüm deney gruplarına ait temsili film görüntüleri Şekil 26'da verilmiştir.



Şekil 26. Tüm deney gruplarında Western Blot Yöntemi ile Elde Edilen Fibronektin, COL1A, COL3A, HSP47, LOXL2 Protein Bant Görüntüleri. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile elde edilen bant görüntüleri (1:kontrol, 2:kontrol-miR29a TR, 3:keloid miR29a TR, 4:keloid) b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile elde edilen bant görüntüleri (1:kontrol, 2:kontrol-miR29b-2 TR, 3:skar miR29b-2 TR, 4:skar)

4.5. Primer fibroblast kültürlerinde miR29 aile üyelerinin susturulması ardından ekstraselüler LOX enzim aktivitesinin fluorometrik olarak değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücre süpernatantlarında ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücre süpernatantlarında kollajen maturasyonunu değerlendirmek için çalışılan bir diğer parametre olan LOX enzim aktivitesinin fluorometrik olarak belirlenmesine ilişkin rölatif floresan birimi düzeyleri Şekil 27’da gösterilmiştir.



Şekil 27. Tümm deney setlerinde ekstraselüler LOX Enzim Aktivitesi Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast süpernatantlarında miR29a baskılanması ile ekstraselüler LOX enzim aktivitesi b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile ekstraselüler LOX enzim aktivitesi

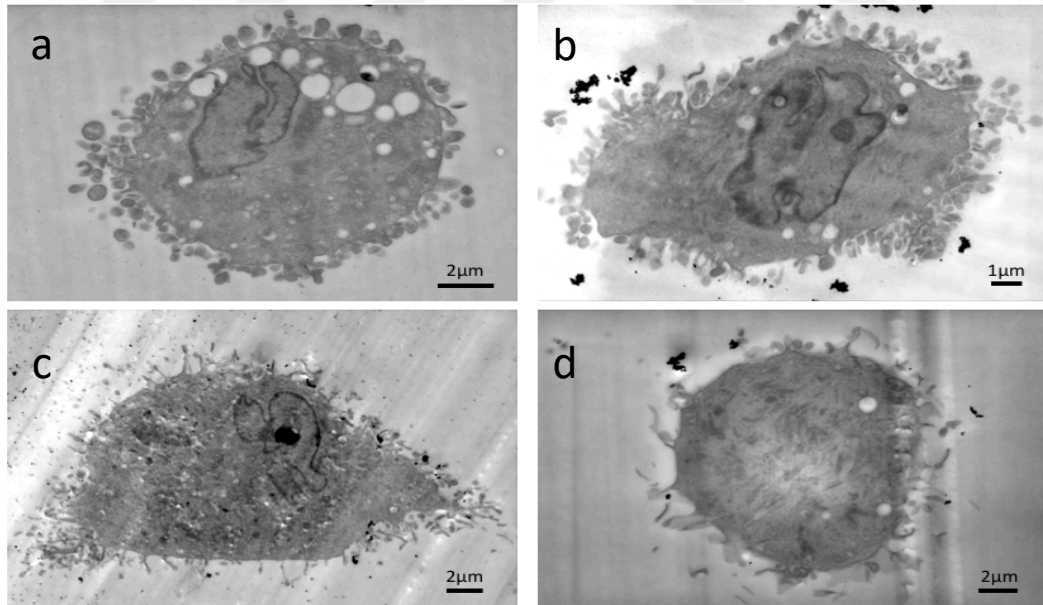
- Fluorometrik olarak çalışılan ekstraselüler LOX enzim aktivitesi analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde

transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla LOX enzim aktivitesi artmasına rağmen anlamlı bir fark saptanmadı.

- Fluorometrik olarak çalışılan ekstraselüler LOX enzim aktivitesi analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla LOX enzim aktivitesi artmasına rağmen anlamlı bir fark saptanmadı.
- Benzer sonuçlar her iki hücrenin kontrol fibroblastlarında da gözlemlendi.

4.6. Primer fibroblast kültürlerinde miR29 aile üyelerinin susturulması ardından fibril oluşumunun elektron mikroskopik olarak değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde fibril oluşumunun değerlendirilmesi için yapılan geçirimli elektron mikroskobu görüntülemelerine ilişkin bulgular Şekil 28'de gösterilmiştir.



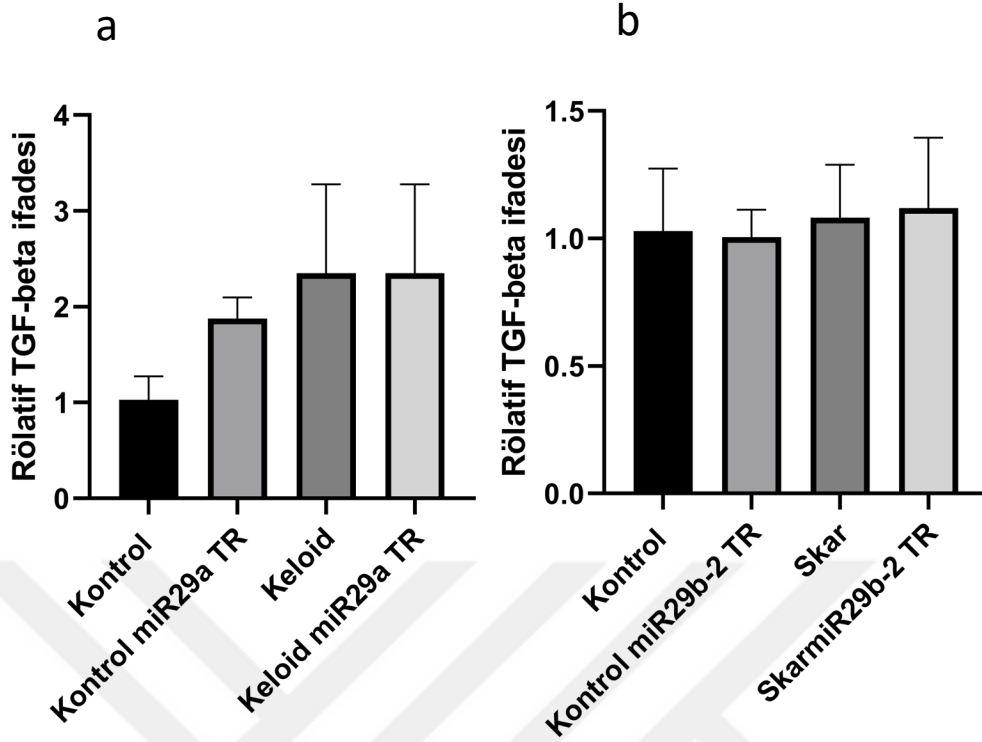
Şekil 28. Keloid ve hipertrofik skar deney setlerinde ekstraselüler fibril oluşumunun değerlendirilmesi. a) miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerindeki geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü b) keloid fibroblast hücrelerindeki geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü c) miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerindeki geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü d) hipertrofik skar fibroblast hücrelerindeki geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü

- Geçirimli elektron mikroskopisi ile elde edilen görüntüler fibril oluşumunun değerlendirilmesi için yeterli hücre sayısına sahip olunmadığını gösterdi.
- Buna karşın miR29 baskılamalarının hücrelerde yapısal kalınlaşma başlattığı gözlemlendi.

4.7. Primer fibroblast kültürlerinde miR29 aile üyelerinin susturulması ardından TGF- β , Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, CTGF ve TIMP-1 gen ekspresyonlarının qPCR ile değerlendirilmesi

4.4.1. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile TGF- β Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ekstraselüler matriks sentezini değerlendirmek için çalışılan TGF- β 'nın, GAPDH ile oranlanmasıyla göreceli olarak belirlenen gen ekspresyonlarına ilişkin analiz bulguları Şekil 29'de gösterilmiştir.

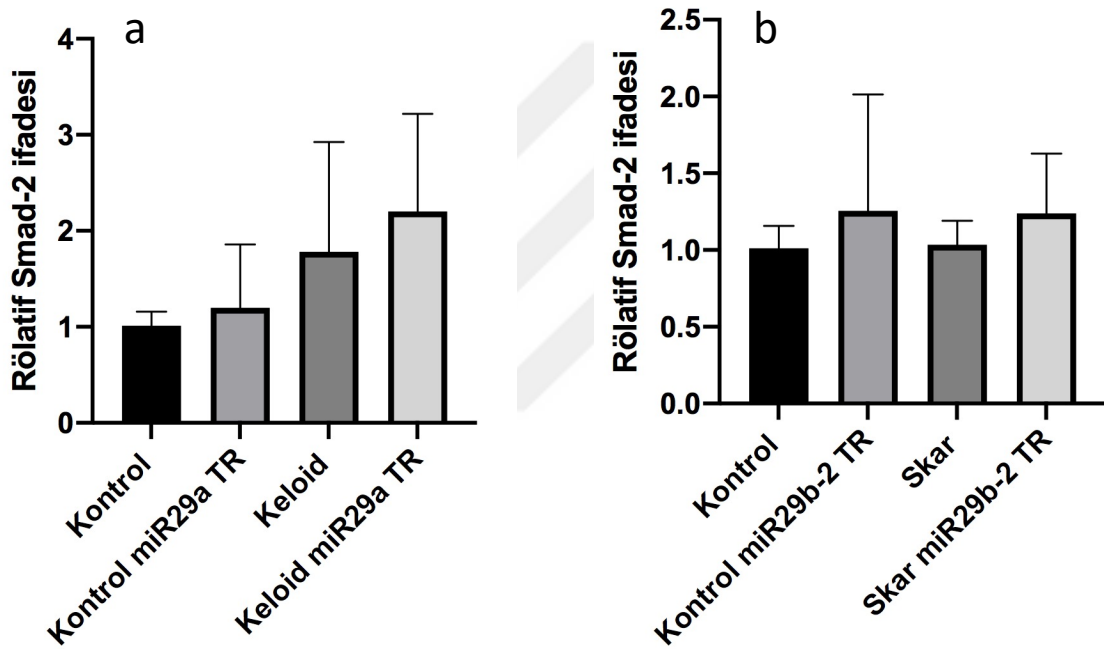


Şekil 29. Tüm deney setlerinde TGF- β Gen Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile TGF- β /GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile TGF- β /GAPDH oranları

- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla TGF- β gen düzeyinde artma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla TGF- β gen düzeyinde artma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla TGF- β gen düzeyinde artma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

4.4.2. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile Smad2 Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ekstraselüler matriks sentezini değerlendirmek için çalışılan Smad2'nin, GAPDH ile oranlanmasıyla göreceli olarak belirlenen gen ekspresyonlarına ilişkin analiz bulguları Şekil 30'da gösterilmiştir.



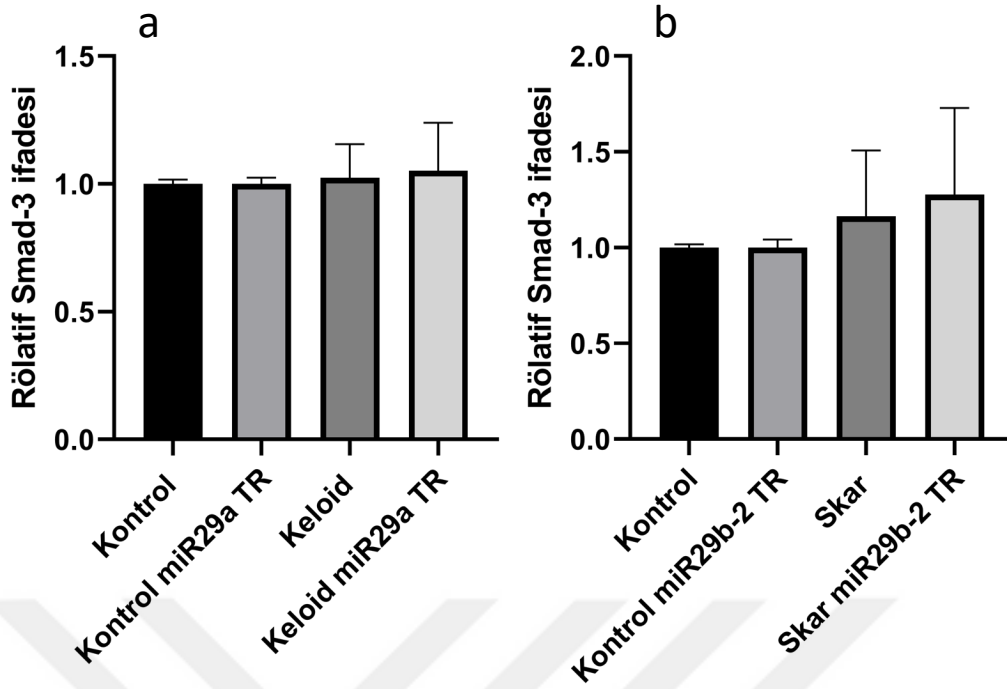
Şekil 30. Tüm deney setlerinde Smad2 Gen Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile Smad2/GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile Smad2/GAPDH oranları

- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla Smad2 gen düzeyinde artma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla Smad2 gen düzeyinde artma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

- qPCR analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla Smad2 gen düzeyinde artma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla Smad2 gen düzeyinde artma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

4.4.3. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile Smad3 Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ekstraselüler matriks sentezini değerlendirmek için çalışılan Smad3'ün, GAPDH ile oranlanmasıyla göreceli olarak belirlenen gen ekspresyonlarına ilişkin analiz bulguları Şekil 31'de gösterilmiştir.

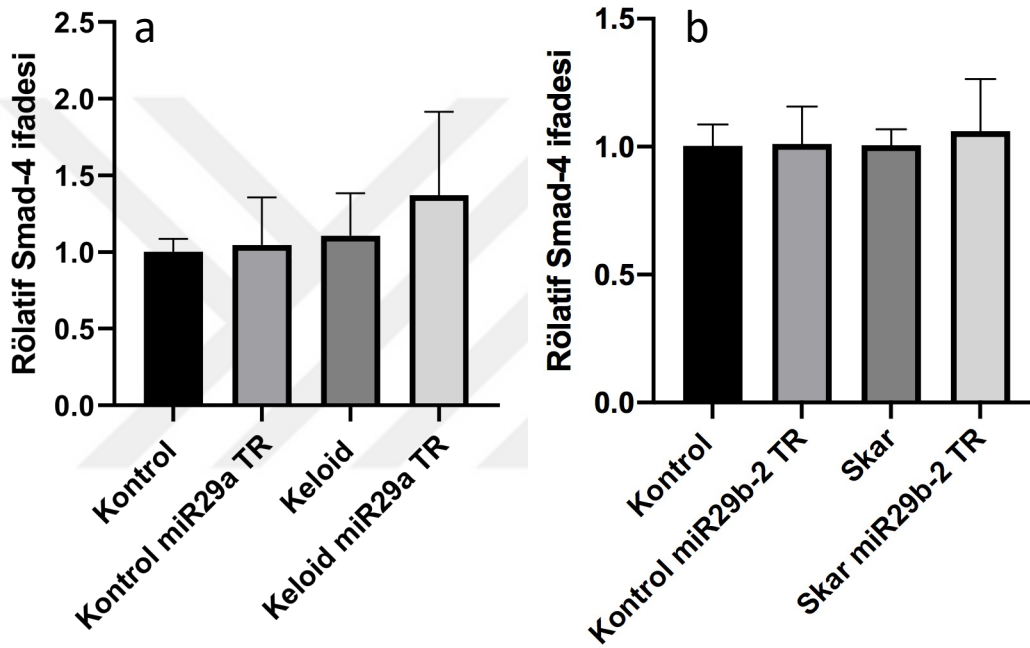


Şekil 31. Tüm deney setlerinde Smad3 Gen Analiz Bulguları. a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile Smad3/GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile Smad3/GAPDH oranları

- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla Smad3 gen düzeyinde artma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla Smad3 gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla Smad3 gen düzeyinde artma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla Smad3 gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

4.4.4. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile Smad4 Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ekstraselüler matriks sentezini değerlendirmek için çalışılan Smad4'ün, GAPDH ile oranlanmasıyla göreceli olarak belirlenen gen ekspresyonlarına ilişkin analiz bulguları Şekil 32'de gösterilmiştir.



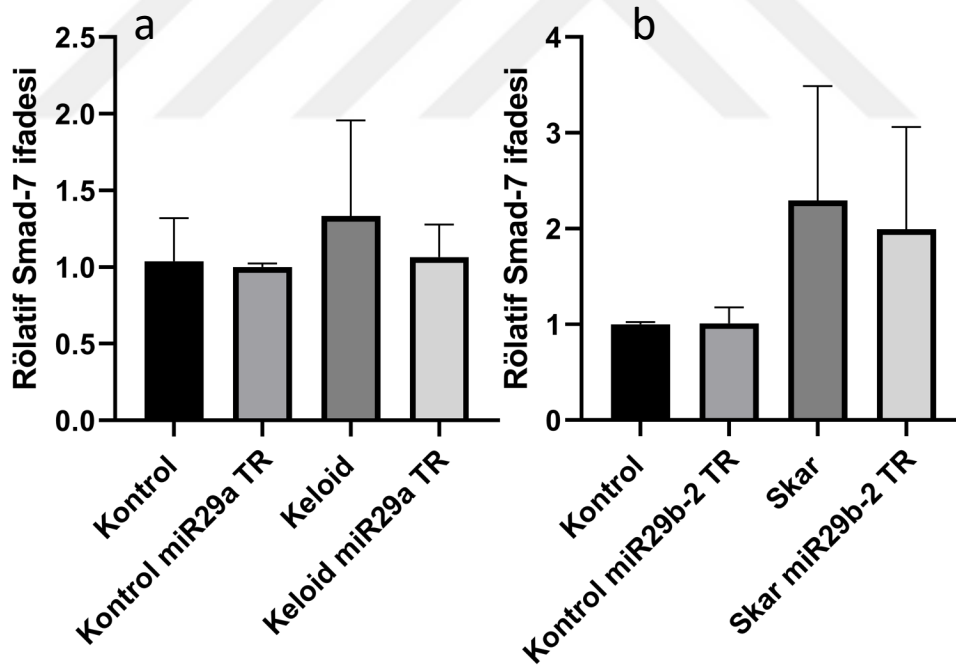
Şekil 32. Tüm deney setlerinde Smad4 Gen Analiz Bulguları.a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile Smad4/GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile Smad4/GAPDH oranları

- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla Smad4 gen düzeyinde artma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla Smad4 gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

- qPCR analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla Smad4 gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla Smad4 gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

4.4.5. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile Smad7 Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ekstraselüler matris sentezini değerlendirmek için çalışılan Smad7'nin, GAPDH ile oranlanmasıyla göreceli olarak belirlenen gen ekspresyonlarına ilişkin analiz bulguları Şekil 33'te gösterilmiştir.

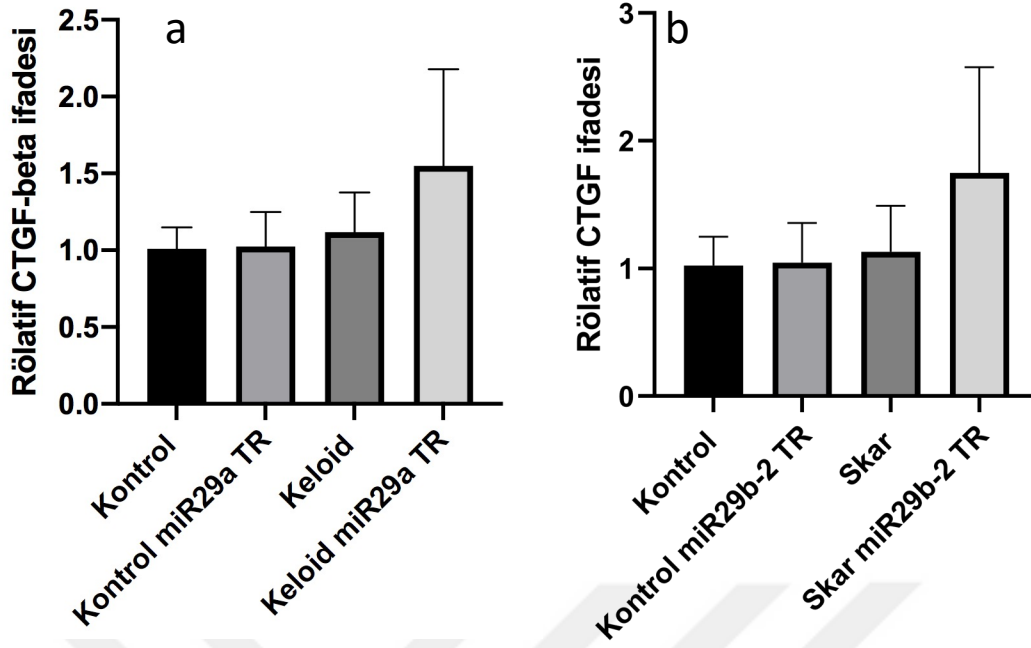


Şekil 33. Tüm deney setlerinde Smad7 Gen Analiz Bulguları.a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile Smad7/GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile Smad7/GAPDH oranları

- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla Smad7 gen düzeyinde azalma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla Smad7 gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla Smad7 gen düzeyinde azalma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla Smad7 gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

4.4.6. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile CTGF Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ekstraselüler matriks sentezini değerlendirmek için çalışılan CTGF'nin, GAPDH ile oranlanmasıyla göreceli olarak belirlenen gen ekspresyonlarına ilişkin analiz bulguları Şekil 34'te gösterilmiştir.

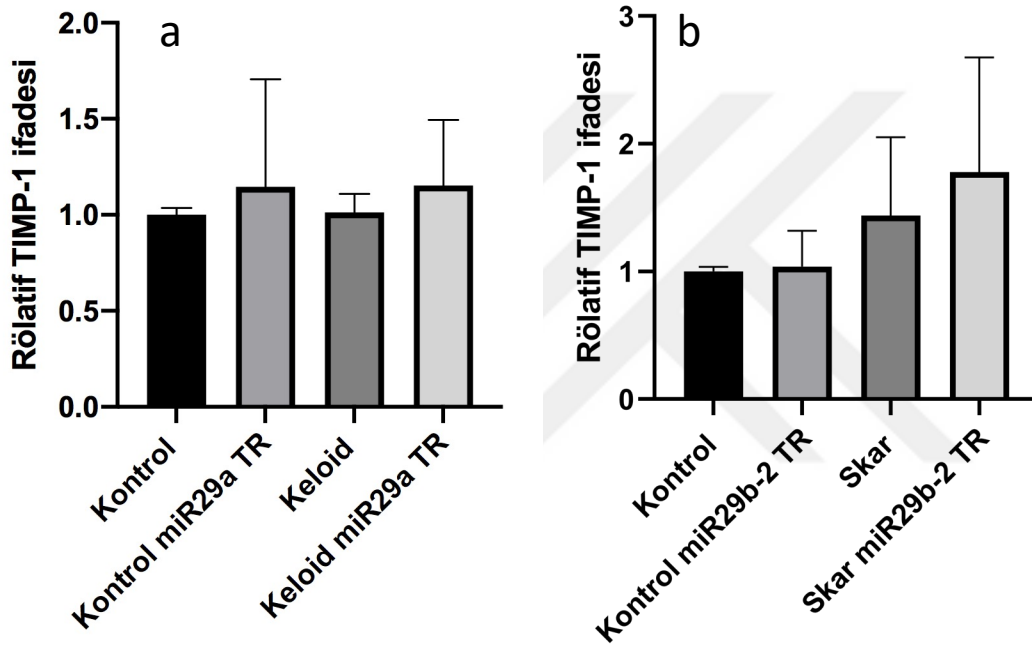


Şekil 34. Tüm deney setlerinde CTGF Gen Analiz Bulguları.a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile CTGF/GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile CTGF/GAPDH oranları

- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla CTGF gen düzeyinde artma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla CTGF gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla CTGF gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla CTGF gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

4.4.7. Kontrol, Keloid ve Hipertrofik Skar Deney Gruplarında miR29 baskılanması ile TIMP-1 Gen Ekspresyonlarının qPCR ile Değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ekstraselüler matriks sentezini değerlendirmek için çalışılan TIMP-1'in, GAPDH ile oranlanmasıyla göreceli olarak belirlenen gen ekspresyonlarına ilişkin analiz bulguları Şekil 35'te gösterilmiştir.



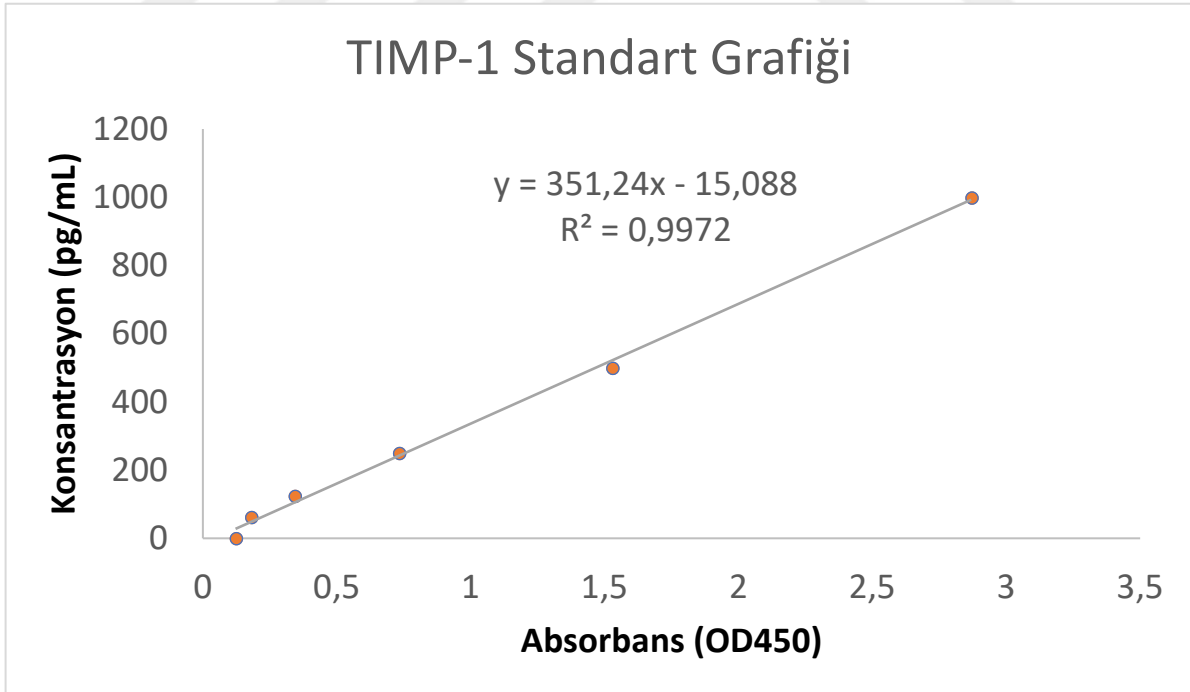
Şekil 35. Tüm deney setlerinde TIMP-1 Gen Analiz Bulguları.a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile TIMP-1 /GAPDH oranları b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile TIMP-1 /GAPDH oranları

- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla TIMP-1 gen düzeyinde artma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla TIMP-1 gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

- qPCR analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla TIMP-1 gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- qPCR analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla TIMP-1 gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

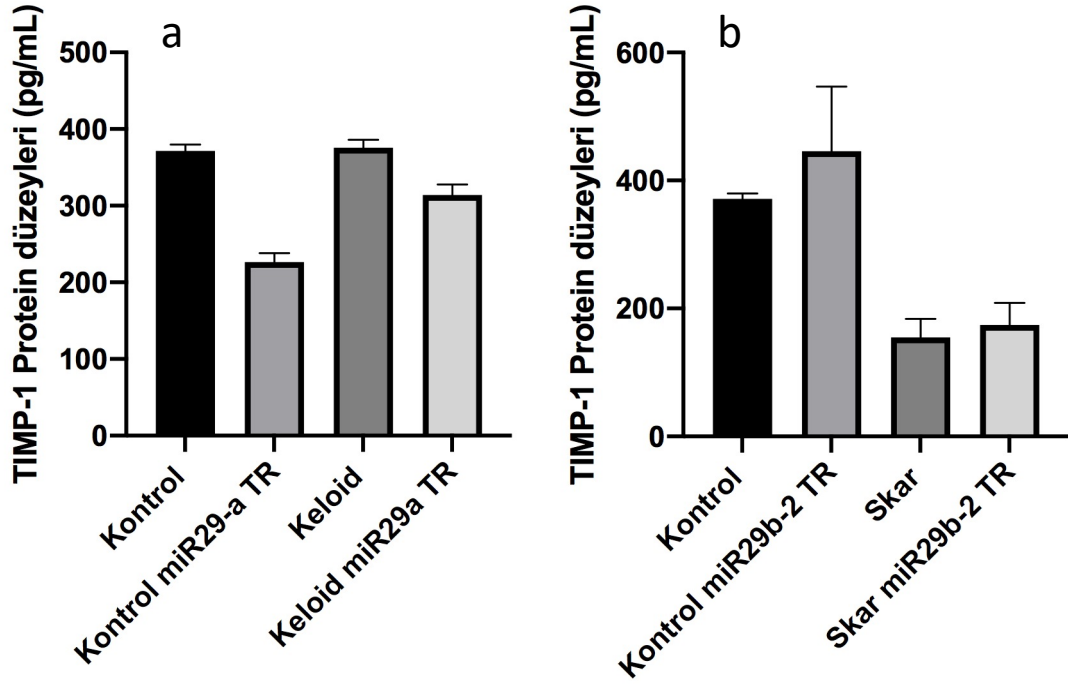
4.8. Primer fibroblast kültürlerinde miR29 aile üyelerinin susturulması ardından ve TIMP-1 protein ekspresyonunun ELISA ile değerlendirilmesi

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ekstraselüler matriks degradasyonunu değerlendirmek için çalışılan TIMP-1'in protein ekspresyonuna ilişkin ELISA analiz bulgularını değerlendirmek için kullanılan TIMP-1 Standart grafiği Şekil 35'de verilmiştir.



Şekil 36. TIMP-1 Standart Kalibrasyon Grafiği:Standart çözeltiler: 2000;1000;500;250;125;62.5 pg/mL

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ekstraselüler matriks degradasyonunu değerlendirmek için çalışılan TIMP-1'in protein ekspresyonuna ilişkin ELISA analiz bulguları Şekil 36'da verilmiştir.



Şekil 37. Tüm deney setlerinde TIMP-1 Protein Analiz Bulguları.a) Keloid ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29a baskılanması ile TIMP-1 protein düzeyleri b) Hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblastlarında miR29b-2 baskılanması ile TIMP-1 protein düzeyleri

- ELISA analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla TIMP-1 protein düzeyinde azalma gözlenmesine rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- ELISA analiz bulgularına göre miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla TIMP-1 protein düzeyinde azalma gözlenmesine rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

- ELISA analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfeke edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla TIMP-1 protein düzeyinde artma gözlenmesine rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.
- ELISA analiz bulgularına göre miR29b-2 baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfeke edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla TIMP-1 protein düzeyinde artma gözlenmesine rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

4.9. Primer fibroblast kültürlerinde miR29 aile üyelerinin susturulması ardından tüm parametrelerdeki değişikliklerin korelasyon analizleri

miR29a baskılanması sonucu keloid ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde ve miR29b-2 baskılanması sonucu hipertrofik skar ve sağlıklı kontrol fibroblast hücrelerinde kollajen maturasyonu, ekstraselüler matriks sentezi ve degradasyonu ile ilişkili parametrelere ilişkin korelasyon analizleri Tablo 27 ve Tablo 28'de verilmiştir.

Tablo 27. Keloid Fibroblast Hücrelerinde Baskılanmış miR29a ile korele parametreler

Fibronectin protein	r: -0.63; p:0.31
COL3A protein	r: -0.4; p: 0.75
HSP47 protein	r: -0.9; p: 0.08
LOXL2 protein	r: -0.2; p:0.9
Smad4 gen	r: -0.9; p: 0.33

Keloid fibroblastlarında azalmış miR-29a düzeylerinin artmış fibronectin, COL3A, HSP47 ve LOXL2 protein düzeyleri ve Smad4 gen düzeyi ile korele olduğu ancak bu korelasyonların anlamlı olmadığı saptandı.

Tablo 28. Hipertrofik Skar Fibroblast Hücrelerinde Baskılanmış miR29b-2 ile korele parametreler

LOX Aktivitesi	r: -0.5; p:0.9
TIMP-1 Protein	r: -0.5; p: 0.9
Smad4 gen	r:-0.8; p: 0.33

Hipertrofik skar fibroblastlarında azalmış miR-29b-2 düzeylerinin artmış LOX aktivitesi, TIMP-1 protein düzeyleri ve Smad4 gen düzeyi ile korele olduğu ancak bu korelasyonların anlamlı olmadığı saptandı.



5. TARTIŞMA

Skar oluşumu, çoklu hücre sinyal yollarını ve sitokin gibi farklı birçok biyomolekülü içeren karmaşık bir biyolojik süreçtir. Bu süreçlerde oluşan aksamalar fibrozis ile sonuçlanabilir (121,122). Derideki fibrotik skarlar fibroproliferatif skarlar olarak adlandırılır (123). Bunlar keloid ve hipertrofik skarlardır (9,123).

Keloidler ve hipertrofik skarlar, cilt yaralanmasından sonra aşırı yara iyileşmesinin neden olduğu hiperplastik hastalıklardır (50). Keloidlerin klinik belirtileri, orijinal yaranın sınırını aşan ve bitişik dokuları işgal eden yara dokusunun aşırı büyümesini ve basit cerrahi tedaviden sonra nüksleri içerir. Hipertrofik skarlarda ise doku yara sınırları içinde büyümeye devam eder. Keloidlerin oluşumu ve gelişimi hipertrofik skarlara benzerdir (81). Öte yandan, keloidler, normal dokudaki patolojik değişikliklere dayanan ve orijinal sınırın dışında çoğalan tümör benzeri proliferasyonlar olarak, yani iyi huylu tümörler olarak da tanımlanır. Hem keloid hem de hipertrofik skarlar, fibroblast proliferasyonu ve aşırı ESM birikimi ile karakterizedir. Bu nedenle, keloidleri ve hipertrofik skarlara erken aşamada tespit etmek zordur ve bu genellikle optimal tedavi süresinin kaybına yol açar (12). Her iki patolojik durumun mekanizması da henüz aydınlatılamadığından, fibroproliferatif skarların oluşum mekanizması üzerine daha fazla çalışma, bunların etiyojisi, ayırıcı tanısı ve tedavisi için uygun bir temel sağlayabilir. Histopatolojik olarak incelendiğinde keloidlerin aşırı ve düzensiz fibroblast proliferasyonu ile karakterize edildiği, aşırı kollajen I ve kollajen III birikimi, düzensiz lif düzenlemesi ve normal hücre popülasyonunda bir kayıp olduğu gösterilmiştir. Hipertrofik skarlarda ise birikim olmasına rağmen düzensizlik yoktur (46,47). Bunların yanında, epigenetik değişikliklerin de fibrotik hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (124). miRNA'lar, sağlık ve hastalık durumlarında gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenleyicileridir ve deregülasyonları fibrotik deri hastalıklarında rol oynamaktadır. Bugüne kadar, miR21, miR-206, miR-23, miR-145, miR-17, miR-133 ve miR-92 özellikle TGF- β /Smad sinyal yolağı üzerinden deri fibrozu ile ilişkilendirilmiştir (16,94,96,98,107,125). Son yıllarda bu miRNA'ların arasına miR29 ailesi de eklenmiştir. miR29 ailesinin hedef molekülleri çoğunlukla kollajenler olmakla birlikte diğer ESM proteinleri de olabilmektedir (20,93). Fibrozisin

aşırı kollajen birikimi ile karakterize olduğu düşünüldüğünde miR29'un fibrotik hastalıklarda önemli bir yeri olduğu söylenebilir.

Bu çalışma, fibroproliferatif skarlarda miR29 ailesinin olası antifibrotik etkinliğinin kollajen maturasyonu ve ESM sentezi üzerinden incelendiği en kapsamlı ilk araştırmadır. Bu araştırma ile miR29'un keloid ve hipertrofik skarlarda normalden daha az ifade edildiği, yani bu hastalıkların patolojilerinde miR29'un azlığının fibrotik etkisi olabileceği gösterilmiştir. miR29a'nın baskılanması ile keloidlerde fibronektin, COL1A ve LOXL2 protein düzeyleri ile LOX aktivitesinin de arttığı gösterilmiştir. Bu parametreler, miR29a'nın kollajen sentez basamaklarını etkilediğini ve kollajen sentezini artırdığını kanıtlamaktadır. Bir diğer taraftan keloidlerde miR29a baskılanması TGF- β /Smad yolak aktivitesini de artırmıştır. Bu aktivitenin artması ile TIMP-1 gen düzeylerinde de artma gözlenmiş ancak bu artma ekstraselüler TIMP-1 protein düzeyine yansımamıştır. Bu da miR29a'nın TGF- β 'yı etkilediğini, TGF- β 'nın TIMP-1'i uyardığını ancak bu uyarının TIMP-1'in protein düzeyine yansımaya keloid histopatolojisindeki düzensizliğin bir sebebi olabileceğini gösterebilir. Hipertrofik skarlarda miR29b-2 baskılanması ise HSP47, LOXL2 ve COL1A protein ve LOX enzim aktivitesi artışına neden olmuştur. Bu parametrelerdeki artış hipertrofik skarlardaki kollajen sentezinin artışının miR29b-2 ile ilişkili olduğunun doğrudan göstergesidir. Keloidlerle benzer şekilde hipertrofik skarlarda miR29 baskılanması TGF- β /Smad yolak aktivitesini de artırmıştır. Bu aktivitenin artması ile TIMP-1 gen ve protein düzeylerinde de artma gözlenmiştir. Bu da miR29b-2'nin TGF- β 'ı etkilediğini, TGF- β 'nın TIMP-1'i uyardığını ve bu uyarının TIMP-1'in protein düzeyine yansımaya bu fibrotik sürecin ESM sentez artışının bu nedenle olabileceğini gösterebilir. Sonuçlarımız, miR29'un baskılanmasının keloid ve hipertrofik skarlarda aşırı kollajen üretimini artırarak fibrotik etki gösterdiğini kanıtlamıştır. Bu fibrotik etkinliğin TGF- β /Smad yolak aktivitesiyle ilişkili olduğu ortaya konmuştur.

Bu bağlamda literatür incelendiğinde Zhang ve arkadaşları (126) tüm miR-29 aile üyelerinin keloid fibroblastlarda ve taze deri biyopsi örneklerinde (ameliyattan 24-48 saat sonra elde edilen) ifade edildiğini ve özellikle miR-29a'nın keloid fibroblastlarda daha düşük oranda ifade edildiğini belirledi. Başka bir çalışmada, Liu ve arkadaşları (91) keloid doku ve normal deri dokusu örnekleri arasında karşılaştırmalı miRNA profili oluşturmak için mikro dizi analizi kullandı. Araştırmacılar, 23'ü keloid doku örneklerinde upregüle edilmiş 32 farklı miRNA tanımladı. Özellikle

miR-21 en fazla upregüle edilmiş miRNA iken, miR-203 en fazla downregüle edilmiş olundu. Bu çalışmada miR-29 aile üyelerinin hiçbirisi tespit edilmedi. Bu gözlem için en olası açıklama, bazı miRNA'ları tespit edemeyen ve dışlayan ifade analizidir (91). Mikro dizi analizi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi kadar duyarlı olmadığından bazı miRNA'ları tespit edememiş olabilir. Bizim çalışmamızda Zhang ve arkadaşlarının (126) çalışması ile uyumlu olarak keloid dokusunda miR-29a ifadesinin sağlıklı deri dokusu ile kıyaslandığında daha az olduğu bulundu.

Bi ve arkadaşları (33) hipertrofik skar dokularında miR29'un sağlıklı dokuya kıyasla daha az eksprese olduğunu göstermiştir. Ning ve arkadaşları (127) da skar dokularında miR29b-1 ifadesinin normal dokuya kıyasla düşük olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda da hipertrofik skarlarda normal dokuya kıyasla miR29b-2 ekspresyonunun düşük olduğu bulunmuştur. Hem keloid hem de hipertrofik skar dokularına ilişkin bulgularımız literatür ile uyumludur.

Yalnızca deri değil farklı fibrotik dokularda da miR29 aile üyelerinin ekspresyonlarının düşük olduğunun bildirildiği çalışmalar giderek artmaktadır. Daha önce Tablo1'de gösterilen fibrotik hastalıklar ve miR29 ailesine ilişkin bilgiler Tablo .29'da bizim bulgularımız da eklenerek güncellenmiştir (Bk. 2.6; Sy 22).

Tablo 29. Fibrotik Hastalıklar ve miR29 ailesi ekspresyonu

Fibrotik Doku	miR29 aile üye/üyeleri	Literatür
Fibrotik Karaciğer	miR29b ↓	(90,94,95)
Fibrotik Akciğer	miR29a, miR29b ve miR29c ↓	(21,96)
Fibrotik Kalp	miR29b ↓	(82,97)
Fibrotik Böbrek	miR29b ve miR29c ↓	(84,98)
Sistemik Sklerozlu deri dokusu	miR29a ↓	(83)
Keloid	miR29a ↓	(126), Harmanci
Hipertrofik Skar	miR29b ↓	(33,127), Harmanci

Fibrozis, ESM moleküllerinin metabolizmalarındaki herhangi bir dengesizliğin sonucu olarak ESM bileşenlerinin aşırı birikimi ile karakterizedir. Kollajenler en baskın ESM proteinleridir ve fibroz gelişiminde önemli role sahiptir. Çünkü fibrozun nedeni kollajenin artan sentezi olabilir. Bu nedenle kollajen sentezi fibrotik süreçlerin anlaşılması ve tedavisi için önemlidir. Kollajenler birçok hücre türü tarafından sentezlenir, ancak esas olarak fibroblastlar dahil mezenkimal hücreler tarafından sentezlenir. Doku hasarını takiben fibroblastlar, miyofibroblastlara farklılaşır ve sıklıkla miyofibroblast fenotipinin apoptoza dirençli kalıcı aktivasyonu fibroz gelişimini sağlar (17,125). Kollajenler ve kollajen sentezinde görev alan esansiyel moleküller üzerine çalışmalar planlamak fibrotik süreçlerin dinamiklerini anlamak için doğru bir yaklaşımdır. miR29 ailesinin hedef moleküllerinin büyük çoğunluğunu kollajenler oluşturur. Bu çalışmada kollajen biyosentezi ve fibrozis ile ilişkili COL1A, COL3A, fibronektin, HSP47, LOXL2 ile LOX enzim aktivitesi incelenmiştir. miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla COL1A protein düzeyinde anlamlı artma olduğu gösterilmiştir. Zhang ve ark.ları (126) da çalışmalarında COL1A düzeylerinin miR-29a'nın baskılanması ile arttığını belirlemişlerdir. Araştırmalarının bir diğer bulgusu da miR-29a ve COL3A'nın etkileşimidir. miR29a'nın COL3A üretimini doğrudan düzenlediğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda miR29a baskılanması ile COL3A protein düzeylerinde artma gözlenmiş, ancak anlamlı bir fark görülmemiştir. Bunun yanında miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyenlere kıyasla COL3A protein düzeyinde anlamlı artma olduğu belirlenmiştir. İki çalışmanın paralel yaklaşımları ile elde edilen bulgular uyumluluk göstermektedir.

Gerçekleştirdiğimiz araştırmada, miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla COL1A protein düzeyinde artma gözlenmesine rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmazken hipertrofik skar fibroblast hücreleri ile sağlıklı kontrol fibroblast hücreleri COL1A protein seviyeleri arasında anlamlı fark bulundu. Bi ve ark.larının (33) yaptığı çalışmada miR29b baskılanmasının COL1A mRNA ve protein seviyelerini arttırdığını göstermişlerdir. Benzer şekilde farklı fibrotik hastalıklarda da miR29 ve kollajen etkileşimi gösterilmiştir. miR29'un baskılanması ile pulmoner, kardiyak, renal

fibrozis göstergelerinden biri olan COL1A1, COL3A1 ve fibronektin protein ve gen düzeylerinde artma olmuştur (21,93,97).

Araştırmamızda, miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla HSP47 protein düzeyinde anlamlı fark belirlenmiştir. Bununla birlikte temelde miR29a ve miR29b-2 baskılanmaları HSP47 düzeylerini kontrol ve keloid fibroblastlarında da arttırmıştır. Benzer durum LOXL2 protein düzeyi için de geçerlidir. miR29a baskılanması ile kontrol fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen kontrol fibroblast hücrelerine kıyasla LOXL2 protein düzeyinde anlamlı artış saptanmıştır. Diğer deney gruplarındaki artış düzeyi anlamlı farklılık göstermemesine rağmen miR29 baskılanmasının deri fibrozundaki kollajen sentezini değiştirdiğini ve tetikleyicilerin de HSP47 ve LOX olabileceği halen düşünülmelidir. Bizim çalışmamız ile literatürdeki benzer araştırmalar arasındaki fark yapılan baskılanmanın düzeyine göre değişecektir. miRNA'ların ekspresyon kayıplarının düzeyi fibrotik seviyeyi de değiştirmektedir. miRNA'lar sadece çeşitli fibroz tiplerinin oluşumuna ve gelişimine katılmakla kalmaz, aynı zamanda ekspresyon değişiklikleri de fibroz derecesi ile yakından ilgilidir.

HSP47 ve LOX'un, miR29'un potansiyel hedef genleri olabileceğine dair kanıtlar artmaktadır (27,63,128) miR29a'nın servikal skuamöz hücreli karsinomda HSP47'yi hedeflediği gösterilmiştir (129). Artmış kollajen ifadesi ile HSP47 korelasyonu çoğunlukla patolojik bir duruma işaret eder. Böbrek, akciğer, karaciğer, sistemik skleroz, keloid, romatoid artrit gibi durumlarda artmış HSP47 ifadesi ile karşılaşılr (25,129).

Lizil oksidaz ailesi beş üyeden oluşur: lizil oksidaz (LOX) ve lizil oksidaz benzeri 1–4 (LOXL1-LOXL4). Tüm üyeler, kollajen ve elastin moleküllerinin çapraz bağlanmasını katalize etmede enzim aktivitesine katkıda bulunan korunmuş C-terminal katalitik alanları paylaşır (26,62). Son zamanlarda Chou ve ark. (130) miR 29b'nin meme kanseri hücrelerinde LOX, LOXL2 ve LOXL4'ü hedefleyerek tümör metastazını inhibe edebileceğini bildirmişlerdir, bu da miR-29b ve LOX'in ESM sentezinin yanı sıra tümör mikroçevresinin düzenlenmesindeki etkisine işaret etmektedir.

Karaciğer fibrozu üzerine yapılan bir çalışmada miR29b'nin kollajen maturasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada miR29b'nin aşırı ekspresyonun LOX aktivitesini ve HSP47 düzeyini azalttığı gösterilmiştir (27). Bizim bulgularımız da deri fibrozu açısından bu çalışma ile uyumludur.

ESM sentez yollarının en bilineni olan TGF- β /Smad sinyal yolağının fibrotik hastalıklarda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Burada Smad2, Smad3 ve Smad4 reseptör Smad'larken Smad7 inhibitör Smad'tır. Çoğunlukla çekirdekte bulunur ve TGF- β tarafından uyarıldıktan sonra sitoplazmaya geçer. Smad7, Smad3 ile T β R-I için rekabet ederek, reseptör aracılı Smad3 aktivasyonunu bloke edebilir, böylece TGF- β sinyal iletimini bloke etmiş olur (32,79). Yapılan çalışmalar, miR-29'un TGF- β 'yı hedefleyebildiğini, böylece ESM sentezini arttırdığını ve fibroz sürecini desteklediğini gösterdi (97,126,131,132). Bu çalışmalarla karşılaştırıldığında, benzer şekilde bizim araştırmamızda miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla TGF- β , Smad2, Smad3, Smad4, CTGF ve TIMP-1 gen düzeylerinde artma ve Smad7 gen ifadesinde azalma gözlemlendi, ancak anlamlı bir değişiklik saptanmadı. miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skarlar da keloid fibroblastlarındaki benzer sonuçları elde ettik. Hipotezimizle uyumlu olan bu artma ve azalmaların anlamlı görünmemesi yukarıda da belirttiğimiz gibi transfeksiyon yani miR29 baskılanma düzeyi ile ilişkili olarak bu seviyelerde kaldığını düşünmekteyiz.

Verilerimiz, miR-29 ekspresyonu düşük olduğunda Smad7 ekspresyonunun aşağı doğru düzenlendiğini gösterdi, bu da Smad7'nin miR29'un negatif hedef geni olduğunu gösterir. Ayrıca, keloid-fibroblastlarda miR29a'nın ekspresyonunun aşağı regüle edilmesinden sonra, Smad2 ve Smad3 aktive edildi ve COL1A ve COL3A ekspresyonları da arttı. Zhang ve arkadaşları (126), keloid fibroblastlarında miR-29a'nın TGF- β ekspresyonunu etkileyerek kollajen üretimini düzenlediklerini göstermişlerdir. Ayrıca normal fibroblastlarda miR-29a'nın, TGF- β ekspresyonunu etkileyerek doğrudan kollajen üretimini düzenlediği de bir başka bulgudur ve bizim çalışmamızda da miR29a'nın baskılanması normal fibroblastlarda TGF- β gen ekspresyonunu arttırmıştır. Guo ve arkadaşları (133), miR-29b'nin aşırı ekspresyonunun TGF- β /Smad/CTGF yolağını inhibe ederek aşırı skar oluşumuna

neden olduğunu göstermişlerdir. Bu bilgiler de bizim çalışma bulgularımızla uyumluluk göstermektedir.

Literatür incelendiğinde, TGF- β ve miRNA'larla ilişkili pek çok araştırmaya rastlanmaktadır. Zhou ve arkadaşları (134) profibrotik miR-21 ve miR-200b'nin hipertrofik skarlarda aşırı eksprese edildiğini bildirmiş ve bu miRNA'ların TGF- β /Smad7/ zinc finger E - box - bağlayıcı homeobox yoluyla hipertrofik skarların patogeneğinde rol oynadığını bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada Li ve arkadaşları (135), miR-21 inhibitörünün bir fare modelinde hipertrofik skar büyümesini baskıladığını göstermişlerdir. Ayrıca, miR 143-3p'nin hipertrofik skarlarda aşağı regülasyonu COL1 / III birikimi ve CTGF ekspresyonunun yukarı regülasyonu ile ilişkilidir. Mu ve arkadaşları (136), miR - 143-3p'nin aşırı ekspresyonunun hipertrofik skar fibroblastlarının proliferasyonunu inhibe ettiğini ve rapamisin Akt / (mTOR) sinyal yolu aracılığıyla apoptozu indüklediğini göstermiştir. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar, hipertrofik skarların patogeneğinde birden fazla miRNA'nın rol oynadığını ve etkilerinin, ağırlıklı olarak TGF- β aracılı sinyal yoluyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. Özellikle miR-29 ailesi ile TGF- β arasındaki etkileşim kardiyak ve akciğer fibrozunda ortaya çıkarılmıştır (21,97). MiR-29 baskılanması ardından IMR-90 hücrelerine TGF- β verilmiş ve belirli genlerin TGF- β tarafından yukarı regüle edildiği gösterilmiştir. Akciğer hücrelerinde, azalan miR-29 ekspresyon seviyeleri Col3A1 ve Col4A1'in yukarı regülasyonuna yol açar. Ayrıca, TGF- β uyarılması ve miR-29'un baskılanmasında da akciğer hücrelerinde aynı davranış gözlenir. Col1A1, Col3A1 ve Col1A2 dahil olmak üzere spesifik genlerin yukarı düzenlenmesi söz konusu olur. Belirli durumlarda, TGF- β uyarımı, miR-29 inhibisyonu ile karşılaştırıldığında yetersiz olabilir ve bu, miR-29'un aşağı regülasyonunun TGF- β aracılı yukarı regülasyonu kolaylaştırabileceğini gösterir. Örneğin, belirli lamininler, integrinler, MMP'ler ve ADAM ailesi miR-29'un aşağı regülasyonu ile yukarı regüle edilirken TGF- β uyarımından etkilenmezler (21). Bu nedenle, bu gözlemler, miR-29 ailesinin, TGF- β bağımlı ve-bağımsız sinyal yolları aracılığıyla gen ekspresyonunu düzenlediğini gösterir.

TIMP'ler MMP'lerin doku inhibitörleridir (137). TGF- β tarafından uyarılırlar. Böylece ESM'nin dengesinin korunmasına katkıda bulunurlar. Bizim çalışmamızda,

miR29a baskılanması ile keloid fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen keloid fibroblast hücrelerine kıyasla TIMP-1 gen düzeyinde artma olmasına rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Buna karşılık bu artma protein düzeyine yansımada ve TIMP-1 protein düzeyi düşük bulundu. Benzer şekilde, miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla TIMP-1 gen düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Bunun tam tersi olarak ise miR29b-2 baskılanması ile hipertrofik skar fibroblast hücrelerinde transfekte edilmeyen hipertrofik skar fibroblast hücrelerine kıyasla TIMP-1 protein düzeyinde artma gözlenmesine rağmen anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Yani gen düzeyindeki artma protein düzeyine yansıdı. Bu da miR29b-2'nin TGF- β 'ı etkilediğini, TGF- β 'nın TIMP-1'i uyardığını ve bu uyarının TIMP-1'in protein düzeyine yansarak bu fibrotik sürecin dengesini sentez yönünde tetiklediğini gösterdi. Bu durum hipertrofik skar ve keloid patolojisindeki farklılıkların da bir göstergesi olabilir.

Bu çalışmaya ait anahtar kelimeler üzerinden güncel literatür incelendiğinde bu alanda yapılan çalışma sayısının azlığı göze çarpmaktadır. Bu alanda yeni bilgilerin elde edilebilmesi ve elde edilen bilgilerin kullanılabilmesi için deneysel ve klinik daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu araştırmaların kurgulanmasında çekilen en büyük zorluk bu hastalıkların nadir patolojik durumlar olmasıdır. Öncelikli olarak hastaya ulaşmak zordur. Hasta çoğunlukla iki ayrı uzmanlık alanına tedavi için başvurmaktadır. O nedenle bu tarz çalışmaların planlanmasında hem Plastik Cerrahi hem de Dermatoloji klinikleri ile birlikte çalışmak ulaşılacak hasta sayısının artmasına olanak sağlayabilir. Bununla birlikte dokuların oldukça sert olduğu göz önünde bulundurulmalıdır ve işlenmesinde en uygun yöntemin seçilmesi önemlidir. Doku doğru homojenize edilemezse materyal kaybı kaçınılmaz olacaktır. Kriyohomojenizasyon ya da TRIZOL gibi kuvvetli homojenizasyon teknikleri kullanmak dokunun korunumu ve sağlıklı bir şekilde işlenmesi için uygun yöntemlerdir (138,139).

Literatür dikkatle incelendiğinde görülmektedir ki keloidler yalnızca insanlarda rapor edilmiştir (10). Bu nedenle hayvan çalışması yapmak oldukça güçtür. Mevcut hayvan modellerinin keloid temsili tartışmalıdır. Bu nedenle şimdilik keloidler için en uygun çalışma dizaynı primer hücre kültürlerinin kurulmasıdır. Hipertrofik skarlar

açısından incelediğimizde karşımıza çeşitli hayvan modelleri çıkmaktadır (140). Bu hayvan modelleri etiyoloji ve patogenezi çalışmaları için şarttır ve iki farklı yaklaşımla oluşturulurlar:

1. Fibrozun karşılaştırılabilir derecede hayvanda oluşturulması
2. İnsandan elde edilen doku/hücrenin hayvana transplantasyonu

Bu modeller genetik, travma yaratılarak ya da kimyasallar kullanılarak oluşturulabilirler. Bu çalışmalardan "*duroc pig*" modeli (141) olarak belirtilen model hipertrofik skarları en iyi temsil eden modelken benzer bir diğer modelde "*rabbit-ear*" modelidir (142).

Keloidler için en umut vaat eden yöntem doku mühendisliği modeli olarak adlandırılan üç boyutlu modeldir. Burada insandan alınan keloid dokusu 3-boyutlu skafoldlara implante edilir (140).

Primer fibroblast kültürlerinin kurulması çok zahmetli olmamakla birlikte oldukça dikkat isteyen çalışmalardır. Dokunun ameliyathaneden laboratuvara ulaştırılma hızı, dokuların hücre kültür kaplarına yapışması ve idamesi önemlidir. Doku yapışmadığı takdirde hücrenin kültür kaplarına tutunarak dokudan uzanması mümkün olmaz. Dokunun yapışmasını kolaylaştırmak için çeşitli kimyasallar olmakla birlikte en ucuz yöntem doku kültür kabının hücre kültür ortamına eklenen serum ile kaplanmasıdır. Primer kültürler ticari olarak satın alınan hücreler gibi ölümsüz olmadıklarından ve her ilerlenen pasaj ile senesense girdiklerinden çalışma erken pasaj sayılarında tamamlanmalıdır. Aksi halde tekrarlanabilir sonuçlar almak mümkün olmayabilir. Hücreler yaşlandıkça verdikleri cevaplar da değişir.

Primer kültürlerin transfeksiyonu da oldukça zordur. Bu hücreler daha hassas olduklarından kullanılan reaktiflerin inhibitör etki gösterme ihtimali oldukça yüksektir. Bunun yanı sıra transfeksiyon yöntemi de baskılanma verimliliğini etkiler. Yaptığımız çalışmada transfeksiyon verimliliği %50 civarında olmuştur. Bu da bulgularımızdaki artma ya da azalmaların uyumlu olsalar dahi anlamlı olmamalarına neden olmuştur. Bu tarz çalışmalar için miRNA inhibitörlerinin ya da diğer baskılayıcı ajanların hücre içine lentiviral vektörlerle ya da elektroporasyon gibi tekniklerle yerleştirilmesi verimlilik açısından daha uygun olabilir (143,144). Ancak bu teknikler daha geniş alt yapı olanaklarını beraberinde gerektirir. Viral vektörlerle çalışılırken hücrelerin ya da

reaktiflerin kontaminasyon riski fazladır. Elektroporasyon için ise hem cihaz hem de yetkin bir kullanıcı ihtiyacı vardır. Her ne kadar bu çalışmada kullanılan inhibitörlerin düşük transfeksiyon verimliliği sergilemesi bir sorun gibi görünse de aslında bu durum fibrotik sürecin derecesinin miR29 ifadesiyle doğrudan ilişkili olduğunu da göstermektedir.

Birlikte ele alındığında, verilerimiz, keloid ve hipertrofik fibroblastlarda miR-29'un baskılanmasının TGF- β 'ı uyardığını, böylece kollajen I ve kollajen III, HSP47 ve LOXL2 ekspresyonunu, LOX aktivitesini artırdığını ve sonunda deri fibrozu oluşumunu teşvik ettiğini gösterdi. MiR-29 upregülasyonu, TGF- β ile ilişkili kolajen regülasyonu ile keloid ve hipertrofik fibroblastların fibrotik fenotipini tersine çevirebildiğinden, bu çalışma, bu hastalıkların tedavisi için potansiyel bir terapötik yöntem sağlayabilir. Özetle, bulgularımız göstermektedir ki fibroproliferatif skarlarda miR29 baskılanması, TGF- β sinyal yolunu aktive ederek, kollajen maturasyonu ve sentezini değiştirmektedir ve TIMP-1 protein ifadeleri farklıdır. Bu da fibrotik deri hastalıkları ile ilişkili olarak moleküler farklılıkların TIMP-1 ekspresyonu ile ilişkili olabileceğinin bir kanıtı olabilir. Tüm bu nedenlerle, bu araştırma gelecekte yapılacak daha ileri çalışmalar için bir hedef ve fibroproliferatif skarların klinik tedavisi için yeni bir teorik temel ve referans sağlama niteliğindedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmanın hipotezi; "Fibro-proliferatif skar dokularında miR29 aile üye/üyeleri normal dokudan farklı olarak daha az ifade olmakta ve bu farklılık kollajen maturasyonunu ve ESM sentezinden sorumlu yolların çalışmasını etkileyerek fibrotik gelişimi alevlendirmektedir," şeklinde kurgulandı. Bu hipotezi doğrulamak için üç aşamalı bir deney planı uygulandı ve bu plan çerçevesinde aşağıdaki aşamalar tamamlandı.

- miR29 aile üyelerinin: miR29-a, miR29-b-1, miR29-b-2, miR29-c mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlendi.
- Dokulardan primer fibroblast kültürlerinin kurulması ve karakterizasyonu yapıldı.
- Kurulan fibroblast kültürlerinde miR29 aile üyelerinin baskılanması gerçekleştirildi.
- Kollajen maturasyonu için gerekli Lizil oksidaz (LOX) aktivitesinin ve protein ekspresyonunun; ayrıca ısı şok proteini-47 (HSP47)'nin ekspresyonu saptandı.
- Ekstraselüler LOX aktivitesi belirlendi.
- Tüm deney gruplarında kollajen-1 (COL1), kollajen-3 (COL3) ve fibronektin protein ekspresyonlarının belirlendi.
- Profibrotik moleküller; TGF- β , Smad2, Smad3, Smad4, Connective Tissue Growth Factor (CTGF), TIMP1 ve antifibrotik molekül Smad7 için gen ekspresyonları saptandı.
- Ekstraselüler TIMP-1 protein ifadeleri belirlendi.

İlk aşama olan doku ile ilgili aşamada miR29 aile üyelerinin ekspresyonları başarılı bir şekilde belirlenirken lokalizasyonlarını belirlemek optimum deneysel koşullar sağlanamadığından mümkün olmadı. Ancak ilk aşamadan elde edilen bilgi, ikinci ve sonraki aşamalara devam edilmesi için yeterli olduğundan çalışmaya devam edilebildi ve bu veri ile hipotezimizin ilk kısmı olan "miR29 aile üyelerinin fibroproliferatif skarlarda normalden az ifade olması" kısmı doğrulanmış oldu. İlk aşamanın tamamlanmasıyla dokudan elde edilen miR29 ailesine ilişkin bulgular ve yine dokudan yola çıkılarak kurulan primer fibroblast hücre kültürleri kullanılarak diğer iki aşama tamamlandı. Bu aşamalardan kollajen maturasyonunun değerlendirildiği kısımda histolojik olarak destekleyici bir bulgu olacağı düşünülen ekstraselüler fibril oluşumu hücre sayısının yetersiz olması nedeniyle yorumlanabilir bir görüntü elde

edilmesine olanak vermedi. Buna rağmen miR29'un baskılanması ile kollajen maturasyonun etkilendiği, HSP47, LOXL2, COL1A, COL3A ve fibronektin protein düzeylerindeki değişimlerle, miR29a ve miR29b-2 düzeyleri ile gösterdikleri korelasyonlar ile ve benzer şekilde TGF- β /Smad sinyal yolağı üzerinde yaptıkları değişimlerle kanıtlanarak en başta kurulan hipotez doğrulanmıştır.

Özetle, bu çalışmada gerek keloid gerekse hipertrofik skarlarda miR29'un, *in vitro* ortam koşullarında, kollajen maturasyonunu ve ESM sentezini TGF- β /Smad sinyal yolağı üzerinden etkilediğini, bu etkileşimlerin miR29 düzeyleri ile büyük ölçüde korele olduğu ortaya konulmuştur.

Bu çalışma, şu ana kadar akademik literatüre kazandırılmış miR29 ailesi ve fibroproliferatif skarlar ile ilgili yapılmış en kapsamlı ilk çalışmadır ve mevcut çalışmalar da bulguları destekleyici niteliktedir. Bu araştırma ile, keloidlerde miR29a baskılanmasının kollajen sentezini TGF- β /Smad yolağını etkileyerek TIMP1'i üzerinden ve kollajen maturasyonunu HSP47, LOX protein ve LOX aktivitesini etkileyerek değiştirdiği ilk defa gösterilmiştir. Benzer şekilde hipertrofik skarlarda miR29b-2 baskılanması ile kollajen sentezinin değişiminin de TGF- β /Smad yolağı üzerinden ve kollajen maturasyonunun HSP47 ve LOX aktivitesi değişimiyle etkilendiği ilk defa gösterilmiştir.

Çalışmadaki bulgular ışığında ileriye yönelik yapılması uygun olacak araştırmalar şöyle sınıflandırılabilir:

- Fibrotik hastalıklarda TGF- β /Smad yolağı ile birlikte çalıştığı düşünülen WNT/ β -catenin yolağını (100,101,145) da kapsayan yeni çalışmaların tasarlanması bilimsel literatüre katkı sağlayabilir.
- Fibrotik deri hastalıklarında miR29 ailesini ve TGF- β /Smad yolağını hedeflemek etkili bir tedavi stratejisi olabilir.
- Sentetik miRNA mimikleri kullanılarak bu hastalıklardaki baskılanmış miRNA'ların ekspresyonu artırılabilir.
- Bununla birlikte, böyle bir stratejinin belirli teknik (uygulama yolu ve dolaşımdaki stabilite gibi) ve biyolojik (hedeflenen uygulama, alım hızı ve etkili doz) sınırlamaları vardır, bu da hayvan modelleri ve klinik deneyler kullanılarak daha fazla araştırma gerektirir.

- Keloidler hayvanlarda tespit edilmemiştir ve bir hayvan çalışması yoktur. Hipertrofik skarlar için önerilen hayvan modellerinin ise standardizasyonu olmadığından hayvan çalışmalarının yapılabilmesi için ayrıca hayvan modelleri üzerine araştırmalar da yapılmalıdır.

Sonuç olarak, şu ana kadar elde ettiğimiz bulgular, miR29 ailesinin keloid ve hipertrofik skarlarda HSP47 ve LOX'u etkileyerek kollajen maturasyonunu değiştirdiğini ve hastalık patogenezinde TGF- β /Smad yolağı üzerinden aktivasyon göstererek ve TIMP-1 protein düzeylerini değiştirerek deri fibrozunu arttırdığını göstermektedir.



7. KAYNAKLAR

1. Guo S, DiPietro LA. Factors Affecting Wound Healing. J Dent Res. Mart 2010;89(3):219-29.
2. Gonzalez AC de O, Costa TF, Andrade Z de A, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. An Bras Dermatol. Ekim 2016;91(5):614-20.
3. Goldberg SR, Diegelmann RF. Wound Healing Primer. Surg Clin North Am. Aralık 2010;90(6):1133-46.
4. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Front Biosci J Virtual Libr. 01 Ocak 2004;9:283-9.
5. Patel S, Maheshwari A, Chandra A. Biomarkers for wound healing and their evaluation. J Wound Care. 02 Ocak 2016;25(1):46-55.
6. Robles DT, Berg D. Abnormal wound healing: keloids. Clin Dermatol. 01 Ocak 2007;25(1):26-32.
7. Köse O, Waseem A. Keloids and hypertrophic scars: are they two different sides of the same coin? Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al. Mart 2008;34(3):336-46.
8. Tuan TL, Nichter LS. The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation. Mol Med Today. Ocak 1998;4(1):19-24.
9. Rahban SR, Garner WL. Fibroproliferative scars. Clin Plast Surg. Ocak 2003;30(1):77-89.
10. Andrews JP, Marttala J, Macarak E, Rosenbloom J, Uitto J. Keloids: The paradigm of skin fibrosis - Pathomechanisms and treatment. Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol. 2016;51:37-46.
11. Lian N, Li T. Growth factor pathways in hypertrophic scars: Molecular pathogenesis and therapeutic implications. Biomed Pharmacother. 01 Aralık 2016;84:42-50.
12. Lee HJ, Jang YJ. Recent Understandings of Biology, Prophylaxis and Treatment Strategies for Hypertrophic Scars and Keloids. Int J Mol Sci. 02 Mart 2018;19(3).

13. Ogawa R. Keloid and Hypertrophic Scars Are the Result of Chronic Inflammation in the Reticular Dermis. *Int J Mol Sci.* 10 Mart 2017;18(3).
14. Ogawa R, Akaishi S, Kuribayashi S, Miyashita T. Keloids and Hypertrophic Scars Can Now Be Cured Completely: Recent Progress in Our Understanding of the Pathogenesis of Keloids and Hypertrophic Scars and the Most Promising Current Therapeutic Strategy. *J Nippon Med Sch Nippon Ika Daigaku Zasshi.* 2016;83(2):46-53.
15. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(4):1202-7.
16. Patel V, Nouredine L. MicroRNAs and fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* Temmuz 2012;21(4):410-6.
17. O'Reilly S. MicroRNAs in fibrosis: opportunities and challenges. *Arthritis Res Ther.* 13 Ocak 2016;18:11.
18. Deng Z, He Y, Yang X, Shi H, Shi A, Lu L, vd. MicroRNA-29: A Crucial Player in Fibrotic Disease. *Mol Diagn Ther.* 01 Haziran 2017;21(3):285-94.
19. Yamada Y, Sugawara S, Arai T, Kojima S, Kato M, Okato A, vd. Molecular pathogenesis of renal cell carcinoma: Impact of the anti-tumor miR-29 family on gene regulation. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc.* 2018;25(11):953-65.
20. Ślusarz A, Pulakat L. The two faces of miR-29. *J Cardiovasc Med Hagerstown Md.* Temmuz 2015;16(7):480-90.
21. Cushing L, Kuang P, Lü J. The role of miR-29 in pulmonary fibrosis. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell.* Nisan 2015;93(2):109-18.
22. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, vd. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv Mater Deerfield Beach Fla.* Ocak 2019;31(1):e1801651.
23. Weiskirchen R, Weiskirchen S, Tacke F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Mol Aspects Med.* 2019;65:2-15.
24. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 01 Ocak 2011;3(1):a004978.
25. Ito S, Nagata K. Biology of Hsp47 (Serpine H1), a collagen-specific molecular

chaperone. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;62:142-51.

26. Johnston KA, Lopez KM. Lysyl oxidase in cancer inhibition and metastasis. *Cancer Lett.* 28 2018;417:174-81.

27. Zhang Y, Ghazwani M, Li J, Sun M, Stolz DB, He F, vd. MiR-29b inhibits collagen maturation in hepatic stellate cells through down-regulating the expression of HSP47 and lysyl oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* Nisan 2014;446(4):940-4.

28. Sauk JJ, Nikitakis N, Siavash H. Hsp47 a novel collagen binding serpin chaperone, autoantigen and therapeutic target. *Front Biosci J Virtual Libr.* 01 Ocak 2005;10:107-18.

29. Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* 2016;24(2):215-22.

30. Meng X-M, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12(6):325-38.

31. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 02 Mayıs 2016;8(5).

32. Vander Ark A, Cao J, Li X. TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cell Signal.* 2018;52:112-20.

33. Bi S, Cao C, Chai L-L, Li S-R, Yang D-Y. Regulatory mechanism of miR-29 over TGF- β 1 and COL1 in scar cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(10):2512-7.

34. Harvey C. Wound healing. *Orthop Nurs.* Nisan 2005;24(2):143-57; quiz 158-9.

35. Gravitz L. Skin. *Nature.* 2018;563(7732):S83.

36. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin N Am.* Ağustos 2011;19(3):441-53.

37. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau J-C, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol.* Şubat 2016;25(2):92-8.

38. Losquadro WD. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin N Am.* Ağustos 2017;25(3):283-9.

39. Khavkin J, Ellis DAF. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial*

Plast Surg Clin N Am. Mayıs 2011;19(2):229-34.

40. O'Kane S. Wound remodelling and scarring. J Wound Care [Internet]. 29 Eylül 2013 [a.yer 27 Kasım 2020]; Erişim adresi: <https://www.magonlinelibrary.com/doi/abs/10.12968/jowc.2002.11.8.26426>
41. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur. 2017;58(1-2):81-94.
42. Wang P-H, Huang B-S, Horng H-C, Yeh C-C, Chen Y-J. Wound healing. J Chin Med Assoc JCMA. 2018;81(2):94-101.
43. Zielins ER, Atashroo DA, Maan ZN, Duscher D, Walmsley GG, Hu M, vd. Wound healing: an update. Regen Med. Kasım 2014;9(6):817-30.
44. Young A, McNaught C-E. The physiology of wound healing. Surg Oxf. 01 Ekim 2011;29(10):475-9.
45. Schultz GS, Chin GA, Moldawer L, Diegelmann RF. Principles of Wound Healing. İçinde: Fitridge R, Thompson M, editörler. Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists [Internet]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press; 2011 [a.yer 27 Kasım 2020]. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534261/>
46. Watkins SA, Zippin JH. When wound healing goes awry. A review of normal and abnormal wound healing, scar pathophysiology, and therapeutics. J Drugs Dermatol JDD. Ekim 2008;7(10):997-1005.
47. Xue M, Jackson CJ. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. Adv Wound Care. 06 Kasım 2013;4(3):119-36.
48. Factors That Impair Wound Healing. J Am Coll Clin Wound Spec. 01 Aralık 2012;4(4):84-91.
49. Ogawa R, Akaishi S. Endothelial dysfunction may play a key role in keloid and hypertrophic scar pathogenesis - Keloids and hypertrophic scars may be vascular disorders. Med Hypotheses. Kasım 2016;96:51-60.
50. Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, Ruzicka T, Jeschke MG. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. Mol Med Camb Mass. Şubat 2011;17(1-2):113-25.

51. Trace AP, Enos CW, Mantel A, Harvey VM. Keloids and Hypertrophic Scars: A Spectrum of Clinical Challenges. *Am J Clin Dermatol*. Haziran 2016;17(3):201-23.
52. Shih B, Garside E, McGrouther DA, Bayat A. Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease. *Wound Repair Regen*. 2010;18(2):139-53.
53. Do NN, Eming SA. Skin fibrosis: Models and mechanisms. *Curr Res Transl Med*. 01 Ekim 2016;64(4):185-93.
54. Shaw TJ, Mori KK and R. Wound-Associated Skin Fibrosis: Mechanisms and Treatments Based on Modulating the Inflammatory Response [Internet]. C. 10, Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets. 2010 [a.yer 27 Kasım 2020]. s. 320-30. Erişim adresi: <https://www.eurekaselect.com/86991/article>
55. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med*. Şubat 2001;33(1):7-21.
56. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet TIG*. Ocak 2004;20(1):33-43.
57. Hopkins DR, Keles S, Greenspan DS. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. Eylül 2007;26(7):508-23.
58. Mäki JM, Sormunen R, Lippo S, Kaarteenaho-Wiik R, Soininen R, Myllyharju J. Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues. *Am J Pathol*. Ekim 2005;167(4):927-36.
59. Bellaye P-S, Burgy O, Causse S, Garrido C, Bonniaud P. Heat shock proteins in fibrosis and wound healing: good or evil? *Pharmacol Ther*. Ağustos 2014;143(2):119-32.
60. Lanneau D, Wettstein G, Bonniaud P, Garrido C. Heat shock proteins: cell protection through protein triage. *ScientificWorldJournal*. 03 Ağustos 2010;10:1543-52.
61. Heit C, Jackson BC, McAndrews M, Wright MW, Thompson DC, Silverman GA, vd. Update of the human and mouse SERPIn gene superfamily. *Hum Genomics*. 30 Ekim 2013;7(1):22.

62. Smith MA, Gonzalez J, Hussain A, Oldfield RN, Johnston KA, Lopez KM. Overexpression of Soluble Recombinant Human Lysyl Oxidase by Using Solubility Tags: Effects on Activity and Solubility. *Enzyme Res* [Internet]. 2016 [a.yer 28 Kasım 2020];2016. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4753049/>
63. Rimar D, Rosner I, Nov Y, Slobodin G, Rozenbaum M, Halasz K, vd. Brief report: lysyl oxidase is a potential biomarker of fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. Mart 2014;66(3):726-30.
64. López B, González A, Hermida N, Valencia-Serrano F, de Teresa E, Díez J. Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: From basic science to clinical aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 01 Temmuz 2010;299:H1-9.
65. Meng X-M, Tang PM-K, Li J, Lan HY. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol*. 2015;6:82.
66. López-Hernández FJ, López-Novoa JM. Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res*. Ocak 2012;347(1):141-54.
67. Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc*. Temmuz 2012;9(3):111-6.
68. Dooley S, ten Dijke P. TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res*. Ocak 2012;347(1):245-56.
69. Wiercinska E, Wickert L, Denecke B, Said HM, Hamzavi J, Gressner AM, vd. Id1 is a critical mediator in TGF-beta-induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology Baltim Md*. Mayıs 2006;43(5):1032-41.
70. Maring JA, Trojanowska M, ten Dijke P. Role of endoglin in fibrosis and scleroderma. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;297:295-308.
71. Pannu J, Nakerakanti S, Smith E, ten Dijke P, Trojanowska M. Transforming growth factor-beta receptor type I-dependent fibrogenic gene program is mediated via activation of Smad1 and ERK1/2 pathways. *J Biol Chem*. 06 Nisan 2007;282(14):10405-13.
72. Bujor AM, Pannu J, Bu S, Smith EA, Muise-Helmericks RC, Trojanowska M. Akt blockade downregulates collagen and upregulates MMP1 in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. Ağustos 2008;128(8):1906-14.

73. Morris E, Chrobak I, Bujor A, Hant F, Mummery C, Ten Dijke P, vd. Endoglin promotes TGF- β /Smad1 signaling in scleroderma fibroblasts. *J Cell Physiol.* Aralık 2011;226(12):3340-8.
74. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 01 Mayıs 2007;74(2):184-95.
75. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* Ekim 2011;51(4):600-6.
76. Walraven M, Gouverneur M, Middelkoop E, Beelen RHJ, Ulrich MMW. Altered TGF- β signaling in fetal fibroblasts: what is known about the underlying mechanisms? *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* Şubat 2014;22(1):3-13.
77. Muñoz-Félix JM, González-Núñez M, López-Novoa JM. ALK1-Smad1/5 signaling pathway in fibrosis development: friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev.* Aralık 2013;24(6):523-37.
78. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* Şubat 2009;19(2):156-72.
79. Massagué J. A very private TGF-beta receptor embrace. *Mol Cell.* 01 Şubat 2008;29(2):149-50.
80. Chen W, Fu X, Ge S, Sun X, Zhou G, Zhao Z, vd. Development of gene microarray in screening differently expressed genes in keloid and normal-control skin. *Chin Med J (Engl).* Haziran 2004;117(6):877-81.
81. Wolfram D, Tzankov A, Pülzl P, Piza-Katzer H. Hypertrophic scars and keloids--a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al.* Şubat 2009;35(2):171-81.
82. Maegdefessel L, Azuma J, Tsao PS. MicroRNA-29b regulation of abdominal aortic aneurysm development. *Trends Cardiovasc Med.* Ocak 2014;24(1):1-6.
83. Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, vd. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(6):1733-43.
84. Wang B, Komers R, Carew R, Winbanks CE, Xu B, Herman-Edelstein M, vd. Suppression of microRNA-29 expression by TGF- β 1 promotes collagen expression

and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol JASN*. Şubat 2012;23(2):252-65.

85. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:175-205.

86. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 16 Eylül 2004;431(7006):350-5.

87. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Şubat 2009;10(2):126-39.

88. Furer V, Greenberg JD, Attur M, Abramson SB, Pillinger MH. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Immunol Orlando Fla*. Temmuz 2010;136(1):1-15.

89. Oglesby IK, McElvaney NG, Greene CM. MicroRNAs in inflammatory lung disease--master regulators or target practice? *Respir Res*. 28 Ekim 2010;11:148.

90. He Y, Huang C, Zhang S, Sun X, Long X, Li J. The potential of microRNAs in liver fibrosis. *Cell Signal*. Aralık 2012;24(12):2268-72.

91. Liu Y, Yang D, Xiao Z, Zhang M. miRNA expression profiles in keloid tissue and corresponding normal skin tissue. *Aesthetic Plast Surg*. Şubat 2012;36(1):193-201.

92. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 26 Ekim 2001;294(5543):853-8.

93. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics*. 27 Şubat 2012;44(4):237-44.

94. Roderburg C, Luedde T. Circulating microRNAs as markers of liver inflammation, fibrosis and cancer. *J Hepatol*. Aralık 2014;61(6):1434-7.

95. Roderburg C, Urban G-W, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, vd. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatol Baltim Md*. Ocak 2011;53(1):209-18.

96. Yang S, Cui H, Xie N, Icyuz M, Banerjee S, Antony VB, vd. miR-145 regulates myofibroblast differentiation and lung fibrosis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. Haziran 2013;27(6):2382-91.

97. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, vd. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29

in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 02 Eylül 2008;105(35):13027-32.

98. Wang G, Kwan BC-H, Lai FM-M, Chow K-M, Li PK-T, Szeto C-C. Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: novel biomarkers of fibrosis. *Am J Nephrol*. 2012;36(5):412-8.

99. Villarreal G, Oh D-J, Kang MH, Rhee DJ. Coordinated regulation of extracellular matrix synthesis by the microRNA-29 family in the trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 01 Mayıs 2011;52(6):3391-7.

100. Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *J Cell Biochem*. 01 Eylül 2009;108(1):216-24.

101. Kapinas K, Kessler C, Ricks T, Gronowicz G, Delany AM. miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *J Biol Chem*. 13 Ağustos 2010;285(33):25221-31.

102. Kapinas K, Delany AM. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res Ther*. 27 Mayıs 2011;13(3):220.

103. Grizzle WE, Bell WC, Sexton KC. Issues in collecting, processing and storing human tissues and associated information to support biomedical research. *Cancer Biomark Sect Dis Markers*. 2010;9(1-6):531-49.

104. Etoh M, Jinnin M, Makino K, Yamane K, Nakayama W, Aoi J, vd. microRNA-7 down-regulation mediates excessive collagen expression in localized scleroderma. *Arch Dermatol Res*. Ocak 2013;305(1):9-15.

105. Huang D, Shen K-H, Wang H-G. Pressure therapy upregulates matrix metalloproteinase expression and downregulates collagen expression in hypertrophic scar tissue. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(17):3321-4.

106. Cho J-W, Il K-J, Lee K-S. Downregulation of type I collagen expression in silibinin-treated human skin fibroblasts by blocking the activation of Smad2/3-dependent signaling pathways: potential therapeutic use in the chemoprevention of keloids. *Int J Mol Med*. Mayıs 2013;31(5):1148-52.

107. Wu Z-Y, Lu L, Liang J, Guo X-R, Zhang PH, Luo S-J. Keloid microRNA expression analysis and the influence of miR-199a-5p on the proliferation of keloid fibroblasts. *Genet Mol Res GMR*. 14 Nisan 2014;13(2):2727-38.

108. Konieczny A, Ausubel FM. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J Cell Mol Biol*. Ağustos 1993;4(2):403-10.
109. Roseboom IC, Rosing H, Beijnen JH, Dorlo TPC. Skin tissue sample collection, sample homogenization, and analyte extraction strategies for liquid chromatographic mass spectrometry quantification of pharmaceutical compounds. *J Pharm Biomed Anal*. 30 Kasım 2020;191:113590.
110. Monleau M, Bonnel S, Gostan T, Blanchard D, Courgnaud V, Lecellier C-H. Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells. *BMC Genomics* [İnternet]. 23 Mayıs 2014 [a.yer 12 Aralık 2020];15(1). Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4041998/>
111. Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harb Protoc*. 11 Ocak 2007;2007(11):pdb.ip47.
112. Sterling CH, Veksler-Lublinsky I, Ambros V. An efficient and sensitive method for preparing cDNA libraries from scarce biological samples. *Nucleic Acids Res*. 09 Ocak 2015;43(1):e1-e1.
113. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(12):e103.
114. Jørgensen S, Baker A, Møller S, Nielsen BS. Robust one-day in situ hybridization protocol for detection of microRNAs in paraffin samples using LNA probes. *Methods San Diego Calif*. Aralık 2010;52(4):375-81.
115. Obernosterer G, Martinez J, Alenius M. Locked nucleic acid-based in situ detection of microRNAs in mouse tissue sections. *Nat Protoc*. 2007;2(6):1508-14.
116. Siengdee P, Klinhom S, Thitaram C, Nganvongpanit K. Isolation and culture of primary adult skin fibroblasts from the Asian elephant (*Elephas maximus*). *PeerJ*. 2018;6:e4302.
117. Kuroda K, Tajima S. HSP47 is a useful marker for skin fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J Cutan Pathol*. Mart 2004;31(3):241-6.
118. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new

insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:127-52.

119. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* Nisan 1981;112(2):195-203.

120. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, vd. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* Ekim 1985;150(1):76-85.

121. Feng Y, Sun Z-L, Liu S-Y, Wu J-J, Zhao B-H, Lv G-Z, vd. Direct and Indirect Roles of Macrophages in Hypertrophic Scar Formation. *Front Physiol.* 2019;10:1101.

122. Uitto J, Kouba D. Cytokine modulation of extracellular matrix gene expression: relevance to fibrotic skin diseases. *J Dermatol Sci.* 01 Aralık 2000;24:S60-9.

123. Luzina IG, Atamas SP. Fibrotic Skin Diseases. İçinde: Gaspari AA, Tyring SK, editörler. *Clinical and Basic Immunodermatology* [Internet]. London: Springer; 2008 [a.yer 27 Kasım 2020]. s. 721-37. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-1-84800-165-7_41

124. Yao H-W, Li J. Epigenetic modifications in fibrotic diseases: implications for pathogenesis and pharmacological targets. *J Pharmacol Exp Ther.* Ocak 2015;352(1):2-13.

125. Babalola O, Mamalis A, Lev-Tov H, Jagdeo J. The role of microRNAs in skin fibrosis. *Arch Dermatol Res.* Kasım 2013;305(9):763-76.

126. Zhang G-Y, Wu L-C, Liao T, Chen G-C, Chen Y-H, Zhao Y-X, vd. A novel regulatory function for miR-29a in keloid fibrogenesis. *Clin Exp Dermatol.* Haziran 2016;41(4):341-5.

127. Tetrandrine induces microRNA differential expression in human hypertrophic scar fibroblasts in vitro [Internet]. *GMR | Genetics and Molecular Research | The Original by FUNPEC-RP.* 2016 [a.yer 20 Aralık 2020]. Erişim adresi: <https://www.geneticsmr.com/articles/6016>

128. Harlow CR, Wu X, van Deemter M, Gardiner F, Poland C, Green R, vd. Targeting lysyl oxidase reduces peritoneal fibrosis. *PLoS One.* 2017;12(8):e0183013.

129. Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, Yoshino H, Itesako T, Fujimura L, vd.

Tumor-suppressive microRNA-29a inhibits cancer cell migration and invasion via targeting HSP47 in cervical squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* Aralık 2013;43(6):1855-63.

130. Chou J, Lin JH, Brenot A, Kim J, Provot S, Werb Z. GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. *Nat Cell Biol.* Şubat 2013;15(2):201-13.

131. Zhang Y, Huang X-R, Wei L-H, Chung AC, Yu C-M, Lan H-Y. miR-29b as a therapeutic agent for angiotensin II-induced cardiac fibrosis by targeting TGF- β /Smad3 signaling. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* Mayıs 2014;22(5):974-85.

132. Lyu G, Guan Y, Zhang C, Zong L, Sun L, Huang X, vd. TGF- β signaling alters H4K20me3 status via miR-29 and contributes to cellular senescence and cardiac aging. *Nat Commun.* 02 Temmuz 2018;9(1):2560.

133. Guo J, Lin Q, Shao Y, Rong L, Zhang D. miR-29b promotes skin wound healing and reduces excessive scar formation by inhibition of the TGF- β 1/Smad/CTGF signaling pathway. *Can J Physiol Pharmacol.* Nisan 2017;95(4):437-42.

134. Zhou R, Zhang Q, Zhang Y, Fu S, Wang C. Aberrant miR-21 and miR-200b expression and its pro-fibrotic potential in hypertrophic scars. *Exp Cell Res.* 10 Aralık 2015;339(2):360-6.

135. Li G, Zhou R, Zhang Q, Jiang B, Wu Q, Wang C. Fibroproliferative effect of microRNA-21 in hypertrophic scar derived fibroblasts. *Exp Cell Res.* 01 Temmuz 2016;345(1):93-9.

136. Mu S, Kang B, Zeng W, Sun Y, Yang F. MicroRNA-143-3p inhibits hyperplastic scar formation by targeting connective tissue growth factor CTGF/CCN2 via the Akt/mTOR pathway. *Mol Cell Biochem.* Mayıs 2016;416(1-2):99-108.

137. Thiele ND, Wirth JW, Steins D, Koop AC, Ittrich H, Lohse AW, vd. TIMP-1 is upregulated, but not essential in hepatic fibrogenesis and carcinogenesis in mice. *Sci Rep [İnternet].* 06 Nisan 2017 [a.yer 20 Aralık 2020];7. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5428806/>

138. Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc.* Haziran 2010;2010(6):pdb.prot5439.

139. von Ziegler LM, Saab BJ, Mansuy IM. A simple and fast method for tissue

- cryohomogenization enabling multifarious molecular extraction. *J Neurosci Methods*. 15 Haziran 2013;216(2):137-41.
140. Marttala J, Andrews JP, Rosenbloom J, Uitto J. Keloids: Animal models and pathologic equivalents to study tissue fibrosis. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. Nisan 2016;51:47-54.
141. Ning X, Yang K, Shi W, Xu C. Comparison of hypertrophic scarring on a red Duroc pig and a Guangxi Mini Bama pig. *Scars Burns Heal*. 01 Ocak 2020;6:2059513120930903.
142. Nabai L, Ghahary A. Hypertrophic Scarring in the Rabbit Ear: A Practical Model for Studying Dermal Fibrosis. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017;1627:81-9.
143. Matsunaga W, Ichikawa M, Nakamura A, Ishikawa T, Gotoh A. Lentiviral Vector-mediated Gene Transfer in Human Bladder Cancer Cell Lines. *Anticancer Res*. Nisan 2018;38(4):2015-20.
144. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Electroporation. *Cold Spring Harb Protoc*. 01 Temmuz 2019;2019(7).
145. Bergmann C, Distler JHW. Canonical Wnt signaling in systemic sclerosis. *Lab Invest*. Şubat 2016;96(2):151-5.

8. EKLER

8.1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu Örneği (EK1)

 TC Sağlık Bakanlığı Tuzçu Bey ve Fibrotik Hastalıklar	ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ	Doküman Adı: KADB-F.23-R.00
		Yayın Tarihi: 30.05.2013
		Sayfa No: 1/4
		Onaylayan: Daire Başkanı

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

Yara iyileşmesi esnasında henüz tam olarak açıklanamamış mekanizmalardaki bir sorun nedeniyle ortaya çıkan anormal yaralarla ilişkili olarak ele almayı planladığımız keloidler (cildin kendi kendini aşırı derecede tamir ederek doku üstüne doku oluşturması) yaralı dokunun kendini aşırı tamir etmesi durumudur ve hipertrofik skar (sıklıkla yaralanmalardan, genellikle de cerrahilerden, böcek ısırıklarından, dövmelemlerden, yanıklardan sonra iyileşme döneminde oluşan, keskin sınırlı ancak deriden yüksek, yara sınırları dışına taşmayan tahribatlar) da keloidlerin yara sınırları içinde kalmış halleri olarak kabul edilir. Bu süreçleri aydınlatmak üzere yapılmış çalışmalara rağmen halen altında yatan nedenler ve en iyi tedavi yöntemi bilinmemektedir. Gönüllü olarak (tahmini gönüllü sayısı 10) dahil olacağınız bu çalışma bilimsel bir çalışmadır ve hastalığınızın mekanizmasını yeni moleküller üzerinden aydınlatmayı amaçlamaktadır.

Katılmanızı istediğimiz araştırmanın ismi "*Fibro-proliferatif Skar Dokularında miR-29 ailesi varlığının, miR29'un kollajen maturasyonuna etkisinin ve ekstrasellüler matris sentezi ile ilişkili sinyal yollarındaki rolünün incelenmesi*"dir. Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız. Araştırmaya davet edilmenizden nedeni sizde Keloid/Hipertrofik Skar ya da deri fibrozisi ile ilişkili herhangi bir hastalığa dair tam konulmamış olmasıdır. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı bu araştırmayı gerçekleştirecektir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Doç. Dr. Cenk Demirdöver ve Araş. Gör. Duygu Harmancı tarafından bulgular kaydedilecektir. Bu kayıtlar kimliğiniz belirtilmeden tıp

 TC Sağlık Bakanlığı Tıbbi Araştırma ve Tıbbi Uzman Kurumu	ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ	Doküman Adı: KADB-F.23-R.00
		Yayın Tarihi: 30.05.2013
		Sayfa No: 2/4
		Onaylayan: Daire Başkanı

öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir. Bu çalışmayı yapabilmek için rutin ameliyatınız sırasında çıkarılacak doku örneklerinizden deri örneğiniz alınacak ve bu örnek üzerinde DEÜ Patoloji Laboratuvarı ve DEÜ ARLAB'da çalışılacaktır. Örneklerinizden elde edilen RNA materyalinde ve parafine gömülü dokularınızda miR29 geni varlığı araştırılacak ve keloid/hipertrofik skara sahip hastalardan elde edilen örneklerle karşılaştırılacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz. Eğer örneğinizin imha edilmesine karar verirsiniz, bu isteğinizden önce üretilmiş her türlü veri ve yapılmış analiz ortadan kaldırılmayacak ama daha fazla analiz yapılmayacaktır. Aksi halde, *saklama süresinin sonunda (5 yıl) örneğin imha edilmesinden destekleyici/araştırmacı sorumludur. Bu araştırmaya katılmanız için veya araştırmadan kaynaklanabilecek giderler için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Araştırmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda da, sizle ilgili tıbbi veriler bilimsel amaçla diğer çalışmalar için kullanılabilir.*

Prof. Dr. Gül Güner Akdoğan'ın yürütücülüğünde, Doç. Dr. Cenk Demirdöver'in sorumlu araştırmacı olarak önderliğinde, Araş. Gör. Duygu Harmancı tarafından Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp AD' da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim. *Araştırmadan çekilme ya da araştırma dışı bırakılma durumunda dahi verilerimin bilimsel amaçla olarak*

 TC Sağlık Bakanlığı Türkiye Sağ ve Fikih Önce Parafı	ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ	Doküman Adı: KADB-F.23-R.00
		Yayın Tarihi: 30.05.2013
		Sayfa No: 3/4
		Onaylayan: Daire Başkanı

diğer araştırmalar için kullanılmasına izin veriyorum. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Araş. Gör. Duygu Harmancı'yı, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp AD İnciraltı/İZMİR, 0541 237 7647'ten arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		
VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

8.2. Etik Kurul Raporu (EK2)

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

26.11.2015

Konu: Karar No:
Sayı: 322

Doç.Dr.Cenk DEMİRDÖVER

Kurulumuz tarafından 26.11.2015 tarih ve 283-SBKAEK protokol numaralı 2015/21-06 karar ile onayı alınan "Fibro-Proliferatif Skar Dokularında miR-29 Ailesi Varlığına, miR29'un Kollajen Matürasyonuna Etkisinin ve Ekstrasellüler Matris Sentezi ile İlişkili Sinyal Yollarındaki Rolünün İncelenmesi" konulu araştırmanın ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Ayyetül YILDIZ
Başkan

Ek: Etik Kurul Kararı

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yeterleştirmesi İçin 33340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel: 0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta: etikkurul@deu.edu.tr

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Fibro-Proliferatif Skler Dokularında miR-29 Ailesi Varlığının, miR29'un Kollajen Matürasyonuna Etkisinin ve Ekstraselüler Matris Sentezi ile İlgili Sinyal Yollarındaki Rolünün İncelenmesi
YATIRIM ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	
ETİK KURULU PROTOKOL NUMARASI	283-SBKAİK

KARAR BELİLEME	Karar No:2015/11-06 Tarih:26.11.2015
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekeceği, amaç, yaklaşımlar ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. Başvuru dosyasının TC Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Başkanlığı'na gönderilerek izin alınması gerekmektedir.

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yürürlükte İy Klinik Uygulamaları Yönetmeliği
BASKIN ÜNİVERSİTE ADI / SOYADI	Prof.Dr.Ayşe Gül Yılmaz

Unvan/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlgili	Kontrol *	İmza
Prof.Dr.Ayşe Gül YILMAZ	Psikiyatri	DEÜ Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hülya ELLİDOĞRU	Halk Sağlığı	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Prostatit Onkoloji A.D.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Murat DUMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Yeni Doğan)	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hale ÖZEN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Çocuk Hematoloji)	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.A.Necati GÖKMEZ	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Taner DAĞCI	Fizyoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Pembe KESKİNOĞLU	Biyoistatistik	DEÜ Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilimler A.D.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Erden YAKA	Nöroloji	DEÜ Tıp Fakültesi Nöroloji A.D.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Uğur Önal TÖRK	Kardiyoloji	Ege Üniversitesi İlaç ve Farmakokinetik Araştırma Merkezi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Yasemin BASKIN	Temel Onkoloji	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji A.D.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Yardımcı Doç.Dr.Yasemin İRAÇ	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Ekonomik Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Av.Semra MARMARA	İlaç	DEÜ Rektörlüğü	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Av.Nazan FİDÜKÇÜOĞLU	İlaç	Altınözü Nevruz Sağlık İlçesi Hastanesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Hayat ALDAYRAK	Enfeksiyon	Sağlık Bakanlığı Menenjit Enfeksiyon Üye	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	

*Toplularda İmza

Döküman Başkandan
Unvan/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Ayşe Gül Yılmaz
İmza:

Not: Etik Kurul Kararı, Kurumun Etik Kuruluna Karşılık Kararıyla İmza Alınmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Fibro-Proliferatif Skar Dokularında miR-29 Ailesi Varlığına, miR29'un Kollajen Matürasyonu ve Ekstrasellüler Matris Sentezi ile İlgili Sinyal Yollarındaki Rolünün İncelenmesi
YAKSA ARAŞTIRMAMIN PROTOKOL KODU	
ETİK KURUL PROTOKOL NUMARASI	281-SBKAEK

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Varlığına Dekanlık Binası Kat:2 İçişleri 35140 İZMİR-TÜRKİYE
	TELEFON	0 232 4122254 - 0 232 4122218
	FAKS	0232 4122243
	E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

KARŞIYAN BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI ADI SOYADI	Doç Dr. Cenk DEMİRDÖVER
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Plastik Cerrahi A.D
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
	YAKSA İDARI SORUMLU UNVANI ADI SOYADI	-
	DESTEKLEYİCİ	-
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI ADI SOYADI	-
	(TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alınıyor ise)	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLÇİSİ	FAZ 1 ☐ FAZ 2 ☐ FAZ 3 ☐ FAZ 4 ☐ Üstününün dışı olarak ☐ Tıbbi cihaz kullanılarak ☐ In vivo laboratuvar çalışmaları ☐ performans değerlendirme çalışmaları ☐ İlaç dışı klinik uygulama ☒
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐ ULUSAL ☒ ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGİLER	Belge Adı	Tarih	Versiyon Numarası	DEĞERLENDİRME		
				Tekrar ☒	İlgili ☐	Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGİLER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	01.11.2015	01	Tekrar ☒	İlgili ☐	Diğer ☐
	Bilgilendirme Genel Formu	20.11.2015	01	Tekrar ☒	İlgili ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Tekrar ☐	İlgili ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Tekrar ☐	İlgili ☐	Diğer ☐
	Açıklama					
	Belge Adı					
	SKORTA	☒	09.11.2015			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐				
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐				
	PLAN	☐				
YILLIK BİLDİRİM	☐					
SONUÇ RAPORU	☐					
GUVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐					
DİĞER:	☐					

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr. Ayşe Gül Yıldız
İmza:

Not: Etik kurul belgesi, incelenen her sayfaya ilişli atmalıdır.

8.3. Özgeçmiş



DUYGU HARMANCI KARAGÜLLE

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

DEÜ TIP FAKÜLTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MOLEKÜLER TIP AD ZEMİN

Telefon

0232 311 11 11

E-posta

duygu.karagulle@deu.edu.tr

İnternet Sayfası

www.duygu-karagulle.com

Öğrenim Bilgileri

12 Şubat 2013 - Şu Anda (7 yıl 11 ay)

Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (DR)

Diploma Numarası: -

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.89 / 4.0

14 Eylül 2009 - 12 Şubat 2013 (3 yıl 5 ay)

Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (YL) (TEZLİ)

Diploma Numarası: 953

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.54 / 4.0

06 Eylül 2005 - 12 Haziran 2009 (3 yıl 10 ay)

Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, KİMYA PR.

Diploma Numarası: 14983

Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.23 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

15 Mart 2010 - Şu Anda (10 yıl 10 ay) (Tam Zamanlı)

ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

01 Şubat 2010 - Şu Anda (10 yıl 11 ay) (Tam Zamanlı)

ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yabancı Dil Bilgileri

İTALYANCA (Okuma: Başlangıç, Yazma: Başlangıç, Konuşma: Başlangıç)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Biyokimya -- Moleküler Biyokimya

Tarım Bilimleri -- Ziraat -- Tarla Bitkileri -- Biyoteknoloji ve Genetik -- Moleküler Biyoteknoloji

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Biyokimya

Anahtar Kelimeler

Biyokimya
Biyoteknoloji
Hücre Dış Matris
Dermal Fibroblast
Deri Yara İyileşmesi

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

D. HARMANCI KARAGÜLLE, Z. ERBAYRAKTAR, O. SAYIN & G. AKDOĞAN, In Vitro effects of Selenium on Human Glioblastoma Multiforme Cell Lines: A Preliminary Study, ACTA CLINICA CROATICA, 2017, 0353-9466, 49-57.

D. HARMANCI KARAGÜLLE, E. E. PEKCAN, A. KOÇAK & G. AKDOĞAN, Role of the microRNA-29 family in fibrotic skin diseases, Biomedical Reports, 2017, 2049-9434, 6, 6, 599-604.

H. SAİD, D. HARMANCI KARAGÜLLE, A. KOÇAK, G. GÜLER, A. BURCU, F. D. İNCE & C. HAGEMANN, Functional regulation of hypoxia induced genes in human brain cancer, FEBS JOURNAL, 2016, 0000-0000.

A. KOÇAK, S. SARIOĞLU, D. HARMANCI KARAGÜLLE, A. M. BİRLİK & G. AKDOĞAN, Investigation of effects of epigallocatechin 3 gallate on a scleroderma model of fibrosis, FEBS JOURNAL, 2016, 0000-0000.

A. KOÇAK, S. SARIOĞLU, D. HARMANCI KARAGÜLLE, A. M. BİRLİK & G. AKDOĞAN, Investigation of effects of epigallocatechin 3 gallate on a scleroderma model of brosis, FEBS JOURNAL, 2016, 0000-0000.

A. KOÇAK, D. HARMANCI KARAGÜLLE, A. M. BİRLİK & G. AKDOĞAN, Molecular mechanisms of scleroderma pathogenesis, International Journal of Research Studies in Biosciences (ijrsb), 2016, 0000-0000.

S. HARUN, D. HARMANCI KARAGÜLLE, A. KOÇAK, C. URAL, G. GÜLER, A. BURCU, İ. F. DEMET, Y. SOYSAL & H. CARSTEN, Molecular regulation of hypoxia induced genes related to bunion canca, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, 2016, 0000-0000.

A. MERT, D. HARMANCI KARAGÜLLE & G. AKDOĞAN, PhD training in biomedicine and healthsciences, FEBS JOURNAL, 2016, 0000-0000.

A. SENA, T. DAŞ, İ. BERKAY, A. HİLAL, K. FULYA, D. HARMANCI KARAGÜLLE & G. AKDOĞAN, PhD training in medical education careerpro les and satisfaction levels of gradus tesfrom Dokuz Eylül University Gradusta School of Health Sciences, FEBS JOURNAL, 2016, 0000-0000.

F. AYDIN KÖSE, Ç. SERAP, H. CENGİZ, D. HARMANCI KARAGÜLLE, A. KOCAN, E. CANBAY, D. ASLAN, E. SEZER, N. A. PABUÇÇUOĞLU & H. KOÇDOR, The 1st Turkish in vitro Diagnostic Symposium Evaluation, TURKISH JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, 2016, 0000-0000.

F. AYDIN KÖSE, Ç. SERAP, H. CENGİZ, D. HARMANCI KARAGÜLLE, A. KOÇAK, E. CANBAY, D. ASLAN, E. SEZER, N. A. PABUÇÇUOĞLU & H. KOÇDOR, The 1st Turkish in vitro diagnostic symposium evaluation, FEBS JOURNAL, 2016, 1742-464X.

H. M SAİD, R. SAFARI, Y. SOYSAL, D. HARMANCI KARAGÜLLE, C. HAGEMANN, J. ANACKER, M. FLENTJE & F. KÖCKAR, Carbonic anhydrase 9 modulation by the regulative effect of hypoxic oxygenation and cytokine expression in human hepatocellular carcinoma in vitro, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, 2015, 0000-0000.

A. KOÇAK, S. SARIOĞLU, D. HARMANCI KARAGÜLLE, O. YILMAZ, A. M. BİRLİK & G. AKDOĞAN, Deneyisel skleroderma modeli nde epi gallokatagı n 3gallat in fi brozi s üzer ne etki lan nı n araştırılması, Turkish Journal of Biochemistry, 2015, 0000-0000.

D. HARMANCI KARAGÜLLE, Z. ERBAYRAKTAR & G. AKDOĞAN, Experimental regulative effect of selenium compounds on the glioblastoma multiforme cells in vitro, FEBS JOURNAL, 2015, 0000-0000.

H. SAİD, Y. SOYSAL, D. HARMANCI KARAGÜLLE, C. HAGEMANN, F. CARTA, A. KATZER, M. FLENTJE & C. SUPURAN, Hypoxia induced CA9 targeting via different alternative approaches including sulfonamide derivative compounds in human brain cancer in vitro, FEBS JOURNAL, 2015, 0000-0000.

H. M SAİD, Y. SOYSAL, D. HARMANCI KARAGÜLLE, G. AKDOĞAN & C. HAGEMANN, Maintaining the quality of experimental results when analyzing the expression of gene expression in the hypoxic microenvironment in human brain cancer in vitro, FEBS JOURNAL, 2015, 0000-0000.

H. M SAİD, Y. SOYSAL, D. HARMANCI KARAGÜLLE, A. KATZER, M. FLENTJE & C. HAGEMANN, NDRG1 as a marker gene for acute hypoxic oxygenation conditions in the brain tumor environment, FEBS JOURNAL, 2015, 0000-0000.

H. KOCDOR, H. ATEŞ, S. AYDIN, R. ÇEHRELİ, F. SOYARAT, P. KEMANLI, D. HARMANCI KARAGÜLLE, H. CENGİZ & M. A. KOCDOR, Zinc supplementation induces apoptosis and enhances antitumor efficacy of docetaxel in non small cell lung cancer, Drug Design, Development and Therapy, 2015, 0000-0000.

N. ARSLAN, B. MEMDUH, Y. TOKGÖZ, T. KÜME, O. SAYIN, D. HARMANCI KARAGÜLLE & G. GÜNER, Evaluation of serum neopterin levels and its relationship with adipokines in pediatric obesity related nonalcoholic fatty liver disease, J Pediatr Endocr Met, 2013, 0000-0000.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

11B5595, İnsan Primer Fibroblast Hücre Kültür Karakterizasyonu İçin Biyosensör Geliştirilmesi, 1005 - Yeni Fikirler ve Ürünler, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Aynılma Tarihleri: 02.03.2020 - 01.10.2020, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.12.2018 -

1185595, İnsan Primer Fibroblast Hücre Kültür Karakterizasyonu İçin Biyosensör Geliştirilmesi, 1005 - Yeni Fikirler ve Ürünler, Araştırmacı/Uzman, Yürürlükte, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Kabulma/Aynılma Tarihleri: 01.12.2018 - 07.02.2020, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.12.2018 - 01.02.2021.

120R021, Covid-19'un Hızlı ve Doğru Tanısına Yönelik Nanoparçacık Destekli Yenilikçi Elektrokimyasal Test ve Analiz Yöntemlerin Eldesi, 1001 - Araştırma, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Projeye Kabulma/Aynılma Tarihleri: 16.11.2020 - 01.05.2021, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.11.2020 - 01.05.2021.

DUYGU HARMANCI KARAGÖLLE, Araştırma Burs ve Destakları Müdürlüğü, 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı, 2008.

DUYGU HARMANCI KARAGÖLLE, Araştırma Burs ve Destakları Müdürlüğü, 2218-Yurt İçi Doktora Sonrası Araştırma Burs Programı, Başvurusu İnceleniyor, 2020 - 1.

DUYGU HARMANCI KARAGÖLLE, Etkinlik Destakları ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2009 - 3, 01.10.2009 - 31.08.2011.

DUYGU HARMANCI KARAGÖLLE, Etkinlik Destakları ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılım Desteği Programı, Destak Sona Erdi, 2018 - 3, 26.10.2018 - 30.10.2018.

BİDEB Destakları

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

A. GENEL

DÜZENLEME TARİHİ : 20.12.2020	
T.C. KİMLİK NO :	
ÜNVANI ADI SOYADI:Duygu HARMANCI KARAGÜLLE, MSc	
YAZIŞMA ADRESİ : DEÜ Tıp Fakültesi Öğrenme Kaynakları Merkezi ARLAB 35340 Narlıdere/İzmir	
DOĞUM TARİHİ ve YERİ :	
TEL : 0232 412 46 75	GSM:
E-POSTA : duyguharmanci@gmail.com	

B. EĞİTİM

ÖĞRENİM DÖNEMİ	DERECE	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
2013-2020	Doktora	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp AD
2009-2013	Yüksek Lisans	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp AD
2005-2009	Lisans	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi- Kimya Bölümü
2001-2004	Lise	Erzincan Anadolu Lisesi	Matematik-Fen
2004-2005	Lise	Keşan Anadolu Lisesi	Matematik-Fen

C. AKADEMİK MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
MnD Biyoteknoloji Ar-Ge Tic. ve San. Ltd. Şti. (Start-Up)	Türkiye	İzmir	Ar-Ge	Kurucu Müdür	2018-2020
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Moleküler Tıp	Araştırma Görevlisi	2010-2020
Viyana Tıp Üniversitesi	Avusturya	Viyana	Moleküler Nöroonkoloji Araştırma Birimi	Konuk Araştırmacı	2011
DERİN İnovasyon Dergisi	Türkiye	İzmir	DETTO	Genel Sekreter (Redaktör)	2014-2016

D. KATILDIĞI/GÖREV ALDIĞI MESLEKİ BİLİMSEL ETKİNLİKLER

20-22 Şubat 2019, İzmir, Türkiye	IV. IVD Sempozyumu-Biyosensörler (Düzenleme Kurulu Üyesi olarak)
26-30 Ekim 2018, Bodrum,	Uluslararası Biyokimya Kongresi/29. Ulusal Biyokimya Kongresi (Tübitak Bursu ile sözlü sunum ile katılımcı olarak)

Türkiye	
4-6 Ekim 2018, Köln, Almanya	34. Klenk Symposium in Molecular Medicine- Epigenetics: Basic principles and clinical applications (Katılımcı olarak)
5-7 Eylül 2018, İzmir, Türkiye	FEBS Workshop on Molecular Life Sciences: Training Tomorrow's Scientists (Düzenleme Kurulu Üyesi olarak)
21-22 Haziran 2018, İzmir, Türkiye	Biyotıp ve Sağlık Bilimleri Alanında Lisansüstü Danışmanlık: ORPHEUS Yaklaşımı (Düzenleme Kurulu Üyesi olarak)
16 Mart 2018, İzmir, Türkiye	Bilimsel Yazının Yayına Dönüştürülmesi (Katılımcı olarak)
28 Şubat-2 Mart 2018, İzmir, Türkiye	III. Türkiye <i>in vitro</i> Diyagnostik Sempozyumu, "Endokrin ve Metabolik Hasatlıklar: Tanıdan tedaviye biyobelirteçler" (Düzenleme Kurulu Üyesi olarak)
15-17 Ekim 2017, Köln, Almanya	33 rd Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine - Tissue regeneration, wound healing and fibrosis: Translating basic concepts into regenerative therapy (Katılımcı olarak)
19-23 Eylül 2017, Erzurum, Türkiye	Uluslararası Biyokimya Kongresi - 2017 / 28. Ulusal Biyokimya Kongresi (Bursiyer olarak)
10-14 Eylül 2017, Kudüs, İsrail	42nd FEBS Congress: From molecules to cells and back (Bursiyer Olarak)
6j-8 Eylül 2017, Rehovot, İsrail	New Horizons in Biochemistry and Molecular Biology Education Conference (Weizmann Enstitü bursiyeri olarak)
10-13 Haziran 2017, Barselona, İspanya	SOE 2017 Congress (katılımcı olarak)
25-30 Mayıs 2017, Spetses, Yunanistan	6 th FEBS Advanced Lecture Course- Matrix Pathobiology (YTF)
10-12 Mayıs 2017, İzmir, Türkiye	II. Türkiye <i>in vitro</i> Diyagnostik Sempozyumu – Biyobelirteçler (Düzenleme Kurulu Üyesi olarak)
22 Mart 2017 İzmir, Türkiye	İnsülin Direnci Sempozyumu (Düzenleme Kurulu Üyesi olarak)
25 Mart 2016, İzmir, Türkiye	Yara İyileşmesi Sempozyumu (Düzenleme Kurulu Üyesi olarak)
1-2 Mart 2016, İzmir, Türkiye	XII. ARLAB HÜCRESEL, MOLEKÜLER ve ANALİTİK TEKNİKLER KURSU (Eğitici olarak)
18-20 Şubat	Türkiye <i>in vitro</i> Diyagnostik Sempozyumu (Düzenleme Kurulu Üyesi olarak)

2016, İzmir, Türkiye	
11 Ocak 2016, İzmir, Türkiye	Araştırma Laboratuvarlarında Biyogüvenlik ve Çalışan Sağlığı (Katılımcı olarak)
9 Aralık 2015, İzmir, Türkiye	ORPHEUS Danışmanlık ve Öğrenci Çalıştayı (Katılımcı olarak)
27 Temmuz-1 Ağustos 2015, İzmir, Türkiye	XI. ARLAB HÜCRESEL, MOLEKÜLER ve ANALİTİK TEKNİKLER Yaz Okulu (Eğitici olarak)
4-9 th July 2015, Berlin, Germany	40 th FEBS CONGRESS The Biochemical Basis of Life (Bursiyer olarak)
2nd-4 th July 2015, Berlin, Germany	The 15 th FEBS YOUNG SCIENTISTS' FORUM (Bursiyer olarak)
23 Haziran 2015, İzmir, Türkiye	ORPHEUS ÇALIŞTAYI-II (Katılımcı olarak)
18 Haziran 2015, İzmir, Türkiye	ORPHEUS ÇALIŞTAYI-I (Katılımcı olarak)
20-22 Mayıs 2015, İzmir, Türkiye	5 th International Congress of Molecular Medicine; From Cell to Bedside (Öğrenci Düzenleme Kurulu Üyesi ve Katılımcı olarak)
15-16 Ocak 2015, İzmir, Türkiye	Tıbbi Laboratuvar Performansının Kanıtlanması Kursu: Olguya Dayalı (Düzenleme Kurulu Üyesi olarak)
25-26 Kasım 2014, İzmir, Türkiye	X. ARLAB Hücresel, Moleküler ve Analitik Teknikler Kursu, (Yardımcı Eğitici olarak)
21-23 Ekim 2014, İzmir, Türkiye	"DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Proteomiks" teorik ve uygulamalı kurs (Öğrenci Düzenleme Kurulu üyesi ve katılımcı olarak)
19 Eylül 2014, İzmir, Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi VIII. ÖÇM Sempozyumu, (Poster bildirisi ile katılımcı olarak)
16-17 Haziran 2014, İzmir, Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi Danışmanlık Eğitimi Çalıştayı (Katılımcı olarak)
2-6 th June, 2014, İzmir/Turkey	Bioinformatics Approach to Enzymology- Angel Herraez (Katılımcı olarak)
23-24 th January 2014, İzmir, Turkey	7 th EUA-CDE Workshop "Outcomes of Doctoral Education- Mindset, Research, Innovation" (Öğrenci Düzenleme Kurulu üyesi olarak)

26-27 Kasım 2013, İzmir, Türkiye	ARLAB Hücresel, Moleküler ve Analitik Teknikler Kursu, (Yardımcı Eğitici olarak)
7-9 Kasım 2013, Ankara, Türkiye	7. Cerrahi Araştırma Kongresi (Kayıt bursu ile katılımcı olarak)
18-19 th October 2013, Graz, Austria	ORPHEUS PhD-Candidates Workshop "Standards for PhD Education in Europe- Implementation and Ameliorations form the PhD Candidates point of view" (Sözel bildiri ile)
6-11 th June 2013, St.Petersburg, Turkey	38 th FEBS Congress 2013 "Mechanisms in Biology" (Poster bildirisi ile Bursiyer- Katılımcı olarak)
16-17 Mayıs 2013, İzmir, Türkiye	Sağlıkta İnovasyon: Üniversiteden Sanayiye, (Düzenleme Kurulu Üyesi olarak)
4-5 Aralık 2012, İzmir, Türkiye	ARLAB Hücresel, Moleküler ve Analitik Teknikler Kursu, (Yardımcı Eğitici olarak)
24-25 Kasım 2012, İstanbul, Türkiye	1. Ulusal Moleküler Biyoloji Kongresi (Poster bildirisi ile katılımcı olarak)
13-16 June 2012 , Opatija, Crotia	FEBS3+ Meeting From Molecules to life and back, (Poster bildirisi ile katılımcı olarak)
29-30 March 2012, İzmir, Türkiye	FEBS Workshop on Biochemistry and Molecular Biology Education Trends&Tips, (Poster bildirisi ile katılımcı olarak-aynı zamanda lisansüstü öğrenci düzenleme kurulu üyeliği)
23 Eylül 2011,	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi V. ÖÇM Sempozyumu, (Poster bildirisi ile katılımcı olarak)
4 Mayıs 2011, İzmir, Türkiye	Proteomik: Temel Bilgiler ve Uygulama Örnekleri, (İzlenimci - Katılımcı Olarak)
31 Mayıs- 3 Haziran 2011, İzmir, Türkiye	Kanser Biyolojisinde Güncel Konular Teorik Kurs, (İzlenimci - Katılımcı Olarak)
27-30 Nisan 2011, İzmir, Türkiye	6th ORPHEUS Conference PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences, (Poster bildirileri ile, aynı zamanda Lisansüstü Öğrenci Kurulu Üyesi olarak)
11-13 Şubat 2011, Çeşme, Türkiye	Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, (İzlenimci/Katılımcı olarak) – (Kongre Burslusu olarak)
16-18 Aralık 2010, İzmir,	KLİNİK LABORATUARLARDA ANALİTİK KALİTE YÖNETİMİ VE REFERANS ARALIKLARI HESAPLAMA KURSU (İzlenimci/Katılımcı olarak)

Türkiye	
İzmir, 30 Kasım- 1 Aralık 2010	ARLAB Hücresel, Moleküler ve Analitik Teknikler Kursu, (Yardımcı Eğitici olarak)
Eskişehir, 27-30 Ekim 2010	XXII. ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ, (İzlenimci/Katılımcı olarak)
İstanbul, 20 October 2010	ATCC Cell Culture Seminar (İzlenimci/Katılımcı olarak)
İzmir, 12-14 October 2010	EBI Bioinformatics Roadshow (İzlenimci/Katılımcı olarak)
Ürkmez, 1-2 Ekim 2010	Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu (İzlenimci/katılımcı olarak)
İzmir, 15-18 Haziran 2010	Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı, Hastalıklarla İlişkisi (İzlenimci/Katılımcı olarak)
İzmir, 5-6 Mayıs 2010	Onkolojide Bioinformatik ve Biyonanoteknolojik Yöntemler Kursu (İzlenimci/Katılımcı olarak)
İzmir, 23 Mart 2010	EBİLTET 2.Kök Hücre Sempozyumu (İzlenimci/Katılımcı olarak)
İzmir, 16-23 Şubat 2010	Deney Hayvanları Kullanımı Sertifika Kurs Programı (İzlenimci/Katılımcı olarak)
İzmir, 8-12 Şubat 2010	Web-Based Clinical Case Simulations and Problem-Based Learning Tutorials (İzlenimci/Katılımcı olarak)

E. PROJE DENEYİMİ

PROJE ADI	BAŞLANGIÇ-BİTİŞ TARİHLERİ	GÖREV
Sklerodermada Peptid Pd29 ve Upadacitinib (Abt-494) Etkinliğinin İncelenmesi (TÜBİTAK)	2020-Devam ediyor	Bursiyer
Covid-19'un Hızlı ve Doğru Tanısına Yönelik Nanoparçacık Destekli Yenilikçi Elektrokimyasal Test ve Analiz Yöntemlerin Eldesi (TÜBİTAK/SAN-TEZ)	2020-Devam ediyor	Bursiyer
Pregabalin ve Pregabalinin Morfin ile Birlikte Kullanım Etkilerinin Sıçanlarda Değerlendirilmesi (EGE-BAP)	2020-Devam ediyor	Araştırmacı
Bone Morphogenic Protein (BMP) eşliğinde kültüre edilmiş tırnak kökenli kök hücrelerle tırnak restorasyonu: farelerde deneysel çalışma (DEÜ-BAP)	2019-Devam ediyor	Araştırmacı
Bleomisinle oluşturulmuş deneysel skleroderma modelinde lipoik asitin olası koruyucu etkisine aracılık eden moleküler mekanizmaların araştırılması (DEÜ-BAP)	2019-Devam ediyor	Araştırmacı
Skleroderma hastalarında meprin metalloproteinaz ekspresyonunun ve fibroze olan etkisinin incelenmesi	2018-2019	Araştırmacı

(DEU-BAP)		
İnsan Primer Fibroblast Hücre Kültür Karakterizasyonu için Biyosensör geliştirilmesi (TÜBİTAK 1005)	2018-Devam ediyor	Araştırmacı/Bursiyer
VDPET: Evcil Hayvan Hastalık Tanı Kiti (TÜBİTAK 1512)	2018-2019	Yürütücü
2018.KB.SAG. – Gestasyonel diabetik plasentalarda, PI3K p85/p110 alfa ve glukoz transport proteinleri korelasyonunun incelenmesi (Dokuz Eylül Üniversitesi BAP)	2018-2020	Araştırmacı
117S397- (TÜBİTAK 3001) Sistemik skleroz hastalık alt gruplarında wnt yolağı aktivitesinin organ tutulumlarıyla ilişkisi	2017-2019	Bursiyer
2016.KB.SAG.025 - (Dokuz Eylül Üniversitesi BAP) DEÜ Tıp Fakültesi ARLAB Bünyesinde Araştırma Hücre Hattı Koleksiyonunun Kurulumu	2016-2019	Araştırmacı
2016.KB.SAG. 019 – (Dokuz Eylül Üniversitesi BAP) Fibro-proliferatif Skar Dokularında miR-29 ailesi varlığının, miR29'un kollajen maturasyonuna etkisinin ve ekstrasellüler matriks sentezi ile ilişkili sinyal yollarındaki rolünün incelenmesi	2016-2020	Araştırmacı
2014.KB.SAG.062 - (Dokuz Eylül Üniversitesi BAP) Nonarteritik iskemik optik nöropatilerde oksidatif stres hasarının değişkenliğinin değerlendirilmesi	2014-2017	Araştırmacı
2014.KB.SAG.024 - (Dokuz Eylül Üniversitesi BAP) Farelerde bleomisin ile oluşturulmuş skleroderma modelinde epigallokateşin 3 gallatın fibrozis üzerine olası koruyucu etkilerinin araştırılması	2014-2017	Araştırmacı
2013.KB.SAG.022- (Dokuz Eylül Üniversitesi BAP) Sıçan Amitriptilin Zehirlenme Modelinde Oluşan Kardiyovasküler Bulgular Üzerine 2-Hidroksipropil-β-Siklodekstrinin Etkisi	2013-2015	Araştırmacı
Gastritli çocuklarda noninvaziv aktivite belirteçlerinin histopatolojik bulgularla ilişkisinin incelenmesi- tamamlandı (Herhangi bir kuruluştan destek alınmaksızın mevcut malzemelerle etik kurul onayı alınarak yapılmıştır)	2012-2013	Araştırmacı
2011.KB.SAG. 024 – (Dokuz Eylül Üniversitesi BAP) Selenyumun insan glioblastoma multiforme hücre hatlarında in vitro etkilerinin araştırılması	2012-2013	Araştırmacı

F. YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren ve hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Harmanci D, Uygun ZO, Demirdover C, Girgin Sagin F, Akdogan Guner G. Rapid Fibroblast Cell Culture Characterization with Impedimetric Label-Free Heat Shock Protein 47 Biosensor. Electroanalysis (2020)
2. Koçak, Ayşe & URAL, Cemre & SİFİL, Sedenay & SEZER, Beyza & TUNGA, Elif & ÇAKIRLAR,

Hatice & AKOKAY, Pınar & Harmanci, Duygu & Pekçetin, Cetin & Cavdar, Zahide. (2020). Tıp Eğitiminde Özel Çalışma Modülü: Sıçanlarda sisplatin kaynaklı testis hasarına karşı lipoik asidin p38 MAPK sinyal yolu üzerindeki olası koruyucu etkilerinin araştırılması. STED / Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi. 173-180. 10.17942/sted.702562.
3. Kaya Nusret Engin, Duygu Harmancı, Ceren Durmaz, Melis Kant, Aylin Yaman, Merve Akış, Sevda Özel Yıldız, Hüray İşlekel, Gül Güner Akdoğan, Meltem Söylev-Bajin. Is the clinical course of non-arteritic ischemic optic neuropathy associated with oxidative damage and the dynamics of the antioxidant response? Molvision – Submit edildi
4. Kocak Ayse, Harmanci Duygu, Akdoğan- Guner G, Birlik M. Relationship of Wnt pathway activity and organ involvement in scleroderma types. International Journal of Rheumatic Diseases 2020; 00:1-10.
5. Kocak Ayse, Harmanci Duygu, Cavdar Zahide, Ural Cemre , Birlik Merih, Sarioglu Sulen, Yılmaz Osman, Guner Akdoğan Gul. Antioxidant effect of Epigallocatechin-3-Gallate in a bleomycin induced scleroderma model. The Archives of Rheumatology. Arch Rheumatol 2019;34(x):i-viii. doi: 10.5606/ArchRheumatol.2019.6835.
6. Kocak, A., Harmanci, D., Birlik, M., et al. (2018). Effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on a scleroderma model of fibrosis. <i>Turkish Journal of Biochemistry</i> , 0(0), pp. -. Retrieved 7 Feb. 2018, from doi:10.1515/tjb-2017-0185
7. Harmanci D, Erkan EP, Kocak A, Akdoğan Guner G. Role of the microRNA-29 family in fibrotic skin diseases. 2017. Biomedical Reports. 6;6:599-604.
8. Harmanci D, Erbayraktar Z, Sayin O, Guner G. <i>In Vitro</i> Effects Of Selenium On Human Glioblastoma Multiforme Cell Lines: A Preliminary Study. 2017. Acta Clinica Croatica. 56;1:48-57.
9. Aydın F, Celebi S, Cengiz H, Harmancı D, Kocak A, Canbay E, Aslan D, Sezer E, Pabuccuoglu A, Kocdor H. The 1 st Turkish in vitro Diagnostic Symposium Evaluation. 2017. Turkish Journal of Biochemistry
10. Koçak A, Harmanci D, Birlik M, Guner G. Molecular Mechanisms International Journal of Biosciences. 2017. 5;1:49-55
11. Kocdor H, Ates H, Aydın S, Cehreli R, Soyarat F, Kemanli P, Harmanci D, Cengiz H, Kocdor MA. Zinc supplementation induces apoptosis and enhances antitumor efficacy of docetaxel in non-small-cell lung cancer. Drug Des Devel Ther. 2015 27;9:3899-909.
12. Arslan N, Tokgoz Y, Kume T, Bulbul M, Sayin O, Harmancı D, Guner Akdoğan G. Evaluation Of Serum Neopterin Levels And Its Relationship With Adipokines In Pediatric Obesity Related Nonalcoholic Fatty Liver Disease. J Pediatr Endocr Met, 2013; May 30:1-7, 2013, Araştırma Makale, SCI-Expanded

G. KİTAP BÖLÜMLERİ

1. COVID-19'un Biyokimya Araştırma Ortamına Etkileri - Akut Dönem ve İlerisi için Öneriler, İpuçları Türkiye Klinikleri COVID-19, "Biyokimya ve COVID-19" Yazarlar: Duygu Harmancı Karagülle, Zihni Onur Uygun, Ferhan G. Sağın -Aralık 2020
2. Antioxidant Supplementation during glioma therapy: friend or foe? "Glioma - Contemporary Diagnostic and Therapeutic Approaches", ISBN 978-953-51-6182-0 Author: Duygu Harmancı-2018i
3. Roles of microRNAs in Rheumatoid Arthritis- "Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis", ISBN 978-953-51-5016-9 Authors: A.Merih Birlik, Duygu Harmancı, Ayşe Kocak-2017

H. HAKEMLİ KONFERANS/SEMPOZYUMLARIN BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

1. Gül Güner Akdoğan, Ferhan Sağın, Duygu Harmancı, Ayşe Koçak, Hakan Orer, Zdravko Lackovic, Michael Mulvany. Successful Testing of a Template for ORPHEUS workshop on supervisor Training. 14th ORPHEUS conference. March 21st - 23rd 2019-sözlü ve poster sunum
2. Duygu Harmancı, Ayşe Koçak, Cenk Demirdöver, Gül Güner Akdoğan. Hipertrofik Skarda miR-29b-2 lizil oksidaz benzeri protein 2 ve ısı şok proteini 47'yi düzenler- "Uluslararası Biyokimya Kongresi/29. Ulusal Biyokimya Kongresi", 26-30 Ekim 2018- sözlü sunum
3. Ayşe Koçak, Gül Akdoğan, Aydan Köken Avşar, Duygu Harmancı, Ahmet Merih Birlik. Skleroderma hastalarında meprin metalloproteinazların moleküler regülasyonu ve fonksiyonu. "Ulusal Romatoloji Kongresi", 3-7 Ekim 2018- Sözlü sunum
4. Ayşe Koçak, Duygu Harmancı, Merih Birlik, Gül Güner. Meprin metalloproteinases: Molecular regulation and function in scleroderma patients. "FEBS Advanced Lecture Course, Extracellular Matrix: cell regulation, epigenetics and modeling", Patras, Greece, 29 Eylül-2 Ekim 2018- sözlü sunum
5. Arda Kayataş, Büşra Gül, Ezgi Yıldız, Can Ahmet Karabacak, İbrahim Emik, Ayşe Koçak, Pınar Akokay, Duygu Harmancı, Çetin Pekçetin, Zahide Çavdar. Sıçanlarda Sisplatin ile İndüklenmiş Testis Hasarına Karşı Lipoik Asidin Olası Koruyucu Etkisinde PI3K/AKT Sinyal Yolağının Rolünün Araştırılması," 12. ÖÇM Sempozyumu" 26 Eylül 2018, İzmir. Pp16
6. Sedenay Sifil, Beyza Sezer, Hatice Çakırlar, Elif Ekin Tunga, Cemre Ural, Pınar Akokay, Duygu Harmancı, Çetin Pekçetin, Zahide Çavdar. Sıçanlarda Sisplatin ile İndüklenmiş Testis Hasarına Karşı Lipoik Asidin Olası Koruyucu Etkisinde p38 MAPK Sinyal Yolağının Rolünün Araştırılması," 12. ÖÇM Sempozyumu" 26 Eylül 2018, İzmir. Pp17
7. Cemre Ural, Sedenay Sifil, Beyza Sezer, Hatice Çakırlar, Elif Ekin Tunga, Pınar Akokay, Ayşe Koçak, Duygu Harmancı, Çetin Pekçetin, Zahide Çavdar. A Special Study Module in Medical Education: The investigation of possible protective effects of lipoic acid on p38 MAPK signaling pathway against cisplatin induced testicular damage in rats. Turk J Biochem 2018, Vol 43 I Supp. Issue 4-FEBS Workshop 5-7 Eylül 2018, poster
8. Duygu Harmancı, Arda Kayataş, Büşra Gül, Ezgi Yıldız, Can Ahmet Karabacak, İbrahim Emik, Ayşe Koçak, Pınar Akokay, Çetin Pekçetin, Zahide Çavdar. An Example Of Applying Wet-Lab Special Study Module In Dokuz Eylul School Of Medicine: The Protective Effects Of Lipoic Acid Via PI3K/AKT Signaling Pathway Against Cisplatin Induced Testicular Injury. Turk J Biochem 2018, Vol 43 I Supp. Issue 4-FEBS Workshop 5-7 Eylül 2018, poster
9. Duygu Harmancı, Ayşe Kocak, Cemre Ural, Zahide Çavdar, Gül Güner Akdoğan. Role and Long-Term Effects of Special Study Modules: Research Training for Medical Students. Turk J Biochem 2018, Vol 43 I Supp. Issue 4-FEBS Workshop 5-7 Eylül 2018, poster
10. Duygu Harmancı, Zahide Çavdar, İlkay Aksu, Meral Karaman, Gül Güner Akdoğan, Çetin Pekçetin. Supervision in PhD Training: From the viewpoint of PhD students of Dokuz Eylul University Graduate School of Health Sciences. Turk J Biochem 2018, Vol 43 I Supp. Issue 3-ORPHEUS Workshop 21-22 Haziran 2018, poster
11. Ahsen Çakır, Tunahan Dünder, Ahmet Sadık Gülgeç, Eray Metin Güler, Duygu Harmancı Karagülle, Nilay Kadakal, Abdurrahim Koçyiğit. Kistik Fibrozis Hastalarında Oksidatif Stres ve Enflamasyon. "VI. Dünya Nadir Hastalıklar Günü Sempozyumu" 1 Mart 2018-poster
12. H.M. Said, G. Al-Kafaji, R. Safari, D. Harmancı, A. Koçak, Y. Soysal, F.D. Ince, C. Hagemann. Hypoxia induced transcriptional regulation of the N-Myc down regulated gene 1 (NDRG1) in human brain cancer. FEBS Open Bio 8 (Suppl. S1) (2018) 107-496 DOI: 10.1002/2211-

5463.12453. Poster
13. Ayşe Koçak, Duygu Harmancı, Merih Birlik, Gül Güner. Molecular mechanisms mediating antioxidant effect of epigallocatechin-3-gallate in experimental scleroderma model. Ann Rheum Dis, Vol 77, supp. 2018, pA1278, DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-eular.6677.-poster
14. Ayşe Koçak, Duygu Harmancı, Merih Birlik, Gül Güner. Vitamin D and Vitamin D receptor in patients with scleroderma subtypes. Ann Rheum Dis, Vol 77, supp. 2018, pA1278, DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-eular.2158.-poster
15. Ayşe Koçak, Duygu Harmancı, Merih Birlik, Gül Akdoğan. Skleroderma alt tiplerinde vitamin D reseptör ekspresyonunun belirlenmesi. Sözlü Sunum – III. Türkiye in vitro Diyagnostik Sempozyumu "Endokrin ve Metabolik Hasatlıklar: Tanıdan tedaviye biyobelirteçler", 28 Şubat-02 Mart 2018, İzmir
16. Ayşe Koçak, Duygu Harmancı, Merih Birlik, Sülen Sarıoğlu, Osman Yılmaz, Zahide Çavdar, Gül Güner Akdoğan. Bleomisinle oluşturulmuş deneysel scleroderma modelinde epigallokatesin-3-gallat'ın fibrozise etkilerinin araştırılması. Sözlü Sunum - XVIII. Ulusal Romatoloji Kongresi, 18-22 Ekim 2017, Antalya. RAED Dergisi Volume 9. Pp6
17. Ayşe Koçak, Duygu Harmancı, Merih Birlik, Gül Güner Akdoğan. Skleroderma tiplerinde oksidatif stres parametreleri. Poster- XVIII. Ulusal Romatoloji Kongresi, 18-22 Ekim 2017, Antalya. RAED Dergisi Volume 9. pp146.
18. Ayşe Koçak, Duygu Harmancı, Merih Birlik, Zahide Çavdar, Sülen Sarıoğlu, Osman Yılmaz, Cemre Ural, Gül Güner Akdoğan. Deneysel scleroderma modelinde epigallokatesin-3-gallat'ın antioksidan etkisine aracılık eden moleküler mekanizmalar. Poster- XVIII. Ulusal Romatoloji Kongresi, 18-22 Ekim 2017, Antalya. RAED Dergisi Volume 9. pp147.
19. D. Harmancı, A. Kocak, C. Demirdover, G. Guner Akdogan. MiR-29b-2 reduces lysyl oxidase activity in primary hypertrophic scar cells. Poster - 33 rd Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine, 15-17 Ekim 2017, Köln. Abstract Book pp42.
20. A. Kocak, D. Harmancı, M. Birlik, G. Guner Akdogan. Epigallocatechin-3-gallate protects against oxidative stress in scleroderma animal model. Poster - 33 rd Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine, 15-17 Ekim 2017, Köln. Abstract Book pp51.
21. Duygu Harmancı Karagülle, Zeliha Kılıç, Ayşe Koçak, Nilgün Yener, Aysun Pabuççuoğlu, Ferhan Girgin Sağın, Hilal Koçdor. 2. Turkey in vitro diagnostic symposium- "Biomarkers" evaluation of general participants. Poster- 28. Ulusal Türk Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül 2017, Erzurum, Turk J Biochem, 2017;42 (S1).
22. Zahide Çavdar, Ahmet Burak Hakkoymaz, Bedirhan Onuş, Erdem Erkut, Cemre Ural, Duygu Harmancı, Ayşe koçoak, Memduh Bülbül, Gül Akdoğan. A special study module in medical education: resveratrol analysis in red wine by high performance liquid chromatography. 28. Ulusal Türk Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül 2017, Erzurum, Turk J Biochem, 2017;42 (S1).
23. Duygu Harmancı, Aybüke Gurup, Enes Talip Yiğiteli, Ozan Ertürk, Memduh Bülbül, Cemre Ural, Ayşe Koçak, Zahide Çavdar, Gül Güner Akdoğan. An experimental special study module in medical education: measurement of selenium levels in cell lysates by atomic absorption spectroscopy. 28. Ulusal Türk Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül 2017, Erzurum, Turk J Biochem, 2017;42 (S1).
24. Ayşe Koçak, Hikmet Kılınç, Ece Sena Çamlı, Aslıhan Oflaz, Jale Sinitta Özgür, Nalan Yıldız, Ozan Tenekeci, Duygu Harmancı, Cemre Ural, Zahide Çavdar, Gül Güner Akdoğan. Using of scleroderma model in the mice as a teaching of fibrosis. 28. Ulusal Türk Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül 2017, Erzurum, Turk J Biochem, 2017;42 (S1).
25. Ayşe Koçak, Duygu Harmancı, Sülen Sarıoğlu, Merih Birlik, Zahide Çavdar, Osman Yılmaz, Cemre Ural, Gül Güner Akdoğan. Antioxidant effects of epigallocatechin-3-gallate in

scleroderma experimental model. 28. Ulusal Türk Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül 2017, Erzurum, Turk J Biochem, 2017;42 (S1).
26. A. Koçak, D. Harmanci, M. Birlik, S. Sarioglu, O. Yilmaz, Z. Cavdar, G. Güner Akdogan. Fibrosis modulation in scleroderma by epigallocatechin-3-gallate. Poster- The FEBS Journal 284 (Suppl. 1) (2017) pp123 DOI: 10.1111/febs.14174.
27. D. Harmanci Karagulle, A. Kocak, C. Demirdöver, B. Lebe, G. Akdogan. The presence of miR-29 family in skin hypertrophic scars and normal skin. Poster- The FEBS Journal 284 (Suppl. 1) (2017) pp135 DOI: 10.1111/febs.14174.
28. D. Harmanci, S. Saglam, C. Dogan, M. Karaca, M.A. Ozbek, S. Karaman, A.N. Iscen, T. Goren, A. Kocak, C. Ural, Z. Cavdar, G. Guner Akdogan. An example of applying wet-lab special study module in Dokuz Eylul School of Medicine: The apoptotic effects of epigallocatechin-3-gallate on glioblastoma multiforme cells. Poster- New Horizons in Biochemistry and Molecular Biology Education Conference, 6-8 Eylül 2017, Rehovot, İsrail. Abstract Book pp42.
29. C. Ural, D. Ozaydin, H. Abubakir, D. Harmanci, A. Kocak, Z. Cavdar, G. Guner Akdogan. A special study module in medical education: Investigation of oxidative stress in a model of peritoneal fibrosis. Poster- New Horizons in Biochemistry and Molecular Biology Education Conference, 6-8 Eylül 2017, Rehovot, İsrail. Abstract Book pp55.
30. Kocak, A.; Harmanci, D.; Birlik, M.; Sarioglu, S.; Akdogan, GG. Protective effects of epigallocatechin 3 gallate on fibrosis in scleroderma model. Poster – Annual European Congress of Rheumatology, 14-17 June, 2017, Madrid, Spain – Annals of the Rheumatic Diseases. 76:2:1105-1106.
31. Harmanci D., Engin K, Durmaz Engin C., Kant M., Yaman A., Akış M., Özel Yıldız S., Islekel H., Guner Akdogan G., Söylev Bajin M. "Is clinical course of optic neuropathy associated with oxidative damage and dynamics of antioxidant response?: a case-control study in patients with nonarteritic ischemic optic neuropathies." -Free Paper Presentation- Congress of the European Society of Ophthalmology (SOE) 10–13 June, 2017, Barcelona, Spain - Abstract Book p20.
32. A. Kocak, D. Harmanci, M. Birlik, S. Sarioglu, G. Guner Akdogan, Protective Effects of Epigallocatechin 3 Gallate on Fibrosis in Scleroderma Model. Flash presentation- 6th FEBS Advanced Lecture Course, FEBS-Matrix Pathobiology, signaling and molecular targets (MPST) 25-30 Mayıs 2017, Spetses, Yunanistan.
33. A. Kocak, D. Harmanci, M. Birlik, G. Guner Akdogan, The activity of serum superoxide dismutase enzyme and the serum level of lipid peroxidation product malondialdehyde in different forms of scleroderma. Flash presentation- 6th FEBS Advanced Lecture Course, FEBS-Matrix Pathobiology, signaling and molecular targets (MPST) 25-30 Mayıs 2017, Spetses, Yunanistan.
34. Harun M. Said, Duygu Harmanci, Ayse Kocak, Cemre Ural, Burcu Acikgoz, Güler Gül, Fatma Demet Ince, Yasemin Soysal. Modulation of Carbonic Anhydrase IX expression by the Regulative Effect of Hypoxia and cytokines in human hepatocellular carcinoma disease. 3rd Satellite Meeting on Carbonic Anhydrase. May 24-27th in Montecatini Terme, Italy.
35. A. Kocak, D. Harmanci, Fatima Daldal, M. Birlik, G. Guner Akdogan. Oxidative stress biomarkers in scleroderma, "Biyobelirteçler" (Hastalıkta & Sağlıkta), Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, 10-12 Mayıs 2017.
36. F. Aydın Kose, S.Celebi, H.Cengiz, D.Harmanci, A. Kocak, et al.- The 1 st Turkish in vitro diagnostic symposium evaluation — The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) 129–417 DOI: 10.1111/febs.13808
37. PhD training in medical education: career profiles and satisfaction levels of graduates from

Dokuz Eylul University Graduate School of Health Sciences - S. Alptekin, T. Das, U. B. Ince, H. Akay, F. Kalagasioglu, D. Harmanci, G. Guner Akdogan – The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) 129–417 DOI: 10.1111/febs.13808
38. PhD training in biomedicine and health sciences ^{SEP} M. Artuk ¹ , D. Harmanci ^{2,3} , G. G. Akdogan ^{2,4} ^{SEP} – The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) 129–417 DOI: 10.1111/febs.13808
39. Investigation of effects of epigallocatechin-3- gallate on a scleroderma model of fibrosis. ^{SEP} A. Kocak ¹ , S. Sarioglu ² , D. Harmanci Karagulle ¹ , M. Birlik ³ , G. Guner Akdogan ⁴ The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) 129–417 DOI: 10.1111/febs.13808
40. Molecular regulation of hypoxia genes related to human cancer – Harun M.Said, Duygu Harmanci, Ayşe Koçak et al. The 21 st World Congress on Advances in Oncology, and 19 th International Symposium on Molecular Medicine 6-8 October, 2016 Athens/Greece
41. Functional regulation of hypoxia induced genes in human brain cancer. H. M. Said ¹ , D. Harmanci ¹ , A. Kocak ¹ , G. Guçl ¹ , B. Acikgoz ¹ , F. D. Ince ¹ , C. Ural ¹ , Y. Soysal ¹ , C. Hagemann ² The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) 129–417 DOI: 10.1111/febs.13808
42. İnsan Beyin Kanserinde Hipoksi İndüklü Genlerin Fonksiyonel Olarak Düzenlenmesi- Harun Muayad Said, Duygu Harmancı, Ayşe Kocak, Güler Gül, Burcu Açıkgöz, Fatma Demet İnce, Cemre Ural, Yasemin Soysal, Carsten Hagemann – Ulusal Moleküler Tıp Sempozyumu- Abstract Book p68, 1-3 Haziran 2016, İstanbul, Türkiye
43. Deneysel scleroderma modelinde epigallokateşin-3-gallat'ın fibrosis üzerine etkilerinin araştırılması- Koçak Ayşe, Sarioglu Sülen, Harmancı Duygu, Yılmaz Osman, Birlik Merih, Güner Gül- 3-6 Kasım 2015, Antalya, Türkiye
44. Carbonic anhydrase 9 modulation by the regulative effect of hypoxic oxygenation and cytokine expression in human hepatocellular carcinoma - in vitro- H.M.Said, Roghaiyeh Safari, Y.Soyas, <u>D.Harmancı</u> , C.Hagemann, A. Katzer, M.Flentje, Kockar Feray. 40 th FEBS CONGRESS- The Biochemical Basis of Life- Abstract Book FEBS Journal 282, 4-9 th July 2015, BERLIN, Germany
45. Experimental regulative effect of selenium compounds on the glioblastoma multiforme cells- <i>in vitro</i> – <u>D. Harmancı</u> , Z. Erbayraktar, G. Guner- 40 th FEBS CONGRESS- The Biochemical Basis of Life- Abstract Book FEBS Journal 282 p252, 4-9 th July 2015, BERLIN, Germany
46. NDRG1 as a marker gene for acute hypoxic oxygenation conditions in the brain tumor environment- H.M.Said, Y.Soyas, <u>D.Harmancı</u> , A. Katzer, M.Flentje, C.Hagemann- 40 th FEBS CONGRESS- The Biochemical Basis of Life- Abstract Book FEBS Journal 282 p244, 4-9 th July 2015, BERLIN, Germany
47. Hypoxia induced CA9 targeting via different alternative approaches including sulfonamide derivative compounds in human brain cancer in vitro - H.M.Said, Y.Soyas, <u>D.Harmancı</u> , C.Hagemann, F.Carta, A. Katzer, M.Flentje, C.T. Supuran- 40 th FEBS CONGRESS- The Biochemical Basis of Life- Abstract Book FEBS Journal 282 p244, 4-9 th July 2015, BERLIN,

Germany
48. Maintaining the quality of experimental results when analyzing the expression of gene expression in the hypoxic microenvironment in human brain cancer in vitro - H.M.Said, Y.Soyсал, <u>D.Harmanci</u> , G. Güner, C.Hagemann - 40 th FEBS CONGRESS- The Biochemical Basis of Life- Abstract Book FEBS Journal 356 p244, 4-9 th July 2015, BERLIN, Germany
49. Directed modulation of hypoxia induced carbonic anhydrase 9 (CA9) gene by various alternative approaches including - Harun M. Said, Yasemin Soysal, <u>Duygu Harmanci</u> , Carsten Hagemann, Fabrizio Carta, Michael Flentje, Claudiu Supuran - 5 th International Congress of Molecular Medicine ; From Cell to Bedside- Abstarct Book p91, 20-22 Mayıs 2015, İzmir, Türkiye
50. Zinc supplementation exhibits anti-tumor efficacy and enhances docetaxel induced cytotoxicity in lung and hormone-resistant prostate cancer cells - Kocdor H, Ates H, Cengiz H, Aydın S, Cehrelı R, Soyarat F, Kemanlı P, Harmanci D, Aslan G, Kocdor MA – sözlü sunum 3 rd Anticancer Agent Development Congress 18-19 th May 2015, İzmir, Türkiye
51. GMS-10 Glioblastoma Multiforme İnsan Hücre Hattı Üzerinde Epigallokateşin-3-gallatın Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi- <u>Duygu Harmanci</u> , Selin Sağlam, Cihan Doğan, Mustafa Özbek, Minel Karaca, Tuğba Gören, Seda Karaman, Afra Nur İşcen, Gül Güner- 8. Özel Çalışma Modülü Sempozyumu, Özet Kitabı s45, Eylül 2014, İzmir, Türkiye
52. Dokuz Eylul University PhD System- from Student Perspective- <u>Duygu Harmanci</u> - ORPHEUS PhD-Candidates Workshop "Standards for PhD Education in Europe- Implementation and Ameliorations form the PhD Candidates point of view, 18-19 th October 2013, Graz, Austria Oral presentation
53. In vitro Effects of Selenium on Human Glioblastoma Multiforme Cell Lines - <u>Duygu Harmanci</u> , Zübeyde Erbayraktar, Gül Güner - 38 th FEBS Congress 2013 " Mechanisms in Biology", 7-11 July 2013, St.Petersburg, Russia
54. Seleno-L-Methionine Plays Role In Glioblastoma Multiforme Cells GMS-10 and DBTRG-05MG Cell Proliferation and Cell Death – <u>Duygu Harmanci</u> , Zübeyde Erbayraktar, Gül Güner – 1. Ulusal Moleküler Biyoloji Kongresi, 24-25 Kasım 2012, İstanbul, Türkiye
55. Pediatrik obesite ile ilişkili yağlı karaciğer hastalığında serum neopterin düzeylerinin değerlendirilmesi- Arslan N, Tokgoz Y, Kume T, Bulbul M, Sayın O, Harmanci D, Guner Akdogan G – 9. Ulusal Çocuk Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Kongresi, 18-21 Ekim 2012, Antalya, Türkiye
56. Sodium Selenite Influences Cell Proliferation and Cell Cycle of SF4433 Human Meningioma Cells – <u>Duygu Harmanci</u> , Zübeyde Erbayraktar, Oya Sayın, Gül Güner – XXIV Ulusal Biyokimya Kongresi, 25-28 Eylül 2012, Konya, Türkiye

57. In Vitro Effects of Seleno-L-Methionine on Glioblastoma Multiforme Cell Proliferation and Death – <u>Duygu Harmancı</u>, Zübeyde Erbayraktar, Gül Güner – Congress 22nd IUBMB-37th FEBS 4-9 September 2012, Sevilla, Spain
58. Detrimental and Cell Cycle Arresting Effects of Sodium Selenite Treatment on Glioblastoma Multiforme Cell Lines and Primary Cells - <u>Duygu Harmancı</u>, Zübeyde Erbayraktar, Gül Güner – FEBS3+ Meeting From Molecules to life and back, Abstract Book p152, 13-16 June 2012, Opatija, Croatia
59. Post- Graduate Education in Molecular Medicine at Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey – <u>Duygu Harmancı</u>, Zübeyde Erbayraktar, Gül Güner – FEBS Workshop on Biochemistry and Molecular Biology Education Trends& Tips, Abstract Book p106, 29-30 March 2012, Izmir, Türkiye Sunulduğu İlk Kongre: 6th Orpheus Conference 2011- PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences, Dokuz Eylül University Abstract Book p51, 27-30 April 2011, Izmir/ Turkey
60. An Outlook to the Scientific Activities of Supervisors at Dokuz Eylül University Graduate School of Health Sciences – Reza Salimi, Mehtap Yüksel Eğrilmez, Roghaiyeh Safari, <u>Duygu Harmancı</u>, Güldal Kırkalli, Gül Güner - FEBS Workshop on Biochemistry and Molecular Biology Education Trends& Tips, Abstract Book p110, 29-30 March 2012, Izmir, Türkiye Sunulduğu İlk Kongre: 6th Orpheus Conference 2011- PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences, Dokuz Eylül University 2011, Abstract Book p55, 27-30 Izmir/ Turkey
61. Selenyum ve Bir Beyin Tümörü: Glioblastoma Multiforme –Ümit Öztürk, Özlem Dinc, Cisem Duman, Nesibe Kübra Göl, Tuba Akide Çoban, <u>Duygu Harmancı</u>, Gül Güner – 5. Özel Çalışma Modülü Sempozyumu, Özet Kitabı s9, Eylül 2011, Izmir, Türkiye
62. An Outlook to Journal Publications From Theses of MSc and PhD Students at Dokuz Eylül University Graduate School of Health Sciences - Mehtap Yüksel Eğrilmez, Şeniz İnanc, Feriha Özkaya, Reza Salimi, <u>Duygu Harmancı</u> Roghaiyeh Safari, Güldal Kırkalli, İbrahim Astarcioglu, Gül Güner - 6th Orpheus Conference 2011- PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences, Dokuz Eylül University 2011, Abstract Book p66, 27-30 April 2011 Izmir/ Turkey
63. Educational Views and Opinions of MSc and PhD Students About the Molecular Medicine Programme at the University of Dokuz Eylül University - Roghaiyeh Safari, <u>Duygu Harmancı</u>, Vildan Mevsim, Gül Güner - 6th Orpheus Conference 2011- PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences, Dokuz Eylül University 2011, Abstract Book p77, 27-30 April 2011 Izmir/ Turkey

H. BURLAR ve ÖDÜLLER

Mart 2020- Haziran 2020	TÜBİTAK 1005 Proje Doktora Bursu
Ekim 2018	TÜBİTAK 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılım Desteği Programı 2018/3- Burs
Ekim 2018	Türk Biyokimya Derneği – Genç Araştırmacı Bursu
Ekim 2018	Türkiye Romatoloji Derneği- Sözlü Sunum Birincilik Ödülü
Eylül 2018	DEÜ Tıp Fakóltesi – Poster Birincilik Ödülü
Haziran 2018	İEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü – Poster Birincilik Ödülü
27-28 Şubat 2018, İstanbul, Türkiye	VI. Dünya Nadir Hastalıklar Günü Sempozyumu – Poster Bildiri Birincilik Ödülü
18-22 Ekim 2017, Antalya, Türkiye	XVIII. Ulusal Romatoloji Kongresi- Sözlü Bildiri Üçüncürlük Ödülü
19-23 Eylül 2017, Erzurum, Türkiye	Uluslararası Biyokimya Kongresi – 2017 / 28. Ulusal Biyokimya Kongresi – Kayıt ve konaklama bursu
10-14 Eylül 2017, Kudüs, İsrail	42nd FEBS Congress From Molecules to cells and back- Kayıt-konaklama ve ulaşım bursu
6-8 Eylül 2017, Rehovot, İsrail	New Horizons in Biochemistry & Molecular Biology Education – Weizmann Institute Kayıt- konaklama bursu
25-30 Mayıs 2017, Spetses, Yunanistan	6 th FEBS Advanced Lecture Course- Matrix Pathobiology Matrix Biology Ireland Poster Prize; YTF (Genç Araştırıcı Seyahat) Bursu
2nd-9th July 2015, Berlin, Germany	The 15 th FEBS YOUNG SCIENTISTS' FORUM and Congress – Kayıt, konaklama ve kısmi ulaşım bursu
7-9 Kasım 2013, Ankara, Türkiye	7. Cerrahi Araştırma Kongresi – Kayıt bursu
6-11 th June 2013, St.Petersburg, Turkey	38 th FEBS Congress 2013 "Mechanisms in Biology" Kayıt, Konaklama Bursu
11-13 Şubat 2011, Çeşme	Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, Kayıt ve Konaklama Bursu

I. PATENT

2020	Primer Fibroblast Hücre Karakterizasyonu için Biyosensör	Dokuz Eylül- Ege ve İzmir Ekonomi Üniversitesi ortaklığında başvuru aşamasındadır.
------	--	--

J. ÜYE OLUNAN KURULUŞLAR

2018-2020	İzmir Ticaret Odası
2015-2018	Türkiye Sakatlar Derneği (Mart 2015- İzmir Şubesi Dernek Yönetim Kurulu Üyesi)
2014-2016	Türkiye Görme Özürlüler Kitaplığı (TÜRGÖK)
2010-	Türk Biyokimya Derneği, Ankara (Nisan 2012- İzmir Şubesi Dernek Yönetim Kurulu Üyesi/Sayman)
2020-	Türk Biyokimya Derneği – Bilişim Komisyonu Üyeliği

H. DİĞER

2018	Yabancı Dil Puanı- İngilizce (Yökdil)	93,75
------	---------------------------------------	-------

8.4. Tezden Türetilmiş ve Yayınlanmak Üzere Dergiye Gönderilmiş Makaleler

Title: Downregulation of miR29b-2 is associated with hypertrophic scarring

Duygu Harmanci¹, Kocak Ayse², Demirdover Cenk³, Gul Akdogan-Guner⁴

¹ Department of Molecular Medicine, Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey

² Department of Medical Services, Tavşanlı Vocational School, Kütahya Health Sciences University, Kütahya, Turkey

³ Department of Plastic and Reconstructive Surgery, School of Medicine, Dokuz Eylul University, Izmir, Turkey

⁴Department of Medical Biochemistry, School of Medicine, İzmir University of Economics, İzmir, Turkey

Corresponding Author:

Duygu Harmanci, M.Sc.

Department of Molecular Medicine

Graduate School of Health Sciences

Dokuz Eylul University Health Campus, 35340, Inciralti, Izmir

E-mail: duyguharmanci@gmail.com

Abstract

Abnormal wound healing can result in hypertrophic scar formation. Hypertrophic scarring is a fibrotic pathology that continues to grow in the wound and its mechanism has not been fully elucidated. It is characterized by increased collagen accumulation. Therefore, targeting collagen synthesis may be the right approach for treatment. Evidence is emerging regarding the efficacy of miR29 family in fibrotic diseases and extracellular matrix proteins are dominant among target molecules. In this study, we examined the role of miR29 family in hypertrophic scars, HSP47 and LOX for collagen maturation and collagen synthesis through the TGF- β /Smad pathway. After determining miR29 expressions in hypertrophic scar tissues, we inhibited miR29 in primary hypertrophic scar fibroblasts and found a significant increase in its COL3A and HSP47 protein levels. The TGF- β signaling pathway was also activated by the suppression of miR29. TIMP-1 gene and protein levels were also increased. These findings indicate that miR29b-2 is effective in hypertrophic scar formation and this activity is related to the expression level of miR29b-2.

Keywords: hypertrophic scar; miR29 family; HSP47; LOX; TGF- β ; TIMP-1

INTRODUCTION

Wound healing is a normal biological process consisting of complex stages such as hemostasis, inflammation, proliferation and remodeling¹⁻³. Wounds may sometimes show excessive and irregular healing due to any problem that occurs in these stages^{4,5}. In this case, patients have to survive with large scars. Hypertrophic scar (HS) is an example of this condition. In its simplest definition, the hypertrophic scar is fibrous skin tissue that continues to grow within the wound boundaries^{6,7}. The underlying cause/causes of HS are still unclear⁸. Increase in collagen synthesis is the most prominent feature⁹. Research trying to explain the pathology of HS suggested the control of collagen synthesis as a key way to treat HS⁸⁻¹⁰.

MicroRNAs (miRNAs), which play an important role in post-transcriptional gene regulation, are small, non-coding RNAs¹¹. Although miRNAs are involved in many of the vital processes of cells, there has been increasing evidence that the expression loss or absence of some miRNAs is associated with various fibrotic disorders¹²⁻¹⁵. One of these miRNAs is the miRNA29 (miR29) family¹⁶. There are three main members of the miR29 family: miR29a, miR29b, miR29c. Particular attention to the miR29 family stems from the ability of family members to inhibit the synthesis

of extracellular matrix (ECM) proteins¹⁶⁻¹⁸. In the screening with the Targetscan program where miR29 family members have anti-fibrotic properties, it has been revealed that collagen has a large place in the possible target molecules of the family^{16,19,20}.

Collagen is the most abundant fibrous extracellular matrix protein in the body that can be synthesized in mature form²¹. Fibrotic processes are characterized by an increase in collagen biosynthesis in ECM²². Collagen biosynthesis is a multi-step process involving many intracellular and extracellular factors such as lysyl oxidase (LOX) and heat shock protein -47 (HSP47)²³. HSP47, a heat shock protein and molecular chaperone, binds to procollagen in the endoplasmic reticulum and plays an important role in the processing of procollagen²⁴. LOX, a copper-dependent amine oxidase, initiates collagen and elastin covalent cross-linking by catalyzing the oxidative deamination of lysine and hydroxylysine residues to aminoadipic semi-aldehydes²⁵. It is thought that miR29 family, in which collagen has a large place among target molecules, may also affect these essential molecules and may play a role in the formation processes of various fibrotic diseases^{19,24,26}.

In addition to collagen biosynthesis, the TGF- β /Smad signaling pathway, which is the most important signaling pathway in the pathogenesis of fibrosis-related diseases, has been shown to stimulate collagen synthesis in abnormal wound healing and excessive wound formation²⁷. While transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) increases the secretion, synthesis and transcription of ECM proteins, it reduces ECM degradation through two main mechanisms^{28,29}. In the first mechanism, TGF- β 1 inhibits matrix metalloproteinases (MMPs) responsible for ECM degradation; using the second mechanism promotes textual inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)^{29,30}. TGF- β 1 also has important effects on fibroblasts, which are observed as the main source of ECM production in organ fibrosis. This pathway is also an effective signaling pathway in the formation mechanisms of fibroproliferative scars, but the effect of the miR29 family on this pathway has not yet been fully elucidated³¹.

In light of all this information, the scientific questions of this study are: what is the presence of miR29 family members in hypertrophic scar tissues, what is the family's impact on collagen maturation and signaling pathways responsible for ECM synthesis in the hypertrophic scar? The hypothesis was formulated as: "miR29 family member/ members are less expressed in hypertrophic scar tissues, unlike normal tissue, and this difference affects collagen maturation and the functioning of the pathways responsible for ECM synthesis, thereby exacerbating fibrotic development". This study aims to examine the presence of miR29 family members: miR29-a, miR29-b-1, miR29-b-2, miR29-c in hypertrophic scars, and to evaluate the effect of the family on collagen maturation and the study of pathways responsible for ECM synthesis.

MATERIALS AND METHODS

Tissue Collection³²

This study was approved by the ethics committee of the Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University (283-SBKA EK). Five hypertrophic scars and 20 healthy control skin tissue samples were included in the study under the control DEU School of Medicine, Department of Plastic and Reconstructive Surgery. An informed consent form was received from all volunteers.

Quantitative PCR Analysis for hypertrophic scar and normal skin³³

Quantitative PCR (qPCR) method was used for the determination of miR29 family (miR29a, miR29b-1, miR29b-2 and miR29c) and U6 housekeeping gene expressions.

Qiazol reagent method (Qiagen, Germany) was used for the tissue homogenization. Total RNA of samples from five hypertrophic scars and 20 normal skin tissues were isolated using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). The concentration of total RNA was quantified using NanoDrop ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). cDNA synthesis was performed on the Thermal Cycler device (T100, BioRad, USA) at 37°C for 60 minutes and 95°C for 5 minutes using the miScript II RT Kit (Qiagen, Germany). miScript Primer Assays (Qiagen, Germany) and miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Germany) were used for qPCR analysis. U6 was chosen as the housekeeping-control gene. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to determine the relative miR29 family expression levels.

Establishment and Characterization of Primary Fibroblast Cell Culture^{34,35}

Explant culture method was used for the isolation of primary human hypertrophic scar and healthy skin fibroblasts. All tissues were washed with phosphate-buffered saline (PBS). Tissue culture flasks' bottom was covered with Fetal Bovine Serum (FBS). All tissues were cut into less than 1 mm² thickness pieces. Tissue pieces were adhered on the bottom of tissue culture flasks and added DMEM (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), 1% Penicillin/streptomycin (Gibco, USA), and 1% L-glutamine (Gibco, USA) at 37°C, 5% CO₂ and 95% saturated humidity. The fibroblast cells, which started to move around 7 days after incubation, became passageable after 14 days.

Immunohistochemistry was performed for the characterization of primary fibroblast cells. The cells were proven to be fibroblasts by staining with HSP47, one of the fibroblast markers. Cell culture specimen were fixed in cold methanol and permeabilized with 0.05% Triton X-100. It was blocked with the blocking solution (PBS containing 1% BSA) for 1 hour. 400 µL of HSP47 primary antibody (Santa Cruz, sc-13150) diluted 1:50 was added to the slides and left to incubate for 1 hour. Secondary antibody (m-IgGK BP-HRP, Santa Cruz, sc-516102) was also applied by diluting 1:50 in blocking solution and left

to incubate for 1 hour. Meanwhile, the mixture of DAB substrate and DAB solution was prepared in a 1: 1 ratio. After the blocking process, washing with PBS was done. The prepared DAB: DAB substrate mixture was added to the slides as 80 μ L and left for 10 minutes at RT. Washing procedures were carried out and slides were covered with mounting medium. The examination was done under a light microscope (Nikon Eclipse, C2).

Transfection: Silencing miR29b-2 using miR29 inhibitors

The miR29 inhibitors were obtained from Qiagen (Germany). According to the manufacturer's instructions, cells were transfected with inhibitors by Hiperfect Transfection Reagent (Qiagen, Germany) at a final concentration of 50 nM. After 72 hours, cells and supernatants were collected. Cell viability control after transfection was carried out by WST-1 test and transfection control by qPCR.

Western blot³⁶

Cells were lysed with radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer. The proteins (15 μ g) were separated by 10% and 8% SDS-PAGE and blotted with PVDF membranes. Then, the membranes were blocked with 7% milk/TBST or 5%BSA/TBST for 1 h and incubated with primary antibodies overnight at 4°C. The antibodies used in the analysis were as follows: anti-Col1A1 (1:250) (Santa Cruz, sc-59772), anti-Col3A1 (1:100) (Santa Cruz, sc-271249), anti-LOXL2 (1:100) (Santa Cruz, sc-293427), anti-HSP47 (1:250) (Santa Cruz, sc-13150), anti-fibronectin (1:100) (Santa Cruz, sc-8422), and anti- β -actin (1:500) (Santa Cruz, sc-47778). After washing with 0.5% PBST three times, the membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (m-IgGK BP-HRP, Santa Cruz, sc-516102) for 1 h at room temperature, and finally treated with an Electrochemiluminescence (ECL) reagent kit. The membranes were exposed to X-ray film to detect the protein bands.

Determination of Extracellular LOX Activity

After transfection, cell culture media were collected and centrifuged. Extracellular LOX enzyme activity in these supernatants was measured with the Lysyl Oxidase Activity Assay Kit (ab112139) (Abcam, UK). Since it is a fluorometric based assay, the measurement was made using an excitation wavelength of 540 and an emission wavelength of 590 nm.

Quantitative PCR Analysis³³

Aurum Total Mini Kit (BioRad, USA) was used for RNA isolation from primary fibroblasts cells. Concentrations and purity status of the obtained RNAs were determined spectrophotometrically using the Nanodrop device (Thermo, USA). The iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad, USA) was used for cDNA synthesis from RNAs of known concentration. Primer sequences designed were synthesized by Oligomer company (Turkey). Relevant primer sequences are given in Table 1. Besides, SsoAdvanced Universal Inhibitor Tolerant SYBR Green Supermix (BioRad, USA) was used for the qPCR analysis. GAPDH was chosen as the housekeeping-control gene. The 2- $\Delta\Delta C_t$ method was used to determine the related genes with TGF- β /Smad signaling pathway expression levels.

Table 1. Primer sequences

Gene	Sequence 5'-3'	Optimised Tm (°C)
TGF- β -Forward	TGGCGATACCTCAGCAACC	60
TGF- β -Reverse	CTCGTGGATCCACTTCCAG	
Smad-2-Forward	CCTTCAGTGC GTTGCTCAAGCATGTCATA	65
Smad-2-Reverse	AATGCTAATGAACAGAAGAGTTGTTACAT	
Smad-3-Forward	TGCGTCTCCAGTCATCTGTAAGAG	61
Smad-3-Reverse	TGAATGCAACTGACTACATAAACCAA	
Smad-4-Forward	GGGCAAGACTGCAAAC TTTTATAT	59
Smad-4-Reverse	AAATTCTCTATACAAAGTCACTGCCAAT	
Smad-7-Forward	CTGCAACCCCATCACCTTA	60
Smad-7-Reverse	CCAGAAGAAGTTGGGAATCTGA	
CTGF-Forward	GTTTGGCC CAGACCCA ACT	60
CTGF-Reverse	GGAACAGGCGCTCCACTCT	
TIMP-1-Forward	TTGTGGGACCTGTGGAAGTA	58
TIMP-1-Reverse	CTGTTGTTGCTGTGGCTGAT	

Determination of Extracellular TIMP-1 Protein Levels

Extracellular TIMP-1 protein levels were quantified by Human TIMP-1 ELISA Kit from YL Biont (China). All supernatants were diluted 1:2. Standard solutions (2000; 1000; 500; 250; 125; 62.5 pg / mL) were prepared as recommended by the kit manufacturer. Measurements were performed at 450 nm. A plot of absorbance versus concentration was obtained. From this standard curve, extracellular TIMP-1 protein concentrations in the samples were calculated in pg/mL.

Statistical Analysis⁷

Statistical analysis of the research findings was made using the 24.0 version of the Windows statistics program for SPSS. Experiments were conducted in three repetitions at three different times. The data are given in the form of mean standard error. Whether the data conformed to the normal distribution was determined by the Kolmogorov-Smirnov test. Comparisons between groups were made using the Kruskal Wallis test, and when the p values obtained from the Kruskal Wallis test were statistically significant, the Mann Withney U comparison test and Dunn's post-test were used. Spearman test was used for correlation analysis between findings. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

The expression of miR29 family

As shown in Fig. 1 (A and C), expression of miR29a and miR-29b-2 were found lower in hypertrophic scar tissues when compared to control tissues. The decrease in miR29b-2 expression in hypertrophic scar tissues was found to be statistically more significant ($p:0.009$).

Effect of miR29b-2 on collagen maturation in hypertrophic scar fibroblasts

Collagen maturation was evaluated, as collagen accumulation is one of the main indicators of skin fibrosis. According to the results of Western Blotting analysis, no significant change was found in the COL1A protein level in hypertrophic scar fibroblast cells with miR29b-2 suppression compared to non-transfected hypertrophic scar fibroblast cells, but a significant difference was found between hypertrophic scar fibroblast cells and healthy control fibroblast cells' COL1A protein levels ($p: 0.0054$) (Fig 2-A). Significant increase in COL3A protein level was demonstrated in hypertrophic scar fibroblast cells with miR29b-2 suppression compared to non-transfected hypertrophic scar fibroblast cells ($p: 0.0011$) (Fig 2-B). No significant change in fibronectin protein level was observed in hypertrophic scar fibroblast cells with miR29b-2 suppression compared to non-transfected hypertrophic scar fibroblast

cells (Fig 2-C). According to the results of Western Blotting analysis, a significant difference was found in the HSP47 protein level (in the direction of increase) in hypertrophic scar fibroblast cells with miR29b-2 suppression compared to non-transfected hypertrophic scar fibroblast cells (p : 0.0426) (Fig 2-D). There was no significant change in LOXL2 protein level in hypertrophic scar fibroblast cells with miR29b-2 suppression compared to non-transfected hypertrophic scar fibroblast cells (Fig 2-E). Representative film images are given in Fig 2-F. According to the fluorometric analysis of extracellular LOX enzyme activity, no significant difference was found in hypertrophic scar fibroblast cells with miR29b-2 suppression, although LOX enzyme activity increased compared to non-transfected hypertrophic scar fibroblast cells (Fig 3).

Effect of miR-29b-2 on TGF- β /Smad signaling pathway

Exploring further, the molecular mechanisms involved in the possible effect of miR29b-2 on hypertrophic scarring, we focused on the TGF- β /Smad signaling pathway. As shown in Fig. 4, the gene levels of TGF- β , Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, CTGF, TIMP-1 were determined. There was no significant difference in these genes among different groups. However, an increase in the expression of other genes except Smad7 was observed. Smad7 gene expression decreased. This may be related to the level of transfection of miR29b-2. These results indicate that the TGF- β /Smad signaling pathway and miR29b-2 work together in hypertrophic scarring.

The protein expression of extracellular TIMP-1

According to the findings of ELISA analysis, although an increase in extracellular TIMP-1 protein level was observed in hypertrophic scar fibroblast cells with miR29b-2 suppression compared to non-transfected hypertrophic scar fibroblast cells, no significant change was detected (Fig 5).

DISCUSSION

Scar formation is a complex biological process involving multiple cell signaling pathways and many different biomolecules³⁷. Disruptions in these processes can result in fibrosis³⁸. The counterpart of these fibrotic conditions in the skin is keloid and hypertrophic scars³⁹.

Hypertrophic scar is a hyperplastic disease caused by excessive wound healing after skin injury¹⁰. The most prominent clinical manifestation of hypertrophic scars is the fibrous tissue that continues to grow within the boundaries of the original wound and is characterized by fibroblast proliferation and excessive ECM deposition, although there is no irregular appearance. Often hypertrophic scars are difficult to detect at an early stage, and this often leads to the loss of optimal treatment time^{8,9}. More studies can provide much more information as there is not enough information about their formation mechanism. In addition, epigenetic changes are known to cause fibrotic diseases⁴⁰. miRNAs are post-transcriptional regulators of gene expression in health and disease states, and their deregulation plays

a role in fibrotic skin diseases. To date, miR21, miR-206, miR-23, miR-145, miR-17, miR-133 and miR-92 have been associated with skin fibrosis, particularly via the TGF- β / Smad signaling pathway^{13,15}. In recent years, miR29 family has also been added to these miRNAs. Target molecules of the miR29 family are mostly collagen and other ECM proteins. Considering that fibrosis is characterized by excessive collagen deposition, it can be said that miR29 has an important place in fibrotic diseases¹⁸.

This study is the first comprehensive study examining the possible antifibrotic activity of the miR29 family in fibroproliferative scars through collagen maturation and ECM synthesis. With this research, it has been shown that miR29 is less expressed than normal in hypertrophic scars, that is, low miR29 may have a fibrotic effect in the pathology of HS. MiR29b-2 suppression in hypertrophic scars caused an increase in HSP47, LOXL2 and COL1A protein and LOX enzyme activity. The increase in these parameters is a direct indicator that the increase in collagen synthesis in hypertrophic scars is associated with miR29b-2. Suppression of miR29 in hypertrophic scars also increased TGF- β /Smad pathway activity. TIMP-1 gene and protein levels increased with the increase of this activity. This suggests that miR29b-2 affects TGF- β , it stimulates TIMP-1, and this stimulus reflects on the protein level of TIMP-1 and tries to maintain the balance of this fibrotic process in itself, thus, the regular structure in hypertrophic scar histopathology. It may show that this may be the reason. Our results proved that suppression of miR29 exerts a fibrotic effect by increasing excessive collagen production in hypertrophic scars. This fibrotic activity has been demonstrated to be related to the TGF- β / Smad pathway activity.

In this context, when the literature is examined, Bi et al.³¹ showed that miR29 is less expressed in hypertrophic scar tissues compared to healthy tissue. Ning et al.⁴¹ also showed that expression of miR29b-1 in scar tissues was low compared to normal tissue. In our study, miR29b-2 expression was found to be lower in hypertrophic scars compared to normal tissue. Our findings regarding hypertrophic scar tissues are consistent with the literature. The number of studies reporting low expression of miR29 family members in fibrotic diseases such as cutaneous keloid and different organ fibrosis is increasing^{17,20,42-45}.

Fibrosis is characterized by excessive accumulation of ECM components as a result of an imbalance in the metabolism of ECM molecules. Collagen is the most dominant ECM proteins²². Therefore, collagen synthesis is important for understanding and treating fibrotic processes. Planning studies on collagen and essential molecules involved in collagen synthesis is a correct approach to understand the dynamics of fibrotic processes. Most of the target molecules of the miR29 family are collagen.

In this investigation, COL1A, COL3A, fibronectin, HSP47, LOXL2 and LOX enzyme activity related to collagen biosynthesis and fibrosis were investigated.

In the study we conducted, although an increase in COL1A protein level was observed in hypertrophic scar fibroblast cells compared to non-transfected hypertrophic scar fibroblast cells with miR29b-2 suppression, a significant difference was found between hypertrophic scar fibroblast cells and healthy control fibroblast cells. Bi et al.³¹ showed that miR29b suppression increased COL1A mRNA and protein levels in hypertrophic scar cells. Similarly, the interaction of miR29 and collagen has been demonstrated in different fibrotic diseases. With the suppression of miR29, protein and gene levels of COL1A1, COL3A1 and fibronectin, indicators of keloid, pulmonary, cardiac, and renal fibrosis, increased^{16,17,46,47}.

In our study, a significant difference in HSP47 protein level was determined in hypertrophic scar fibroblast cells with miR29b-2 suppression compared to non-transfected hypertrophic scar fibroblast cells. However, miR29b-2 suppression also increased HSP47 levels in control fibroblasts. A similar situation is valid for the LOXL2 protein level. Although the level of increase in other experimental groups did not differ significantly, it should still be considered that miR29 inhibition alters collagen synthesis in skin fibrosis and possibly triggers HSP47 and LOX. The difference between our results and the results of similar studies in literature will vary according to the level of suppression. The level of expression losses of miRNAs also changes the fibrotic level. miRNAs not only participate in the formation and development of various types of fibrosis, but their expression changes are closely related to the degree of fibrosis.

There is increasing evidence that HSP47 and LOX may be potential target genes of miR29^{25,48-50}. It has been shown that miR29a targets HSP47 in cervical squamous cell carcinoma⁵¹. HSP47 correlation with increased collagen expression often indicates a pathological condition. Increased HSP47 expression is encountered in conditions such as kidney, lung, and liver fibrosis, systemic sclerosis, keloid, and rheumatoid arthritis^{24,52}. In a study on liver fibrosis, miR29b has been shown to play a role in collagen maturation. In the same study, it was shown that overexpression of miR29b reduces LOX activity and HSP47 level¹⁹. Our findings are also consistent with this study in terms of skin fibrosis.

It is known that TGF- β / Smad signaling pathway, which is the most known ECM synthesis pathway, plays an important role in fibrotic diseases^{27,29}. Here Smad2, Smad3 and Smad4 are receptor Smads, while Smad7 is inhibitor Smad. Studies have shown that miR-29 can target TGF- β , thus enhancing ECM synthesis and supporting the fibrosis process^{31,44,53-56}. There was an increase in TGF- β , Smad2, Smad3, Smad4, CTGF and TIMP-1 gene levels and a decrease in Smad7 gene expression compared to those who were not transfected, but no significant change was found. We think that the level of transfection of miR29 achieved, possibly caused these results.

Our data showed that Smad7 expression is downregulated when the miR-29 expression is low, which may indicate that Smad7 is the negative target gene of miR29. Also, after down-regulation of miR29b-2 expression in hypertrophic scar-fibroblasts, Smad2 and Smad3 were activated and the expressions

of COL1A and COL3A also increased. Guo et al.⁵⁷ showed that overexpression of miR-29b inhibits the TGF- β / Smad / CTGF pathway, causing excessive scar formation. This information is also consistent with our findings.

When the literature is reviewed, many studies related to TGF- β and miRNAs are encountered. Zhou et al.⁵⁸ reported that profibrotic miR-21 and miR-200b are overexpressed in hypertrophic scars and reported that these miRNAs play a role in the pathogenesis of hypertrophic scars via TGF- β / Smad7 / zinc finger E-box-binding homeobox. In another study, Li et al.⁵⁹ showed that the miR-21 inhibitor suppressed hypertrophic scar growth in a mouse model. Also, down-regulation of miR 143-3p in hypertrophic scars is associated with the accumulation of COL1 / III and up-regulation of CTGF expression. Mu et al.⁶⁰ showed that overexpression of miR-143-3p inhibits the proliferation of hypertrophic scar fibroblasts and rapamycin induces apoptosis via the Akt / (mTOR) signaling pathway. Taken together, these results show that multiple miRNAs play a role in the pathogenesis of hypertrophic scars and their effects are predominantly mediated by TGF- β .

TIMPs are tissue inhibitors of MMPs. They are stimulated by TGF- β ⁶¹. Thus, they contribute to the protection of the balance of the ESM. In our study, no significant change was found in the TIMP-1 gene level in hypertrophic scar fibroblast cells with miR29b-2 suppression compared to non-transfected hypertrophic scar fibroblast cells. On the contrary, with miR29b-2-suppression, despite the increase in TIMP-1 protein level in hypertrophic scar fibroblast cells compared to non-transfected hypertrophic scar fibroblast cells, no significant change was detected. In other words, the increase in the gene level was reflected in the protein level. This suggests that miR29b-2 affects TGF- β , it stimulates TIMP-1, and this stimulation reflects on the protein level of TIMP-1 and this triggers this fibrotic process itself.

Taken together, our data showed that inhibition of miR-29 in hypertrophic scar fibroblasts stimulated TGF- β , thereby enhancing collagen I and collagen III, HSP47 and LOXL2 expression, LOX activity and eventually promoting the formation of skin fibrosis. MiR-29 upregulation can reverse the fibrotic phenotype of hypertrophic fibroblasts by TGF- β -associated collagen regulation, which could provide a potential therapeutic method for the treatment of this disease. In summary, our findings show that miR29 suppression in fibroproliferative scars activates the TGF- β signaling pathway, changing collagen maturation and synthesis, and decreasing degradation through TIMP-1 protein expression. This may be evidence that histopathological differences associated with fibrotic skin diseases may be associated with TIMP-1 expression. For all these reasons, this study provides an infrastructure for further studies in the future and a new theoretical basis and reference for the clinical treatment of hypertrophic scars.

CONCLUSION

This study is the first comprehensive study on the miR29 family and hypertrophic scars in medical literature so far, and the current studies support our findings. With this investigation, it has been shown for the first time that miR29b-2 suppression in hypertrophic scars increases collagen synthesis and maturation through the TGF- β /Smad pathway and by affecting HSP47, LOX protein and LOX activity. In addition, TIMP1 gene and protein levels are increased.

In light of the findings of the study, research that will be suitable for the future can be classified as follows:

- The design of new studies including the WNT / β -catenin pathway⁴², which is thought to work with the TGF- β / Smad pathway in fibrotic diseases, may contribute to the scientific literature.
- Targeting the miR29 family and the TGF- β / Smad pathway in fibrotic skin diseases may be an effective treatment strategy.
- Expression of the suppressed miRNAs in these diseases can be increased by using synthetic miRNA mimics.
- Animal models recommended for hypertrophic scars do not have a standardization, so animal models should also be researched for animal studies.

In conclusion, the findings we have obtained so far show that the miR29 family alters the collagen maturation by affecting HSP47 and LOX in hypertrophic scars and increases skin fibrosis by activating the TGF- β / Smad pathway and increasing TIMP-1 protein levels in disease pathogenesis.

Acknowledgement:

This project was supported by Dokuz Eylül University Research Funding Unit.

Conflict of interest:

There is no conflict of interest associated with this work.

REFERENCES

- (1) Guo, S.; DiPietro, L. A. Factors Affecting Wound Healing. *J. Dent. Res.* **2010**, *89* (3), 219–229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>.
- (2) Gonzalez, A. C. de O.; Costa, T. F.; Andrade, Z. de A.; Medrado, A. R. A. P. Wound Healing - A Literature Review. *An. Bras. Dermatol.* **2016**, *91* (5), 614–620. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>.
- (3) Goldberg, S. R.; Diegelmann, R. F. Wound Healing Primer. *Surg. Clin. North Am.* **2010**, *90* (6), 1133–1146. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.08.003>.
- (4) Diegelmann, R. F.; Evans, M. C. Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2004**, *9*, 283–289. <https://doi.org/10.2741/1184>.
- (5) Patel, S.; Maheshwari, A.; Chandra, A. Biomarkers for Wound Healing and Their Evaluation. *J. Wound Care* **2016**, *25* (1), 46–55. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.1.46>.

- (6) Köse, O.; Waseem, A. Keloids and Hypertrophic Scars: Are They Two Different Sides of the Same Coin? *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. Al* **2008**, *34* (3), 336–346. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2007.34067.x>.
- (7) Rahban, S. R.; Garner, W. L. Fibroproliferative Scars. *Clin. Plast. Surg.* **2003**, *30* (1), 77–89. [https://doi.org/10.1016/s0094-1298\(02\)00069-x](https://doi.org/10.1016/s0094-1298(02)00069-x).
- (8) Lian, N.; Li, T. Growth Factor Pathways in Hypertrophic Scars: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Implications. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *84*, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.010>.
- (9) Lee, H. J.; Jang, Y. J. Recent Understandings of Biology, Prophylaxis and Treatment Strategies for Hypertrophic Scars and Keloids. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030711>.
- (10) Gauglitz, G. G.; Korting, H. C.; Pavicic, T.; Ruzicka, T.; Jeschke, M. G. Hypertrophic Scarring and Keloids: Pathomechanisms and Current and Emerging Treatment Strategies. *Mol. Med. Camb. Mass* **2011**, *17* (1–2), 113–125. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00153>.
- (11) Lu, T. X.; Rothenberg, M. E. MicroRNA. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *141* (4), 1202–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>.
- (12) Ambros, V. The Functions of Animal MicroRNAs. *Nature* **2004**, *431* (7006), 350–355. <https://doi.org/10.1038/nature02871>.
- (13) Babalola, O.; Mamalis, A.; Lev-Tov, H.; Jagdeo, J. The Role of MicroRNAs in Skin Fibrosis. *Arch. Dermatol. Res.* **2013**, *305* (9), 763–776. <https://doi.org/10.1007/s00403-013-1410-1>.
- (14) He, Y.; Huang, C.; Zhang, S.; Sun, X.; Long, X.; Li, J. The Potential of MicroRNAs in Liver Fibrosis. *Cell. Signal.* **2012**, *24* (12), 2268–2272. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.07.023>.
- (15) O'Reilly, S. MicroRNAs in Fibrosis: Opportunities and Challenges. *Arthritis Res. Ther.* **2016**, *18*, 11. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-0929-x>.
- (16) Kriegel, A. J.; Liu, Y.; Fang, Y.; Ding, X.; Liang, M. The MiR-29 Family: Genomics, Cell Biology, and Relevance to Renal and Cardiovascular Injury. *Physiol. Genomics* **2012**, *44* (4), 237–244. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00141.2011>.
- (17) Cushing, L.; Kuang, P.; Lü, J. The Role of MiR-29 in Pulmonary Fibrosis. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **2015**, *93* (2), 109–118. <https://doi.org/10.1139/bcb-2014-0095>.
- (18) Ślusarz, A.; Pulakat, L. The Two Faces of MiR-29. *J. Cardiovasc. Med. Hagerstown Md* **2015**, *16* (7), 480–490. <https://doi.org/10.2459/JCM.0000000000000246>.
- (19) Zhang, Y.; Ghazwani, M.; Li, J.; Sun, M.; Stolz, D. B.; He, F.; Fan, J.; Xie, W.; Li, S. MiR-29b Inhibits Collagen Maturation in Hepatic Stellate Cells through down-Regulating the Expression of HSP47 and Lysyl Oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446* (4), 940–944. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.037>.
- (20) van Rooij, E.; Sutherland, L. B.; Thatcher, J. E.; DiMaio, J. M.; Naseem, R. H.; Marshall, W. S.; Hill, J. A.; Olson, E. N. Dysregulation of MicroRNAs after Myocardial Infarction Reveals a Role of MiR-29 in Cardiac Fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (35), 13027–13032. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805038105>.
- (21) Sorushanova, A.; Delgado, L. M.; Wu, Z.; Shologu, N.; Kshirsagar, A.; Raghunath, R.; Mullen, A. M.; Bayon, Y.; Pandit, A.; Raghunath, M.; Zeugolis, D. I. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **2019**, *31* (1), e1801651. <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>.
- (22) Weiskirchen, R.; Weiskirchen, S.; Tacke, F. Organ and Tissue Fibrosis: Molecular Signals, Cellular Mechanisms and Translational Implications. *Mol. Aspects Med.* **2019**, *65*, 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.06.003>.
- (23) Gordon, M. K.; Hahn, R. A. Collagens. *Cell Tissue Res.* **2010**, *339* (1), 247–257. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0844-4>.
- (24) Ito, S.; Nagata, K. Biology of Hsp47 (Serpin H1), a Collagen-Specific Molecular Chaperone. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *62*, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.11.005>.
- (25) Mäki, J. M.; Sormunen, R.; Lippo, S.; Kaarteenaho-Wiik, R.; Soininen, R.; Myllyharju, J. Lysyl Oxidase Is Essential for Normal Development and Function of the Respiratory System and the

- Integrity of Elastic and Collagen Fibers in Various Tissues. *Am. J. Pathol.* **2005**, *167* (4), 927–936. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61183-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61183-2).
- (26) Sauk, J. J.; Nikitakis, N.; Siavash, H. Hsp47 a Novel Collagen Binding Serpin Chaperone, Autoantigen and Therapeutic Target. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2005**, *10*, 107–118. <https://doi.org/10.2741/1513>.
 - (27) Lichtman, M. K.; Otero-Vinas, M.; Falanga, V. Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) Isoforms in Wound Healing and Fibrosis. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* **2016**, *24* (2), 215–222. <https://doi.org/10.1111/wrr.12398>.
 - (28) Meng, X.-M.; Nikolic-Paterson, D. J.; Lan, H. Y. TGF- β : The Master Regulator of Fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **2016**, *12* (6), 325–338. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>.
 - (29) Morikawa, M.; Derynck, R.; Miyazono, K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8* (5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021873>.
 - (30) Vander Ark, A.; Cao, J.; Li, X. TGF- β Receptors: In and beyond TGF- β Signaling. *Cell. Signal.* **2018**, *52*, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.09.002>.
 - (31) Bi, S.; Cao, C.; Chai, L.-L.; Li, S.-R.; Yang, D.-Y. Regulatory Mechanism of MiR-29 over TGF- β 1 and COL1 in Scar Cells. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2017**, *21* (10), 2512–2517.
 - (32) Grizzle, W. E.; Bell, W. C.; Sexton, K. C. Issues in Collecting, Processing and Storing Human Tissues and Associated Information to Support Biomedical Research. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers* **2010**, *9* (1–6), 531–549. <https://doi.org/10.3233/CBM-2011-0183>.
 - (33) Konieczny, A.; Ausubel, F. M. A Procedure for Mapping Arabidopsis Mutations Using Co-Dominant Ecotype-Specific PCR-Based Markers. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **1993**, *4* (2), 403–410. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1993.04020403.x>.
 - (34) Siengdee, P.; Klinhom, S.; Thitaram, C.; Nganvongpanit, K. Isolation and Culture of Primary Adult Skin Fibroblasts from the Asian Elephant (*Elephas Maximus*). *PeerJ* **2018**, *6*, e4302. <https://doi.org/10.7717/peerj.4302>.
 - (35) Kuroda, K.; Tajima, S. HSP47 Is a Useful Marker for Skin Fibroblasts in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Specimens. *J. Cutan. Pathol.* **2004**, *31* (3), 241–246. <https://doi.org/10.1111/j.0303-6987.2003.00166.x>.
 - (36) Burnette, W. N. "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Anal. Biochem.* **1981**, *112* (2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5).
 - (37) Mk, O. K.; Jp, R. Wound Healing. In *PubMed*; 2020.
 - (38) Watkins, S. A.; Zippin, J. H. When Wound Healing Goes Awry. A Review of Normal and Abnormal Wound Healing, Scar Pathophysiology, and Therapeutics. *J. Drugs Dermatol. JDD* **2008**, *7* (10), 997–1005.
 - (39) Xue, M.; Jackson, C. J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv. Wound Care* **2013**, *4* (3), 119–136. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>.
 - (40) Yao, H.-W.; Li, J. Epigenetic Modifications in Fibrotic Diseases: Implications for Pathogenesis and Pharmacological Targets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, *352* (1), 2–13. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.219816>.
 - (41) Tetrandrine induces microRNA differential expression in human hypertrophic scar fibroblasts in vitro <https://www.geneticsmr.com/articles/6016> (accessed Dec 20, 2020).
 - (42) Liu, Y.; Yang, D.; Xiao, Z.; Zhang, M. MiRNA Expression Profiles in Keloid Tissue and Corresponding Normal Skin Tissue. *Aesthetic Plast. Surg.* **2012**, *36* (1), 193–201. <https://doi.org/10.1007/s00266-011-9773-1>.
 - (43) Roderburg, C.; Urban, G.-W.; Bettermann, K.; Vucur, M.; Zimmermann, H.; Schmidt, S.; Janssen, J.; Koppe, C.; Knolle, P.; Castoldi, M.; Tacke, F.; Trautwein, C.; Luedde, T. Micro-RNA Profiling Reveals a Role for MiR-29 in Human and Murine Liver Fibrosis. *Hepatol. Baltim. Md* **2011**, *53* (1), 209–218. <https://doi.org/10.1002/hep.23922>.

- (44) Wang, B.; Komers, R.; Carew, R.; Winbanks, C. E.; Xu, B.; Herman-Edelstein, M.; Koh, P.; Thomas, M.; Jandeleit-Dahm, K.; Gregorevic, P.; Cooper, M. E.; Kantharidis, P. Suppression of MicroRNA-29 Expression by TGF- β 1 Promotes Collagen Expression and Renal Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **2012**, *23* (2), 252–265. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011010055>.
- (45) Maurer, B.; Stanczyk, J.; Jüngel, A.; Akhmetshina, A.; Trenkmann, M.; Brock, M.; Kowal-Bielecka, O.; Gay, R. E.; Michel, B. A.; Distler, J. H. W.; Gay, S.; Distler, O. MicroRNA-29, a Key Regulator of Collagen Expression in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum.* **2010**, *62* (6), 1733–1743. <https://doi.org/10.1002/art.27443>.
- (46) Yamada, Y.; Sugawara, S.; Arai, T.; Kojima, S.; Kato, M.; Okato, A.; Yamazaki, K.; Naya, Y.; Ichikawa, T.; Seki, N. Molecular Pathogenesis of Renal Cell Carcinoma: Impact of the Anti-Tumor MiR-29 Family on Gene Regulation. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* **2018**, *25* (11), 953–965. <https://doi.org/10.1111/iju.13783>.
- (47) Zhang, G.-Y.; Wu, L.-C.; Liao, T.; Chen, G.-C.; Chen, Y.-H.; Zhao, Y.-X.; Chen, S.-Y.; Wang, A.-Y.; Lin, K.; Lin, D.-M.; Yang, J.-Q.; Gao, W.-Y.; Li, Q.-F. A Novel Regulatory Function for MiR-29a in Keloid Fibrogenesis. *Clin. Exp. Dermatol.* **2016**, *41* (4), 341–345. <https://doi.org/10.1111/ced.12734>.
- (48) Harlow, C. R.; Wu, X.; van Deemter, M.; Gardiner, F.; Poland, C.; Green, R.; Sarvi, S.; Brown, P.; Kadler, K. E.; Lu, Y.; Mason, J. I.; Critchley, H. O. D.; Hillier, S. G. Targeting Lysyl Oxidase Reduces Peritoneal Fibrosis. *PLoS One* **2017**, *12* (8), e0183013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183013>.
- (49) López, B.; González, A.; Hermida, N.; Valencia-Serrano, F.; de Teresa, E.; Díez, J. Role of Lysyl Oxidase in Myocardial Fibrosis: From Basic Science to Clinical Aspects. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2010**, *299*, H1–9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00335.2010>.
- (50) Vallet, S. D.; Ricard-Blum, S. Lysyl Oxidases: From Enzyme Activity to Extracellular Matrix Cross-Links. *Essays Biochem.* **2019**, *63* (3), 349–364. <https://doi.org/10.1042/EBC20180050>.
- (51) Yamamoto, N.; Kinoshita, T.; Nohata, N.; Yoshino, H.; Itesako, T.; Fujimura, L.; Mitsuhashi, A.; Usui, H.; Enokida, H.; Nakagawa, M.; Shozu, M.; Seki, N. Tumor-Suppressive MicroRNA-29a Inhibits Cancer Cell Migration and Invasion via Targeting HSP47 in Cervical Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2013**, *43* (6), 1855–1863. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2145>.
- (52) Ito, S.; Nagata, K. Roles of the Endoplasmic Reticulum-Resident, Collagen-Specific Molecular Chaperone Hsp47 in Vertebrate Cells and Human Disease. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (6), 2133–2141. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.002812>.
- (53) Harmanci, D.; Erkan, E. P.; Kocak, A.; Akdogan, G. G. Role of the MicroRNA-29 Family in Fibrotic Skin Diseases. *Biomed. Rep.* **2017**, *6* (6), 599–604. <https://doi.org/10.3892/br.2017.900>.
- (54) Liang, C.; Bu, S.; Fan, X. Suppressive Effect of MicroRNA-29b on Hepatic Stellate Cell Activation and Its Crosstalk with TGF- β 1/Smad3. *Cell Biochem. Funct.* **2016**, *34* (5), 326–333. <https://doi.org/10.1002/cbf.3193>.
- (55) Zhang, Y.; Huang, X.-R.; Wei, L.-H.; Chung, A. C.; Yu, C.-M.; Lan, H.-Y. MiR-29b as a Therapeutic Agent for Angiotensin II-Induced Cardiac Fibrosis by Targeting TGF- β /Smad3 Signaling. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2014**, *22* (5), 974–985. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.25>.
- (56) Roy, S.; Benz, F.; Vargas Cardenas, D.; Vucur, M.; Gautheron, J.; Schneider, A.; Hellerbrand, C.; Pottier, N.; Alder, J.; Tacke, F.; Trautwein, C.; Roderburg, C.; Luedde, T. MiR-30c and MiR-193 Are a Part of the TGF- β -Dependent Regulatory Network Controlling Extracellular Matrix Genes in Liver Fibrosis. *J. Dig. Dis.* **2015**, *16* (9), 513–524. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12266>.
- (57) Guo, J.; Lin, Q.; Shao, Y.; Rong, L.; Zhang, D. MiR-29b Promotes Skin Wound Healing and Reduces Excessive Scar Formation by Inhibition of the TGF- β 1/Smad/CTGF Signaling Pathway. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2017**, *95* (4), 437–442. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0248>.
- (58) Zhou, R.; Zhang, Q.; Zhang, Y.; Fu, S.; Wang, C. Aberrant MiR-21 and MiR-200b Expression and Its pro-Fibrotic Potential in Hypertrophic Scars. *Exp. Cell Res.* **2015**, *339* (2), 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.018>.
- (59) G, L.; R, Z.; Q, Z.; B, J.; Q, W.; C, W. Fibroproliferative Effect of MicroRNA-21 in Hypertrophic Scar Derived Fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **2016**, *345* (1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.05.013>.

- (60) MicroRNA-143-3p inhibits hyperplastic scar formation by targeting connective tissue growth factor CTGF/CCN2 via the Akt/mTOR pathway | SpringerLink <https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-016-2699-9> (accessed Dec 20, 2020).
- (61) Thiele, N. D.; Wirth, J. W.; Steins, D.; Koop, A. C.; Ittrich, H.; Lohse, A. W.; Kluwe, J. TIMP-1 Is Upregulated, but Not Essential in Hepatic Fibrogenesis and Carcinogenesis in Mice. *Sci. Rep.* 2017, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00671-1>.
- (62) Kapinas, K.; Kessler, C. B.; Delany, A. M. MiR-29 Suppression of Osteonectin in Osteoblasts: Regulation during Differentiation and by Canonical Wnt Signaling. *J. Cell. Biochem.* 2009, 108 (1), 216–224. <https://doi.org/10.1002/jcb.22243>.

Figure Legends

Fig 1. Expressions of miR29 family members in hypertrophic scar (n = 5) and healthy skin tissues (n = 20). A) miR29a; B) miR29b-1; C) miR29b-2 and D) miR29-c (* p <0.05).

Fig 2. Inhibition of miR29b-2 increases collagen accumulation and maturation in hypertrophic scar fibroblasts. The expressions of collagen I, collagen III, fibronectin, HSP47, and LOXL2 were detected by western blot and the results of densitometric analysis were shown A) COL1A; B) COL3A; C) Fibronectin; D)HSP47 E) LOXL2 F) Film images (1:control, 2:control-miR29b-2 TR, 3:scar miR29b-2 TR, 4:scar). All data represents the mean±SEM. (* p <0.05).

Fig 3. Effect of miR29b-2 on LOX activity. No significant difference was found in hypertrophic scar fibroblast cells with miR29b-2 suppression, although LOX enzyme activity increased compared to non-transfected hypertrophic scar fibroblast cells. All data represents the mean±SEM. (* p <0.05).

Fig 4. Effect of miR-29b-2 on TGF-β/Smad signaling pathway. The gene levels of TGF-β, Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, CTGF, TIMP-1 (A-G) were determined with qPCR. GAPDH was used housekeeping control gene. There was no significant difference in these genes among different groups. However, an increase in the expression of other genes except Smad7 was observed. Smad7 gene expression decreased. All data represents the mean±SEM. (* p <0.05).

Fig 5. Effect of miR29b-2 on extracellular TIMP-1 protein level. Extracellular TIMP-1 protein levels were quantified as spectrophotometrically. An increase in extracellular TIMP-1 protein level was observed in hypertrophic scar fibroblast cells with miR29b-2 inhibition compared to non-transfected hypertrophic scar fibroblast cells, no significant change was detected. All data represents the mean±SEM. (* p <0.05).

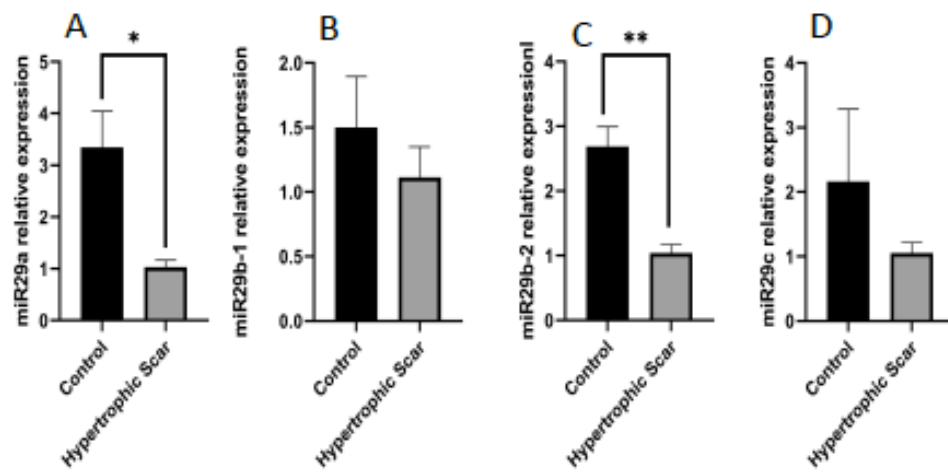
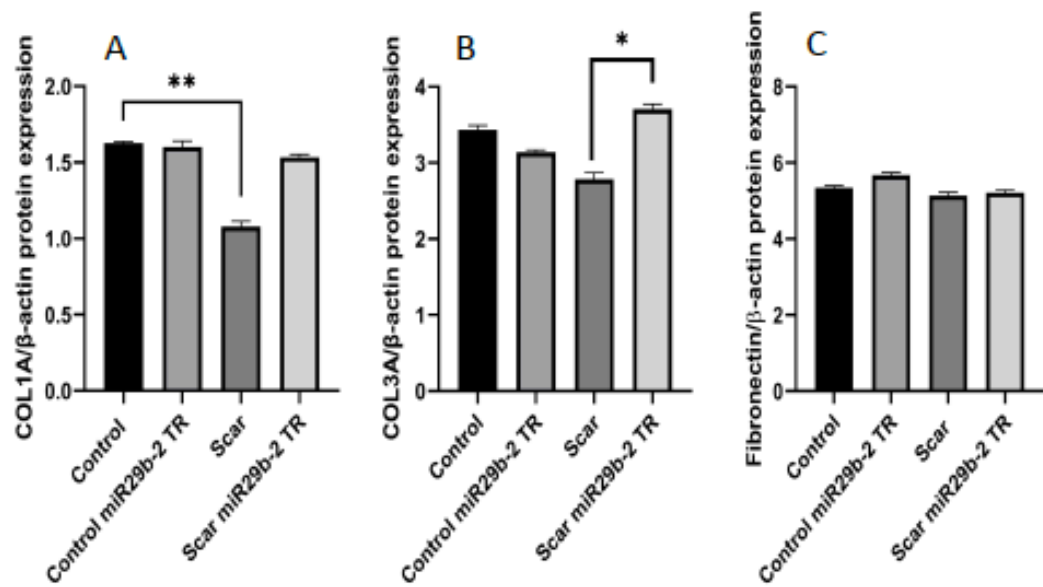


Figure 1



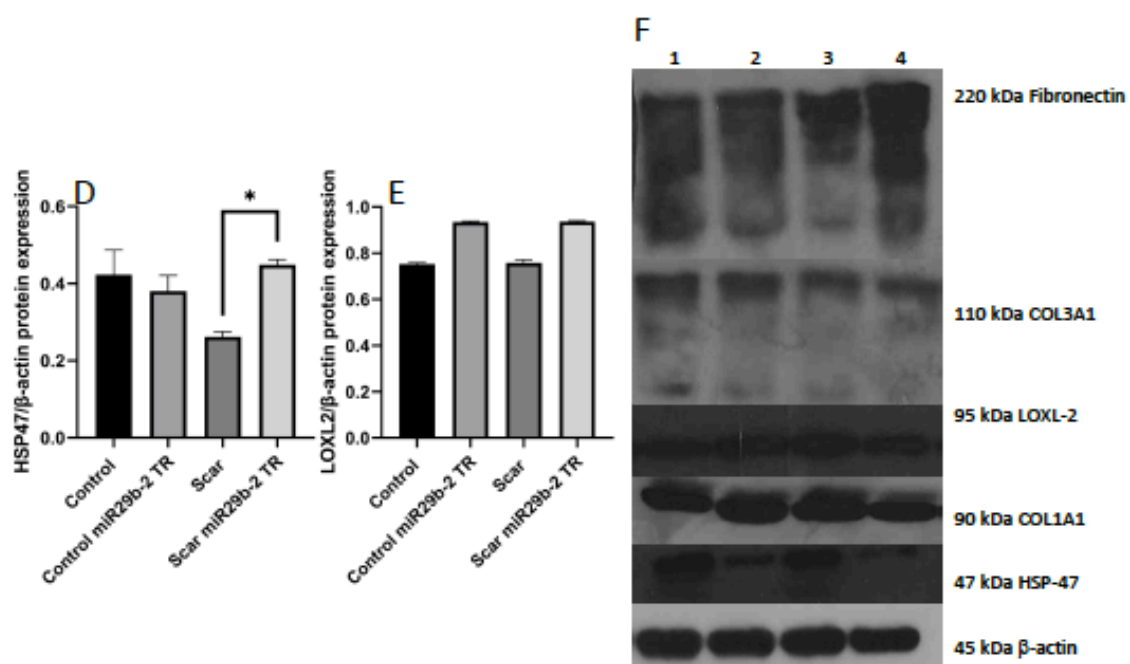


Figure 2

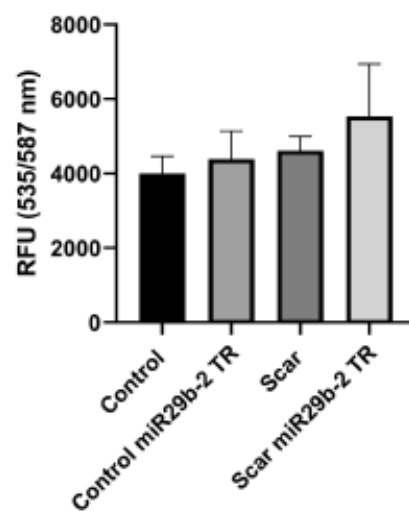
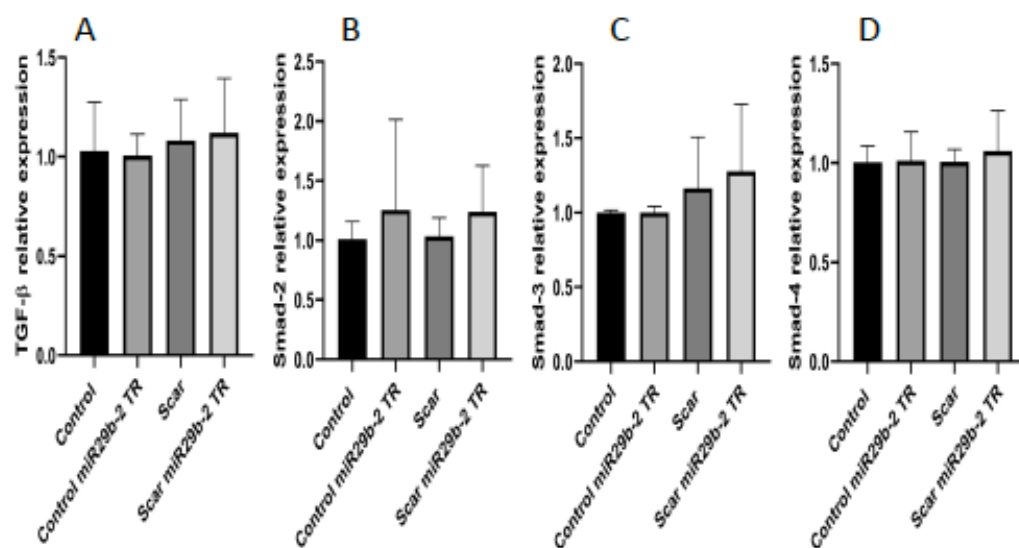


Figure 3



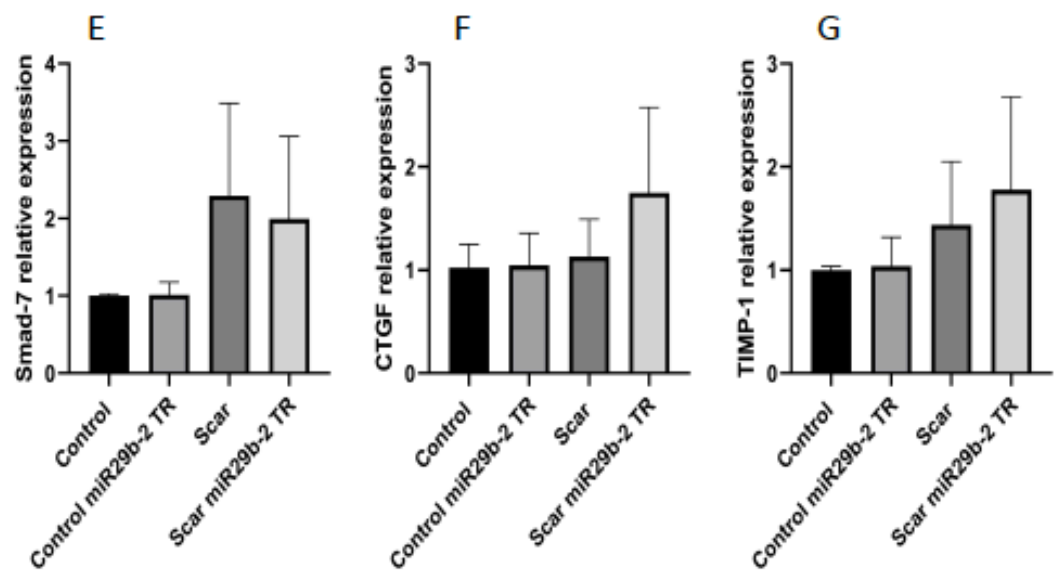


Figure 4

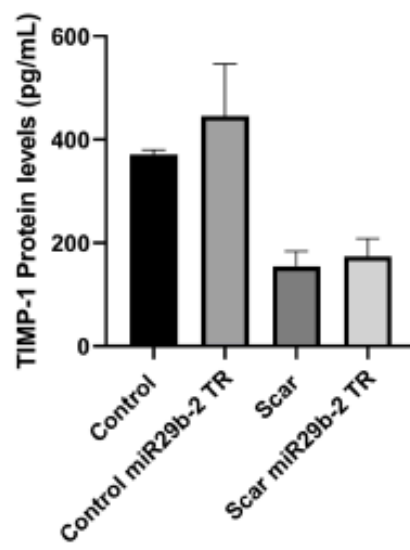


Figure 5

8.5. Tezle İlişkili Konularda Yayımlanmış Araştırma Makaleleri

8.5.1. Harmanci D, Uygun ZO, Demirdöver C, Girgin Sagin F, Akdoğan Guner G.

Rapid Fibroblast Cell Culture Characterization with Impedimetric Label-Free Heat Shock Protein 47 Biosensor. *Electroanalysis* (2020)

Full Paper

Wiley Online Library

ELECTROANALYSIS

DOI: 10.1002/elan.202060264

Rapid Fibroblast Cell Culture Characterization with Impedimetric Label-free Heat Shock Protein – 47 Biosensor

Duygu Harmanci,^[a] Zihni Onur Uygun,^[b] Ayşe Koçak Sezgin,^[a] Cenk Demirdöver,^[c] Ferhan Girgin Sagin,^[b] and Gül Akdoğan^[d]

Abstract: In this study, for the first time in literature, an impedimetric biosensor technology was developed to determine Heat Shock Protein-47 (HSP-47) for the characterization of primary skin fibroblast cells. Gold nanoparticle electrodes (GNPE) were modified with amino-functionalized graphene oxide layers and anti-HSP-47 were immobilized on this layer. The performance

of the biosensor was tested with real samples as cell lysates. The low detection limit (LOD) and the linear detection limit (LOQ) of the biosensor were calculated as 9.47 pg/mL and 3.23 pg/mL, respectively. Linear measurement range was obtained between 10–160 pg/mL HSP-47. The reproducibility of the biosensor was good.

Keywords: HSP-47 · impedance · gold nanoparticle · graphene · chronoimpedance

1 Introduction

Cell culture is a feasible method for many experimental studies in which three-dimensional organisms can't be used directly. Generally, it appears to be the first step before a study is moved to a three-dimensional organism, but it emerges as a primordial experimental model, especially when an existing animal model cannot be designed [1]. Any piece of tissue can be cultured to obtain specific cells either mechanically or enzymatically. Besides the subtleties of these cultural works, the most important thing to note in primary cultures is to characterize the cell community we are interested in from within a heterogeneous cell community so that experiments can continue through these cells. Skin biopsies are often used in the investigation and diagnosis of genetic diseases, but considering the invasiveness of the procedure, the use of fibroblast cultures from skin biopsies is preferred [2]. Especially in certain diseases, these cell cultures are very important for the scanning of a personal cellular phenotype. Fibroblast cultures are also an indispensable model of cellular senescence. When the skin tissue collected from a patient is cultured by enzymatic or mechanical means, it is observed that keratinocyte cells separate in the first seven days. The release of fibroblast cells from tissue takes place 7–10 days later. The important part here is to eliminate keratinocytes beside the fibroblast cells and to characterize the fibroblasts. In this study, Heat shock protein-47 (HSP-47) is determined to characterize fibroblast cells in cell cultures. HSP-47 is a collagen-specific molecular chaperon located in the endoplasmic reticulum; thus, it is a useful marker for fibroblasts that play an important role in collagen biosynthesis. This skin fibroblast biomarker is usually determined by a multi-step and traditional immunohistochemistry method [3]. These

methods are time and money consuming methods to identify HSP-47 in cell culture lines. Therefore, to detect HSP-47 in cell culture lysate, we designed a biosensor system that is empowered by amino graphene and gold nanoparticles to provide the sensitivity by enlarging the surface area. Afterwards, HSP-47 antibodies were immobilized to the surface for HSP-47 detection. Our newly developed selective biosensor is capable of detecting HSP-47 in picogram levels by using amino graphene (GPH-NH₂) modified gold nanoparticle screen printed electrodes (GNPE). Detection time was also tested by a new optimization method of chronoimpedance [4,5]. Thus, the cellular purity of primary fibroblast cultures can be checked quickly and with fewer cells. The affinity based biosensor was characterized by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS).

[a] D. Harmanci, A. Koçak Sezgin
Dokuz Eylül University, Graduate School of Health Sciences,
Molecular Medicine Department, Balçova, İzmir, Turkey
E-mail: duyguharmanci@gmail.com

[b] Z. Onur Uygun, F. Girgin Sagin
Ege University, Faculty of Medicine, Medical Biochemistry
Department, Bornova, İzmir, Turkey
E-mail: onur.uygun@ege.edu.tr

[c] C. Demirdöver
Dokuz Eylül University, School of Medicine, Plastic, Reconstructive and Aesthetics Surgery Department, Balçova, İzmir, Turkey

[d] G. Akdoğan
İzmir University of Economics, School of Medicine, Medical Biochemistry Department, Balçova, İzmir, Turkey

2 Materials and Methods

2.1 Materials

This study was approved by Izmir Economy University, School of Medicine Non-Interventional Ethical Committee by the approval number of B.30.2.İE/ÜSB.0.05.05-20-007. Primary fibroblasts cells were isolated from human skin tissue. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin/streptomycin, and 1% L-glutamine and split with 0.25 trypsin/EDTA in a ratio of 1:2 or 1:3 when confluency of % 80–90 was reached. We used phosphate buffer saline (PBS) for the washing and obtaining cell lysates. All cell culture materials were purchased from Cegrogen (Germany). The other chemical consumables used in this study were obtained from Merck (USA). PalmSens3 potentiostat was used as an electrochemical measurement system and PSTrace 5.8 software was used as a measurement interface (PalmSens B.V. Netherlands). Screen printed gold nanoparticle modified carbon electrodes were used as the working electrode to be used in the sensor system (DRP-110GNP, Dropsens, Spain) with platinum auxiliary electrode and silver/silver chloride as the reference electrode. All chemicals were prepared in double-distilled ultra-pure water. Cyclic voltammetry (CV) and Electrical Impedance Spectroscopy (EIS) measurements were performed in redox probe solution, which is 50 mM pH=7 phosphate buffer solution containing 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, 100 mM KCl. EIS parameters were 180 mV DC, 10 mV AC were applied in redox probe solution and the spectrum was taken in the frequency range of 10000–0.05 Hz. CV scanning was carried out in a redox probe solution between –0.2 and 0.5 V in 5 cycles at 100 mV/s scan rate. The EIS data was calculated by fitting impedance curves on the circuit model shown in Figure 1 (Figure 1).

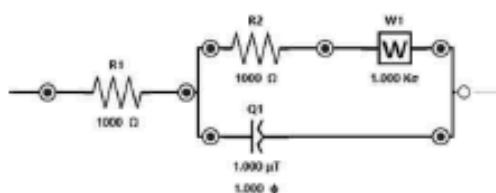


Fig. 1. Randles electrochemical impedance circuit model (Informed by PS Trace 5.7). Here R1; resistance of the redox probe, R2; the resistance of electrode surface, Q; double layer constant phase element of surface charge, W; mass transfer resistance.

2.2 Methods

2.2.1 Tissue collection, Cell Culture and HSP-47 detection by Enzyme Linked Immunoassay

Tissue collection was carried out aseptically with the contribution from the research group member who is a plastic & reconstructive & aesthetics surgeon [6]. Skin samples ($n=50$) were taken to avoid contamination. The skin tissues for cell line establishment (sized 0.5–2.0 cm^2) were placed in 15 mL falcon tubes with 5 mL of ice-cold tissue collection media (DMEM with 20% FBS, 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin) and were transported to the laboratory immediately. After transportation to the lab, tissue samples were placed in a Class II biosafety cabinet. Tissue samples were washed with cold PBS pH 7.4. Then they were dissected in a petri dish. Fat tissues were split out. Tissue samples were minced into 1–2 mm^2 pieces with sterile blades. These pieces were placed on Petri dishes which were covered with FBS. We left the tissue pieces to attach the Petri dishes. The complete cell culture medium was added dropwise onto the tissue pieces. The cells to be maintained at 37°C in 5% CO_2 incubator with 5 mL of complete cell culture medium for the first week were continued by adding 2 mL of media at the end of the first week. Fibroblast cells migrated out from the explant after 7–10 days. During these days the unattached explants, cells, and debris were removed and replaced with fresh culture media. When the cells were reached 80% confluence we passaged the cells with 2 mL of 0.25% trypsin-EDTA. After 5 min incubation at 37°C in 5% CO_2 incubator, the cell culture medium was added on the cells to inhibit the trypsin-EDTA activity. The cells were pelleted by centrifuging at 1500 rpm for 5 min and re-suspended in culture media and split to new flasks in a ratio of 1:2 or 1:3. For cryopreservation, fibroblast cells were re-suspended in 1 mL freezing medium (1:9 complete DMEM medium with DMSO). Cells were lysed with PBS (pH 7.4) using cell scraper and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. After centrifugation, supernatants were collected carefully. HSP-47 protein levels in the primary fibroblast cells' lysates were determined with commercial ELISA kits. Measurements were performed according to the manufacturer's instructions.

2.2.2 HSP-47 Biosensor Preparation and Characterization

First, gold nanoparticle electrodes were washed with distilled water and then dried under nitrogen gas flow. CV and EIS measurements were performed initially in the redox probe to determine the baseline. Then the electrode was activated by applying +1.6 V potential for 150 seconds electrochemically in a 1 M H_2SO_4 solution to form carbonyl groups (Uygun et al. 2020a) to bind amino graphene covalently. Afterwards, activated GNPE was incubated in EDC/NHS for 1 hour to chemically activate carbonyl groups. Subsequent wash and the dry process were followed by dropping 1 mg/mL amino graphene

solution on this electrode which is then incubated overnight in a humidified room temperature. The electrode was then washed with water to remove unbound GPH-NH₂ from the GNPE surface. GNPE/GPH-NH₂ modification was monitored by EIS and CV. Subsequently, GNPE/GPH-NH₂ electrode was incubated in a 5% glutaraldehyde solution for anti-HSP47 modification on the surface. Anti-HSP47 solution (1 mg/mL) was dropped on the surface and incubated at 4°C for overnight. All modification steps were investigated by CV and EIS. Moreover, HSP-47 detection optimization was carried out by chronoimpedimetric detection. Chronoimpedance parameters were set by configuring our previous studies, at which are 200 mV potential and 100 Hz frequency [4,5]. Afterwards biosensor characteristics and HSP-47 detection parameters were optimized and real samples were tested by the biosensor.

3 Results

Primary fibroblast cell cultures were established using different 50 collected skin tissues. These cells were advanced to a maximum of four passages. The images of the cells migrating out of the explants are shown in figure 2 (Figure 2). A total of 50 different tissues were collected for this study. Representative images of different cell cultures obtained from these different tissues collected were given in the text on the 14th day. As the tissue size changed, the number of cells obtained also changed. These representative images are the separation of the fibroblasts that are intended to be migrated from the tissue and their characteristic shuttle-shaped images.

HSP-47 has been commonly used to characterize a fibroblast (Kuroda and Tajima 2004). We analyzed the expression of HSP-47 on the primary fibroblast cells established from human skin tissue. HSP-47 expression was detected and confirmed for four passages. The electrochemically activated gold nanoparticle electrode (GNPE) was firstly characterized by CV and EIS in the

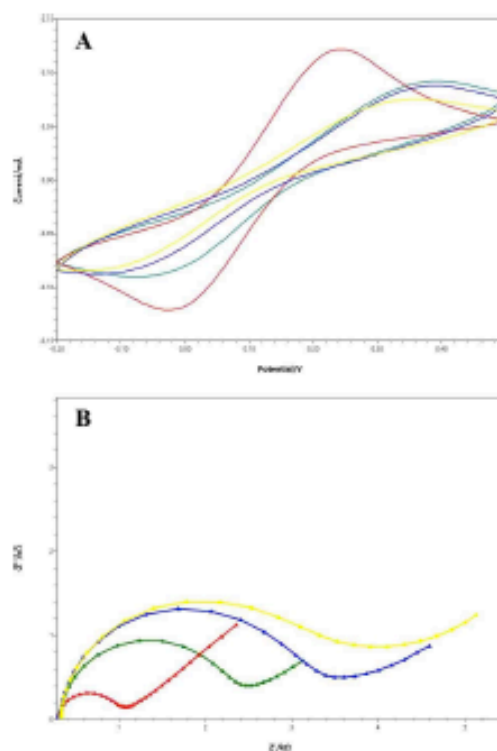


Fig. 3. CV (A) and EIS (B) curves that represents the electrode modification steps. Red; GNPE, Blue; activated GNPE, Green; GNPE-GPHOX-NH₂, Yellow; GNPE-GPHOX-anti-HSP47 electrode.

redox probe solution, then the electrode was modified by amino graphene and anti-HSP-47 respectively. Activation

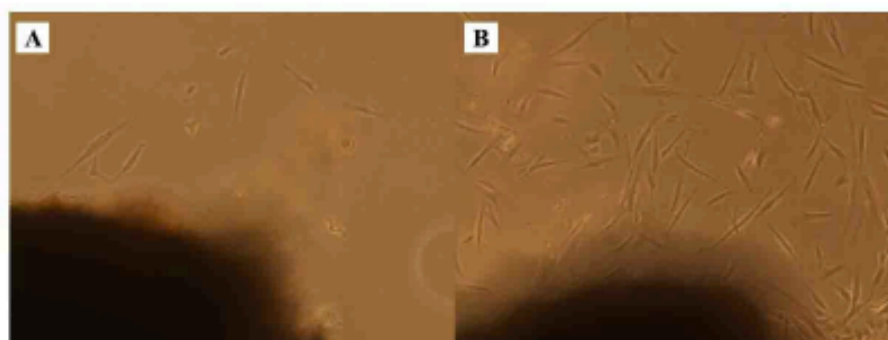


Fig. 2. Fibroblasts migrated from the explants (Day 1 (A) and Day 14 (B)): Images of fibroblasts from tissues taken on day 14 by the phase contrast microscope (20x magnification).

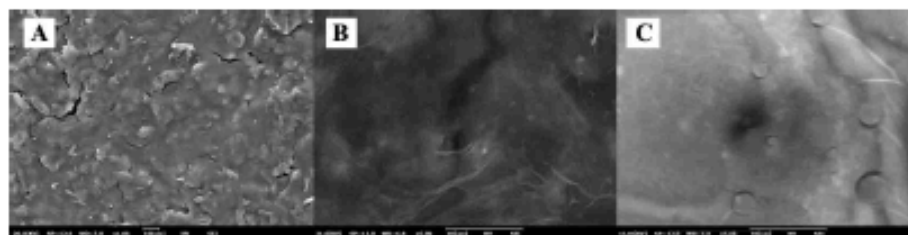


Fig. 4. SEM images of electrodes A: GNPE, B: GNPE-GPH, C: GNPE-GPH-anti-HSP-47

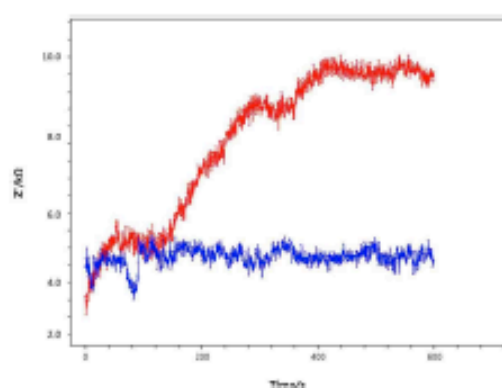


Fig. 5. HSP-47 biosensor response optimization study with chronoimpedimetric detection for 10 pg/mL. (Blue chronoimpedance; non-HSP47 included cell culture media, red, HSP-47 included cell culture media).

process of carbon gold nanoparticle electrode forms carboxyl groups, which are negatively charged in redox probe solution, and they repel the redox probe from surface. Therefore, less redox probe electrochemically transforms and releases less electrons move to towards the surface. This situation increases the electron transfer resistance [7]. On the other hand, amino graphene modification of the electrode decreases the electron transfer resistance of the surface by attracting redox probe with amino groups of the graphene. Afterwards anti-HSP47 binding increased the impedance and decreased the CV current peak as it formed a more insulating layer that increases the impedance (Figure 3A and Figure 3B).

Electrode modification layers were also investigated by scanning electron microscopy to confirm the formation of the electrode layers was also seen in the scanning electron microscope. In figure 4A, gold nanoparticles can be seen, after the modification of the graphene a hollow surface forms and gold nanoparticles can be seen under it (Figures 4A, B and C).

HSP-47 detection by Biosensor response was tested by using chronoimpedance, and calibration curve prepared

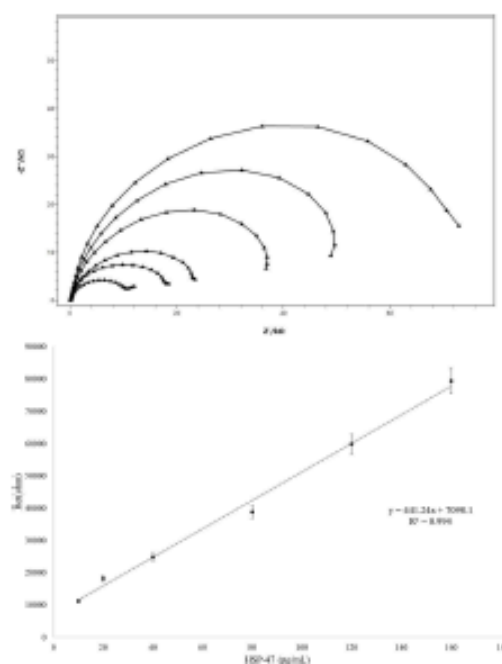


Fig. 6. A) EIS data (10–160 pg/mL HSP-47) obtained by performing EIS measurements, respectively, for the preparation of the calibration plot of the HSP-47 biosensor. B) Linear range graph (10 pg/mL–160 pg/mL HSP-47) obtained by standard concentration of HSP-47 against electron transfer resistance values of EIS measurement.

according to the chronoimpedance time signals (Figure 5.). In figure 5, (blue; non-HSP-47 included cell culture sample as baseline) after the incubation for 140 seconds, there is a dramatic increase of the HSP-47 binding to the surface (Figure 5, red line) and the curve forms a plateau after 280 seconds. Therefore, HSP-47 detection time of our biosensor is chosen as 280 seconds (~5 minutes).

After the electrode modification steps and the detection time optimization, the linear determination range of

Table 1. Characteristics of the HSP-47 biosensor by comparing ELISA and surface plasmon resonance (SPR).

Method	EIS	ELISA	SPR
Detection Time	280 Seconds	~70 Minutes	20 Seconds
LOD	3.2 pg/mL	5.1 ng/mL	2.4 µg/mL
LOQ	9.4 pg/mL	10 ng/mL	8 µg/mL
Linearity	10–160 pg/mL	10–2000 ng/mL	10–50 µg/mL
Reproducibility	$m = 441.24 \pm 0.06$ $R^2 = 0.994 \pm 0.002$	—	—
Repeatability	Intra Assay: <3.5 % Inter Assay: <3.8 %	Intra-Assay: <8 % CV Inter-Assay: <10 % CV	Null
Storage Stability	t=0 t=30 t=45	—	—
10 pg/mL	100 92 82	—	—
120 pg/mL	100 94 91.2	—	—
Recovery	154.04 ± 2.3 pg/mL	—	—
(Real sample 100 pg/mL + Spike 50 pg/mL)	<1.5 % CV	—	—
Reference	This study	Commercial Kit	[8]

the electrode was tested by obtaining EIS curves (Figure 6A) and fitting the impedance data on the circuit model and calculated surface transfer resistance (R_2) and standard concentrations curve of the biosensor using HSP-47 (Figure 6B).

All characterizations and comparison data are given in Table 1. Six calibration curves were prepared to investigate the reproducibility of the biosensor. Standard deviations (SD) of slope (m) and regression coefficient (R^2) of the biosensor were calculated and percentage changes are given. Slope (m) with SD was 441.24 ± 0.06 , and R^2 with SD was 0.994 ± 0.002 . Afterwards, the detection limit (LOD), the linear detection limit (LOQ) of the calibration curves were tested. For $LOD = 3.3$ (S/m) formula, for $LOQ = 10$ (S/m) formula was used for LOQ calculation. S is the standard deviation of the resistance result values given by the measured standard and m is the slope of the linear calibration curve. A standard sample of 10 pg/mL for the LOD and LOQ value was tested 5 times, where the standard deviation from the impedance data of these three samples was calculated as 417.77 ohms ($n_1 = 11742$ ohm, $n_2 = 12253$ ohm, $n_3 = 12463$ ohm, $n_4 = 11962$ ohm, $n_5 = 12852$ ohm). Accordingly, LOQ was calculated as 9.47 pg/mL and LOD as 3.23 pg/mL. LOQ is very close to the calibration curve that acknowledges the lowest linear detection range. Repeatability for the 10 pg/mL standards was also tested by this experiment and it was found as 10 ± 0.356 pg/mL. Stability tests were performed using relative signal changes given by the GNPE-GPH-anti-HSP-47 electrode against 10 pg/mL and 120 pg/mL HSP-47 measurements. The biosensor was kept for 30 and 45 days at 4°C and results are given as the relative concentrations found (Table 1). Accordingly, the long-term storage of the electrode in measurements taken at low concentrations of performance decreases by more than 10%. Real samples were selected randomly with two different cell culture lysates and measured in triplicate each to assess real sample repeatability and inter-assay which is found as inter assay: 102.2 ± 3.64 (<3.56 % CV).

The regression analysis of the biosensor and the ELISA kit was found as 0.9633 ± 0.0085 . Recovery studies were carried out by adding 50 pg/mL in real sample (Real sample 100 pg/mL + Spike 50 pg/mL) and the concentration of the HSP47 was found as 154.04 ± 2.37 pg/mL (<1.54 % CV).

4 Conclusions

This biosensor reflects that the detection of the HSP-47 can be very useful for the cell culture characterizations for fibroblast developments. The impedimetric biosensor system developed is able to determine the HSP-47 in the cell culture lysate to analyze fibroblast formation with good analytic performance. The use of the graphene layer on the gold nanoparticle increased the sensitivity allowing a wider surface for the antigen-antibody interaction. According to our data from the calibration curve, the regression coefficient (R^2), which shows the suitable linearity of the modified HSP-47 biosensor with anti-HSP-47, was found to be very close to the ideal value of 1. The fact that the linear range is at picogram levels indicates the ultra-high sensitivity of the system. As known, LOQ value is the mathematical value close to the point where the calibration curve starts. Since the LOQ value of our setup is 9.47 pg/mL (close to the 10 pg/mL level), the experimental results are also demonstrated mathematically and the high selectivity of the biosensor. The standard deviation of 3.36% was observed in the repeatability test, which indicates good reproducibility. As a result, the chronoimpedimetric biosensor system we developed can successfully determine the human primary fibroblast cell biomarker; HSP-47 which is a crucial step in the characterization of fibroblasts. The fast analysis time and the good performance of the biosensor adds value to our system, which is promising in future fibroblast cell culture studies.

Acknowledgement

We are grateful to thank The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) for supporting our TÜBİTAK-1005 project with the project number of 118S595.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

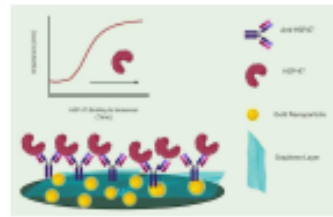
- [1] Y. A. Barnett, C. R. Barnett, V. J. Cristofalo, C. Volker, R. G. Allen, in *Aging Methods and Protocols*, Humana Press, 2003, pp. 23–52.
- [2] P. Stevenson, K. Rodins, *Aust. J. Gen. Pract.* **2018**, *47*, 216–220.
- [3] K. Kuroda, S. Tajima, *J. Cutaneous Pathol.* **2004**, *31*, 241–246.
- [4] Z. O. Uygun, L. Yeniyay, G. Sağın, Ferhan, *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1121*, 35–41.
- [5] H. D. Uygun, Z. Onur, E. Uygun, *Electroanalysis* **2019**, 1–5.
- [6] M. Vangipuram, D. Ting, S. Kim, R. Diaz, B. Schüle, *JoVE* **2013**, 1–3.
- [7] Z. O. Uygun, H. D. Ertugrul Uygun, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *202*, 448–453.
- [8] T. Natsume, T. Koide, S. I. Yokota, K. Hirayoshi, K. Nagata, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 31224–31228.

Received: July 10, 2020

Accepted: July 10, 2020

Published online on ■■■, ■■■

FULL PAPER



D. Harmanct, Z. Onur Uygun*, A. Koçak Sezgin, C. Demirdöver, F. Gırgın Sağın, G. Akdoğan*

1 – 7

Rapid Fibroblast Cell Culture Characterization with Impedimetric Label-free Heat Shock Protein – 47 Biosensor

8.52. Kocak Ayse, Harmanci Duygu, Akdoğan- Guner G, Birlik M. Relationship of Wnt pathway activity and organ involvement in scleroderma types. International Journal of Rheumatic Diseases 2020; 00:1-10.

Received: 18 May 2020 | Revised: 6 August 2020 | Accepted: 2 September 2020

DOI: 10.1111/1750-185X.15975

ORIGINAL ARTICLE

International Journal of
Rheumatic Diseases



WILEY

Relationship of Wnt pathway activity and organ involvement in scleroderma types

Ayşe Koçak¹ | Duygu Harmancı² | Gül Güner Akdoğan³ | Merih Birlik²

¹Kütahya Health Sciences University,
Kütahya, Turkey

²Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey

³İzmir University of Economics, İzmir, Turkey

Correspondence

Ayşe Koçak, Kütahya Health Sciences
University, Kütahya, Turkey.
Email: kocak.ayse@gmail.com

Funding Information

TÜBİTAK, Grant/Award Number: 1175597

Abstract

Objective: Scleroderma (SSc) is a chronic inflammatory autoimmune disease characterized by fibrosis in the skin and internal organs. In SSc, the heart, lung, kidney, gastrointestinal (GIS) system, muscle, and peri-articular structures are damaged. There is no study of the relationship between SSc type, stage, pathogenesis, organ involvement, and Wnt signaling. In this study, we aimed to show the relationship of the Wnt gene family and antagonists in SSc subtypes and different organ involvement.

Methods: Eighty-five SSc patients and 77 controls were included in this study. The gene expressions and protein levels of the Wnt family and antagonists were analyzed from blood samples. The relationship between these parameters and disease stage, type, and organ involvement were evaluated.

Results: Wnt-1, Wnt-10b, Wnt-2, and Wnt-6 gene expressions are increased and Axin-2, DKK-1, and Kremen protein expressions are decreased in SSc. Wnt-3a and Wnt-10a gene expressions are increased in generalized SSc compared to limited SSc. Wnt-1, Wnt-2 gene expressions are increased significantly in pulmonary arterial hypertension (PAH)(+) SSc compared to PAH(-) SSc. There was a positive correlation between the modified Rodnan skin score and Wnt-2 in SSc. There was a significant positive correlation between GIS involvement score and Wnt-1, Wnt-2, Wnt-4, Wnt-8a, Wnt-9b in SSc.

Conclusion: Wnt-1 and Wnt-2 were found higher in scleroderma and organ involvement. They may play a role in the pathogenesis of the disease.

KEYWORDS

organ involvement, scleroderma, Wnt antagonists, Wnt signaling pathway

1 | INTRODUCTION

Scleroderma (SSc) is an autoimmune disease affecting skin and different internal organs.¹ It is a rare disease with a prevalence ranging from 31 to 659 per million.² As with many other autoimmune diseases, women are at higher risk than men.³⁻⁴ Three main mechanisms are responsible for clinical and pathological progression. These are vascular damage (especially microcirculation), inflammation and

fibrosis with immune system activation. In SSc, dermis thickening and extracellular matrix (ECM) increase are observed.⁵⁻⁷ Clinically SSc is a heterogeneous disease in which different autoantibodies are observed in different clinical subgroups and can be easily detected with skin involvement.^{8,9}

There is no biomarker or laboratory test for SSc diagnosis, and various classification criteria have been proposed. American College of Rheumatology (ACR)/ European League Against

Rheumatism (EULAR) classification criteria were published in 2013, in which important organ involvements, as well as autoantibodies and capillaroscopy findings, were taken into account.⁸ There are 2 types of SSc; the first is limited systemic sclerosis (lcSSc). Skin involvement is limited to the distal of the elbow and distal of the knee and the face. Pulmonary arterial hypertension (PAH) can be seen in lcSSc.⁸ The second type is diffuse systemic sclerosis (dcSSc, generalized). In diffuse SSc, body, hands, face, and feet are involved. In diffuse SSc, crepitation in tendons, a higher rate of pulmonary fibrosis and gastrointestinal involvement, SSc renal crisis, heart failure, and cardiac arrhythmia can be seen.^{9,10} The degree of skin fibrosis is calculated using the modified Rodnan skin score (MRSS) of 0–3 in 17 body areas and the maximum score is 51.

Many molecular pathways play an active role in SSc, and the relationship of all these pathways is very complex. Activated fibroblasts play a key role in skin fibrosis and other fibrosis diseases. During the transformation of fibroblasts into myofibroblasts, the change of phenotype is accomplished by the expression of alpha-smooth muscle actin protein.^{4,7} Extracellular matrix (ECM)

proteins, especially collagen, are released and accumulate.¹¹ In the physiological tissue process, myofibroblast differentiation is checked and repaired.¹² In the abnormal tissues, collagen accumulation affects physiological processes in the ECM and tissue. This pathogenesis is seen among autoimmune rheumatological diseases, especially SSc.

In recent years, studies on Wnt pathway molecules have shown that they are responsible for fibroblast activation in fibrotic diseases such as pulmonary fibrosis, renal fibrosis, liver fibrosis, dermal fibrosis and SSc.^{13–27} The canonical Wnt pathway plays an important role in the pathophysiology of SSc. This pathway is related to the transforming growth factor (TGF)- β signal pathway, collagen synthesis, and ECM relationship. In experiments in fibroblast cultures created with skin samples taken from SSc patients, Wnt-1 and Wnt-10b expressions increased. Further, Wnt-1 and Wnt-10b expressions were found to be reduced by the administration of Dickkopf 1 (DKK-1), secreted frizzled-related 1 (SFR-1) and Wnt inhibitory factor 1 (WIF-1) endogenous inhibitors.^{13,18,19} In renal fibrosis, dermal thickness and myofibroblast differentiation have been shown to decrease with the application of endogenous inhibitor DKK-1.²⁰

TABLE 1 A. Primers and B. qPCR reaction mix

(A)		
Gene	Primer forward 5' to 3'	Primer reverse 5' to 3'
Wnt-1	CTC CAC GAA CCT GCT TAC AGA	GCT CGA GTA CCA GTT GCA GA
Wnt-2b13	TGC AGC AAG ACA TCA AAA GG	CCA CAG CAC ATG ATT TCA CA
Wnt-2	CTA CGA CAC CTC CCA TGT CA	GGA ACT TAC ACC CAC ACT TGG T
Wnt-3a	TCC TCA AGG ACA AGT ACG ACA G	GTG CTT CTC CAC CAC CAT CT
Wnt-4	CAG AGG CAG GTG CAG ATG T	ACC GAG TCC ATG ACT TCC AG
Wnt-6	GCA TCC TGC AAC AGG ACA T	AGT GAT GGC GAA CAC GAA G
Wnt-7a	CGA AAG ATC CTG GAG GAG AAC	ACG CCG TGG CAC TTA CAT
Wnt-7b	AAG CCC ATG GAG ACA GAC C	CAG TAG TTG GGC GAC TTC TCA
Wnt-8a	ACG GTC AAG TGT GAC CAG TG	GCG CAG TAA TAC TTG CTC AC
Wnt-8b	TTC CTG ATG ACT GGT CCA AAG	GCC ACA CTG CTG GAG TAA ATC
Wnt-9b	TGA AAC TGC GCT ATG ACT CG	CTC ATT GGT GGC ACT GGA C
Wnt-10a	GTC CCA TCT TCA GCA GAG GT	GAT GGC GTA GGC AAA AGC
Wnt-10b	CTG GTG CTG CTA TGT GCT CT	TCA CCC ACT CTG TAA CCT TGC
Wnt-16	TGA AAG CAT GAC TGA TGT CCA	AGG CTG GAT GGA GTG GTT ACT
AXIN-2	CAG GAC CCA CAT CCT TCT	ACG CGG AGG TGC ACG CGG
(B)		
Mix	Volume	Concentration
SYBR Green qPCR Master Mix	5 μ L	1x
Forward primer (10 μ L)	0.3 μ L	0.3 μ mol/L
Reverse primer (10 μ L)	0.3 μ L	0.3 μ mol/L
Complementary DNA	2 μ L	200 ng
Nuclease free water	2.4 μ L	
Total volume		

Promoter hypermethylation of DKK-1 and SFR protein (SFRP)-1, Wnt pathway antagonists, reduces expressions. In vivo studies showed increased expression of 2 antagonists and increased dermal thickness.¹⁸ In an in vitro experiment, the collagen modeling of the Wnt pathway showed a role in the movement and proliferation of normal fibroblasts.²¹ Since pharmacologically inhibited glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3- β) cannot phosphorylate the β -catenin, dermal fibrosis has been observed.²² Further, in dermal biopsies, the Wnt/ β -catenin pathway is hyperactive and has a Wnt-3a effect on the Smad-dependent TGF- β signal pathway in myofibroblast differentiation.²⁴ Fibrosis is decreased by inhibiting the Wnt-canonical and Wnt-non-canonical pathways.²³ It is known that TGF- β and canonical Wnt signaling pathways work together and interact with each other in SSc.¹⁵

When the dermal samples from SSc patients and healthy individuals were compared, it was observed that the accumulation of nuclear β -catenin, characterized by the activation of the Wnt signal pathway, increased in SSc patients.^{13,24} Hamburg-Shields et al showed there

is a relationship between β -catenin overexpression and an increase of ECM genes in dermal fibroblasts.²⁶ In vitro recombinant Wnt-1 and Wnt-3a experiments, fibroblast differentiation was induced and increased the release of ECM proteins.²⁵ Also, they determined that hydroxyproline accumulation, dermal thickness, and increased myofibroblast depend on Wnt-10b overexpression.²⁵ Rituximab played the role of DKK-1 upregulation and fibrosis was significantly decreased.²⁶ Tankyrase inhibitors provided axin stabilization in the Wnt pathway and stimulated the degradation of β -catenin. In a study on these inhibitors, it was found that the Wnt pathway was inhibited, suggesting an "anti-fibrotic role" for these inhibitors.²⁷

Approximately 90% of patients with SSc have gastrointestinal system (GIS) involvement. Half of the GIS involvement is symptomatic. It has shown that the entire gastrointestinal tract can be involved, from mouth to anus.^{20,29}

The results of the literature survey discussed above provide no data on the relationship of SSc types with organ involvement with the components of the Wnt signaling pathway. In our study, the activity of the Wnt signal pathway family and antagonists were examined in SSc types with organ involvement.

TABLE 2 Patients' overview

(A)			
Description	Mean $\pm$ SD Median $\pm$ (min-max)		
Age	54.8 $\pm$ 12.1 58 (22-80)		
Gender	n (%)		
Women	76 (89.4%)		
Men	6 (10.6%)		
Systemic sclerosis subgroups	n (%)		
Limited	53 (63%)		
Generalized	32 (37%)		
Pulmonary arterial hypertension (PAH)	n (%)		
PAH(+)	6 (7.1%)		
PAH(-)	76 (92.9%)		
(B)			
	Limited SSc	Generalized SSc	P value
Age (mean)	55.0	54.5	.98
Diagnosis year (mean)	2009	2007	.04
Raynaud syndrome duration (months, mean)	163	153	.62
PAH (mean)	0.05	0.09	.52
GIS involvement score (mean)	1.08	1.5	.02
MRSS (mean)	3.32	13.19	.00
Disease severity score (mean)	5.17	7.5	.00

Abbreviations: GIS, gastrointestinal system; MRSS, modified Rodnan skin score; PAH, pulmonary arterial hypertension; SSc, systemic sclerosis.

* $P < .05$.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patient and control groups

This study was approved by the ethics committee of the Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University (DEU: 321-SBKAEK). Control and SSc patient groups were included in the study under the following criteria in DEU School of Medicine, Department of Rheumatology-Immunology.

Eighty-five SSc patients and 77 control patients were included in the study.

2.1.1 | Inclusion criteria

- Patients diagnosed with SSc according to 2013 ACR/EULAR criteria
- Women and men over the age of 18
- GIS involvement and PAH + SSc patients

(SSc patients who have used calcium channel blockers, pentoxifylline, acetylsalicylic acid and gastric protector proton pump inhibitors, calcium, and replacement therapy, dihydroxy-chloroquine were included in the study.)

2.1.2 | Exclusion criteria

- Those with another systemic chronic autoimmune disease
- Patients using prednisolone and equivalent corticosteroids with a daily dose of 10 mg or more

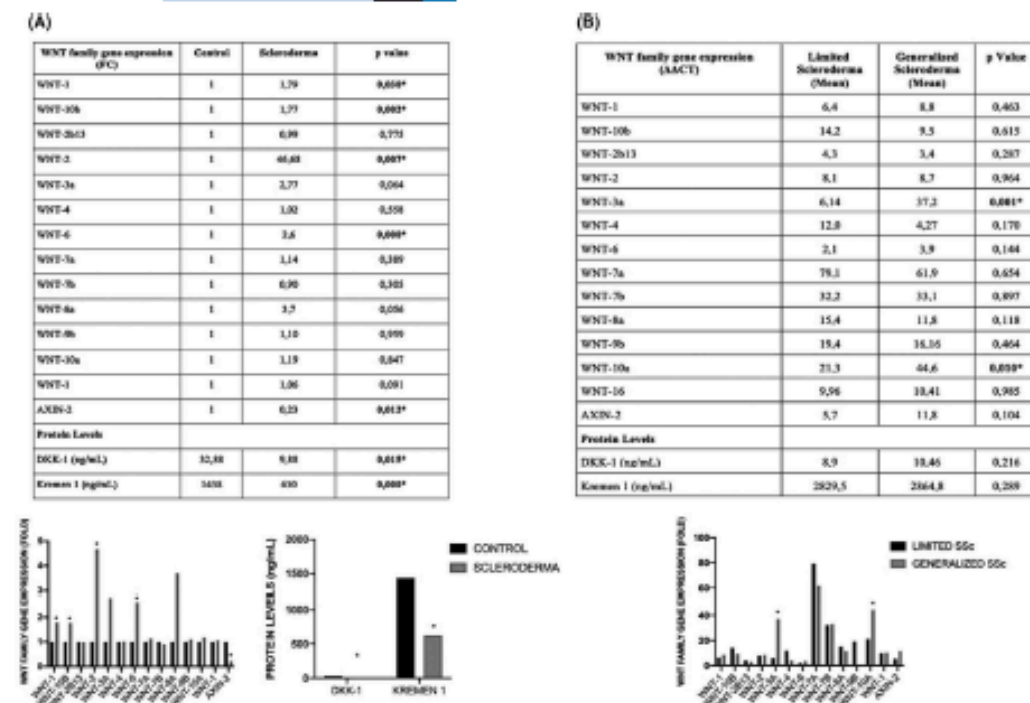


FIGURE 1 Wnt gene expression fold changes and protein levels. A, Control and systemic sclerosis (SSc) patients B, Limited SSc and generalized SSc patients

2.1.3 | Restriction criteria

- Patients with active infections in any organ (therefore, taking antibiotics) were included in the study after at least 1 month.
- Those with acute myocardial infarction, major trauma, trauma resulting in fracture or those who underwent major surgery were not included in the study for at least 3 months.

2.1.4 | Inclusion criteria for the control group

- Completely healthy individuals
- Women and men over the age of 18 were included in the study

MRSS was obtained in patients with SSc. According to LeRoy criteria, patients were divided into subgroups as limited and generalized. Gastrointestinal involvements were scored using the Turkish adaptation of the University of California Los Angeles gastrointestinal tract (UCLA GIT) 2.0 questionnaire.²⁸ This questionnaire consists of 34 steps, scaling in 7 different categories (reflux, swelling sensation, diarrhea, fecal contamination, constipation, emotional well-being, social work).²⁹⁻³⁰ All scales (except diarrhea and constipation) are scored between 0.00-3.00.

Alternatively, scoring for diarrhea and constipation is between 0.00-2.00 and 0.00-2.50, respectively. "GIS involvement severity score" is calculated with UCLA GIT 2.0 scale. This score varies between 0.00 and 2.83. The completion of GIT 2.0 takes approximately 6-10 minutes.

The diagnosis of PAH was made by right heart catheterization according to the ESC-2015 Pulmonary Hypertension Guidelines.³¹

Five milliliters of blood were collected from the patient and control groups. Total blood samples collected were centrifuged, serum was separated and stored at -80°C until used in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. RNA isolation was continued from the bottom precipitate.

2.2 | Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) experiments

qPCR method was used for the determination of the Wnt pathway family (Wnt-1, Wnt-2b/13, Wnt-2, Wnt-3a, Wnt-4, Wnt-6, Wnt-7a, Wnt-7b, Wnt-8a, Wnt-9b, Wnt-10a, Wnt-10b, Wnt-16) and Axin-2 gene expressions.

Total RNA isolation was performed on the same day from the blood samples in ethylenediaminetetraacetic acid tubes using the RNA

(A)

WNT family gene expression ($\Delta\Delta CT$)	PAH (+) Scleroderma (Mean)	PAH (-) Scleroderma (Mean)	p Value
WNT-1	21,9	6,2	0,023*
WNT-10b	1,35	13,34	0,139
WNT-2b13	6,04	3,85	0,809
WNT-2	4135,47	588,01	0,006*
WNT-3a	103	305,7	0,715
WNT-4	13,54	77,16	0,471
WNT-6	37,1	32,22	0,232
WNT-7a	3,13	3,42	0,135
WNT-7b	10,06	22,81	0,831
WNT-8a	3,13	3,6	0,580
WNT-9b	10,06	22,8	0,289
WNT-10a	9,77	31,6	0,300
WNT-16	4,23	10,58	0,294
AXIN-2	29,7	6,37	0,005*
Protein Levels			
DKK-1 (ng/mL)	7,8	9,98	0,253
Kremen 1 (ng/mL)	2153	2895	0,273

(B)

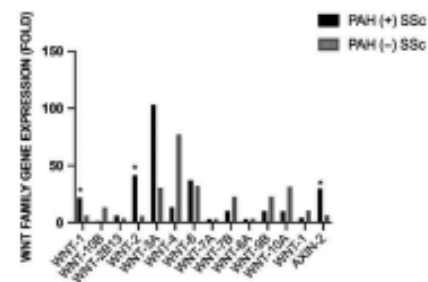


FIGURE 2 Wnt family gene expressions and protein levels of pulmonary arterial hypertension (PAH) (+) systemic sclerosis (SSc) and PAH (-) SSc. (A) Table of the Wnt family gene expressions and protein levels (B) Graphic of the Wnt family gene expressions and protein levels of PAH (-) and PAH (+) SSc

isolation kit (QIAamp RNA Blood Mini Kit, Qiagen GmbH, Courtabeuf, France) stored at -20°C . The amount of total RNA obtained was evaluated with a spectrophotometer (NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific, Portland, ME, USA) at 260 and 280 nm wavelengths. If the A260/A280 absorbance ratio was 1.8–2.0, the sample was accepted to possess ideal purity quality RNA. The control of RNA degradation was performed by agarose gel electrophoresis.

The RNA was converted to complementary DNA (cDNA) using the cDNA synthesis kit (QuantiTect Reverse Transcription kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Thermal cycle device (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) was used for this process.

The RT-qPCR reaction mixture (RT SYBR Green qPCR Mastermix, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) was prepared for RT-qPCR. The Qiagen rotor gene for qPCR (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) was used. Primers and qPCR reaction mix concentrations are presented in Table 1. GAPDH was applied as the housekeeping gene. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to determine the relative Wnt family pathway messenger RNA expression levels.

2.3 | Kremen 1 and Dkk-1 ELISA method

DKK-1 (Thermo) and Kremen 1 (SunredBio) ELISA kits were used. Measurements were performed according to the manufacturer's

instructions. The kit includes a standard to determine autoantibody concentrations (ng/mL).

2.4 | Statistical analyses

Data were evaluated using IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 24.0. The distribution of the data was checked with the Shapiro-Wilk-W test. Independent samples *t* test was used in binary group comparisons. The gene expression of the Wnt family and its antagonists were analyzed by Pearson or Spearman correlation test, depending on whether the relationships between MRSS and organ involvement showed normal distribution. Pearson test was selected if it showed normal distribution, Spearman test was selected if it did not show normal distribution. A value of $<.05$ was considered statistically significant for all *P* values.

3 | RESULTS

Patient overviews are presented in Table 2. There was no significant difference between the control group and SSc patients in terms of age ($P = .77$) and gender ($P = .60$). Diagnosis year, GIS

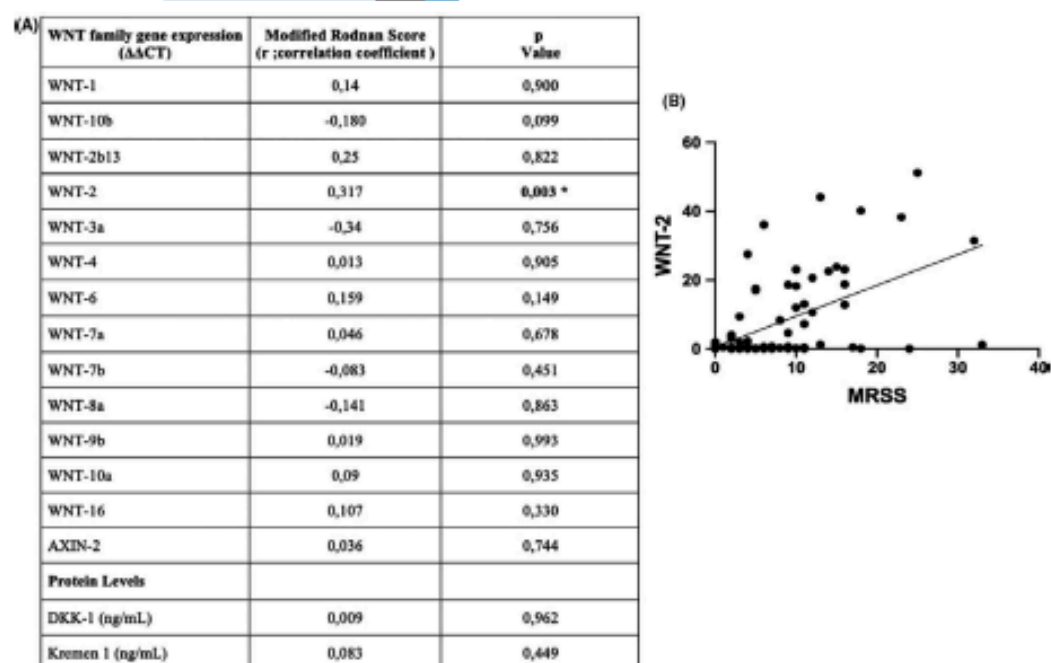


FIGURE 3 The relationship between modified rodnan skin score of systemic sclerosis (SSc) patients and Wnt family gene expressions and protein levels. (A) Table of the Wnt genes and rodnan skin score correlations. (B) There is positive correlations between Wnt-2 and modified rodnan skin score correlation

involvement score, MRSS, and disease severity score were significantly different between limited SSc and generalized SSc (Table 2B).

SSc and control group Wnt family gene expressions were investigated (Figure 1A). The results are presented as fold changes (FC). There was a significant increase in Wnt-1, Wnt-10b, Wnt-2, Wnt-6 genes for the SSc group compared to the control group. A decrease was observed in Axin-2 gene expression, and DKK-1, Kremen 1 protein expressions in SSc. In subgroup analysis, Wnt-10b ($P = .001$), Wnt-2 ($P = .017$), Wnt-6 ($P = .003$), Axin-2 ($P = .028$), DKK-1 ($P = .013$) and Kremen 1 ($P = .000$) were found to be significant between control and limited SSc. In subgroup analysis, Wnt-1 ($P = .011$), Wnt-10b ($P = .026$), Wnt-2 ($P = .001$), Wnt-3a ($P = .000$), Wnt-6 ($P = .000$), Axin-2 ($P = .013$), DKK-1 ($P = .003$) and Kremen 1 ($P = .000$) were found to be significant between control and generalized SSc.

The difference between Wnt family gene expressions was investigated between limited SSc patients and generalized SSc (Figure 1B). There was a significant difference between Wnt-3a and Wnt-10a gene expression between generalized SSc and limited SSc. Gene expression of Wnt-3a and Wnt-10a were increased in generalized SSc.

Wnt family gene expression was investigated between patients with PAH and without PAH (Figure 2). Wnt-1, Wnt-2 and Axin-2 gene expressions were significantly increased in SSc patients with PAH.

The relationship between the MRSS of SSc patients and Wnt family gene expressions and antagonists' protein levels were investigated (Figure 3). A positive correlation was found between the MRSS of SSc patients and Wnt-2 ($P = .003$, $r = 0.317$).

The relationship between disease severity scale of SSc and Wnt family gene expressions and protein levels was investigated (Figure 4). No significant correlation was found between the disease severity scale of the patients with SSc and Wnt family gene expressions and protein levels.

The relationship between total GIS involvement score of SSc patients and Wnt family gene expressions and antagonists' protein levels were investigated (Figure 5). There was a significant positive correlation between total GIS involvement score and Wnt-1 ($P = .007$, $r = 0.37$), Wnt-2 ($P = .022$, $r = 0.286$), Wnt-4 ($P = .001$, $r = 0.424$), Wnt-8a ($P = .005$, $r = 0.350$), Wnt-9b ($P = .011$, $r = 0.323$) gene expressions.

In limited SSc, there was a significant positive correlation between Wnt-2 ($r = 0.373$, $P = .025$), Wnt-4 ($r = 0.483$, $P = .004$), Wnt-8a ($r = 0.373$, $P = .025$), Wnt-9b ($r = 0.399$, $P = .017$) and GIS involvement score.

In generalized SSc, a positive correlation was found between Kremen 1 ($r = 0.426$, $P = .024$) and GIS involvement severity score.

A positive correlation was found between Reynaud symptom duration of the disease and Wnt-1 ($r = 0.257$, $P = .020$), and a negative correlation between Axin-2 and non-Reynaud symptom duration ($r = -0.342$, $P = .001$).

WNT family gene expression ($\Delta\Delta CT$)	Disease severity scale (r ;correlation coefficient)	p Value
WNT-1	0,053	0,635
WNT-10b	0,194	0,076
WNT-2b13	0,032	0,771
WNT-2	0,002	0,985
WNT-3a	0,046	0,675
WNT-4	0,045	0,689
WNT-6	0,069	0,537
WNT-7a	-0,074	0,508
WNT-7b	-0,95	0,388
WNT-8a	0,145	0,780
WNT-9b	0,042	0,711
WNT-10a	0,050	0,650
WNT-16	0,026	0,817
AXIN-2	-0,024	0,830
Protein Levels		
DKK-1 (ng/mL)	-0,187	0,297
Kremen 1(ng/mL)	-0,003	0,978

FIGURE 4 The relationship between disease severity score of systemic sclerosis (SSc) patients and Wnt family gene expressions and protein levels

4 | DISCUSSION

The effect of the Wnt signaling pathway is known in SSc patients. However, there is no study investigating the relationship between MRSS, disease severity score, PAH, GIS involvement severity score based on UCLA GIT 2.0 questionnaire, and Wnt family gene expressions. In our study, the relationship between Wnt family, Wnt antagonists, and SSc MRSS, disease severity score, PAH, and GIS involvement severity score were investigated.

When the SSc and healthy dermal samples were compared, it was observed that the accumulation of β -catenin in the nucleus,

which is characterized by the activation of the Wnt signaling pathway, increased in SSc samples.^{13,24} Hamburg-Shields et al showed that β -catenin overexpression depends on the increase of ECM genes in dermal fibroblasts.²⁵

In an in vitro study, fibroblast differentiation was induced by the application of recombinant Wnt-1 and Wnt-3a, and the release of ECM proteins was observed to increase.²⁵ In the same study, researchers observed that when Wnt-10b was overexpressed, hydroxyproline accumulation, dermal thickness, and myofibroblasts increased.²⁵ In our study, when the control and SSc patients were compared, a significant increase was seen in the Wnt-1, Wnt-10b,

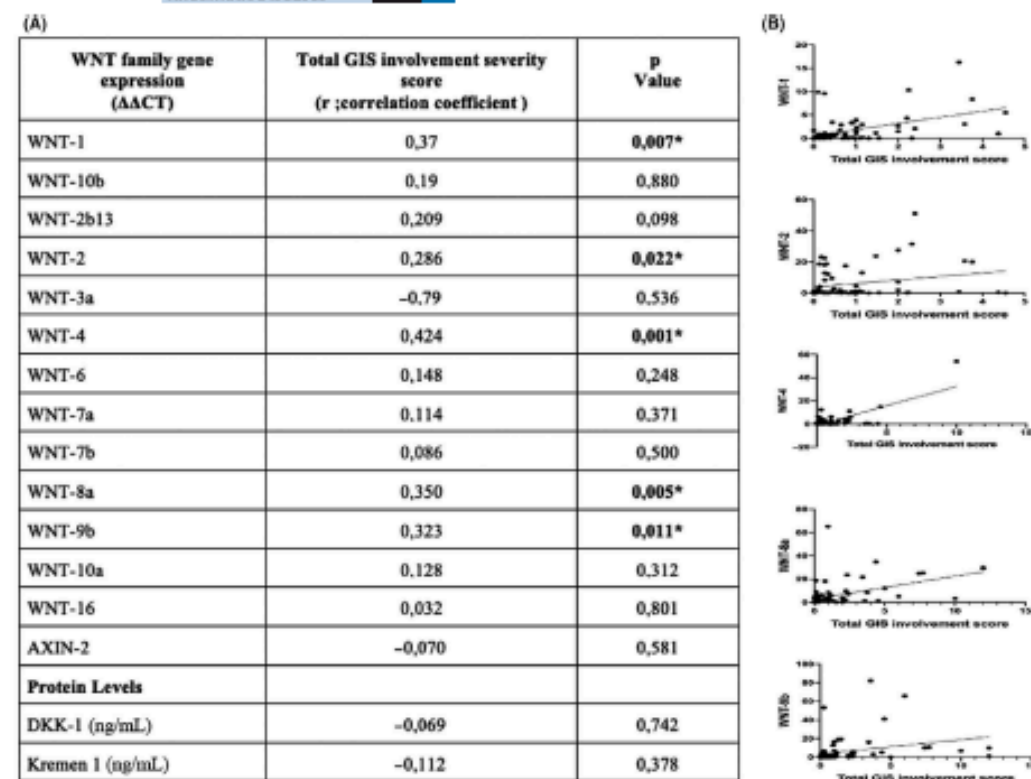


FIGURE 5 The relationship between total gastrointestinal system (GIS) involvement score of systemic sclerosis (SSc) patients and Wnt family gene expressions and protein levels. (A) Table of the Wnt genes and total gastrointestinal system (GIS) involvement score correlations. (B) There are positive correlations between Wnt-1, Wnt-2, Wnt-4, Wnt-8a, Wnt-9b and GIS involvement score

Wnt-2, Wnt-6 genes in SSc. Also, the antagonists Axin-2, DKK-1, and Kremen 1 decreased in SSc.

The results were similar to the literature for Wnt-1, Wnt-10b gene expressions in the overall SSc patients.³² When subgroup analyses were performed, the decreased expression of antagonists (DKK-1, Axin-2, Kremen 1) in limited and generalized groups showed that it may be directly related to activation of the Wnt signaling pathway in SSc. The presence of DKK-1 has been shown as the cause of other pathologies. Production of DKK-1, an inhibitor of osteoblast differentiation by myeloma cells, is associated with the presence of lytic bone lesions in patients with multiple myeloma.³³ Further, the expression of Wnt antagonists decreased in acute myeloid leukemia. The reason for the decreased gene expression of both SFRP-14 and DKK-1 is CpG hypermethylation. This correlates with the poor prognosis of the disease.^{34,35} A similar epigenetic mechanism may be considered to be involved in SSc.

Moreover, in one study it was shown that DKK-1 was completely absent in SSc patients.³⁶ In addition, in our results, significant differential expression of antagonists (DKK-1, Kremen 1, Axin-2) was not observed between generalized and limited SSc.

We can state that this difference is not significant at the subgroups of the disease.

Wei et al found that Wnt-3a can activate the TGF- β signal through autocrine and Smad-dependent cycles. These results show that canonical Wnt and TGF- β can affect each other in myofibroblast activation. Also, Wnt-3a, and Wnt-10b gene expressions were increased in generalized SSc patients.²¹ In our study, there was a significant difference between Wnt-3a and Wnt-10a gene expression between generalized and limited SSc patients. Especially, Wnt-3a and Wnt-10a gene expressions were increased in generalized SSc. This increase may be related to disease involvement and activation of the TGF- β signal pathway.

In this study, gene expression of the Wnt family was investigated between patients with SSc with PAH and patients with SSc with GIS involvement but without PAH. It has been shown for the first time in the literature that Wnt-1, Wnt-2, Axin-2 gene expressions increased significantly in SSc patients with PAH. In studies conducted only on pulmonary hypertension, Wnt-11, Rho kinase, Dishevelled and Daam1 were found to increase.³⁷ In addition, the Wnt signaling pathway is responsible for the regulation of basic cellular activities

involved in the maintenance of lung homeostasis and responses to environmental stress.³⁰

In any pulmonary pathology, the Wnt/ β -catenin pathway may be responsible for pulmonary angiogenesis. In addition, the Wnt pathway affects angiogenesis caused by BMP2, and loss of the Wnt signal results in impaired pulmonary vascular regeneration in response to severe pulmonary neointima formation, medial thickening, and injury. It is important to point out that the understanding of these complex pathways will help develop safer and more effective treatments for PAH. The same conclusion is valid for PAH(+) patients with SSc.

One study conducted by Taylan et al found a positive correlation between MRSS and DKK-1.³⁹ In another study, the down-regulation of the Wnt antagonist (DKK-1) by epigenetic mechanisms in SSc is accepted as the underlying primary mechanism.¹⁰ In our study, a positive correlation was found between MRSS and Wnt-2. Measurement of skin thickness is used for SSc activity, severity and mortality, especially in the generalized type. In the early period of generalized SSc, an increase in skin thickening is often associated with new or worsening internal organ involvement and increased mortality.^{40,41} Increased MRSS is associated with high mortality and injured kidney and heart function.⁴² Internal organ involvement and especially skin thickening predict the internal organ involvement and mortality of the disease.^{40,43} In our study, the presence of Wnt-2 and MRSS relationship showed that Wnt-2 played a role in the organ involvement of the SSc. We did not observe any relationship in other Wnt family members. It may be due to the limited type of SSc patients (53 limited types, 32 generalized types) in our patient group. Further, no correlation was found between the disease severity scale of SSc patients and Wnt family gene expressions and protein levels, which may be due, also, to the limited type of SSc patients in our patient group.

There was a significant positive correlation between Wnt-1, Wnt-2, Wnt-4, Wnt-8a, Wnt-9b, and GIS involvement of SSc patients. It is shown for the first time in the literature.

The present study has several limitations. First, the hypothesis of the study could also be investigated under in vitro and in vivo animal experiments. Second, TGF- β 1 is important in the pathogenesis of SSc. The relationship between Wnt signaling (also its antagonists) and TGF- β 1 could be investigated. Moreover, the study has an advantage for the clinic. Wnt/ β -catenin signaling pathway may be therapeutic in SSc.

In our study, we found out that Wnt-1 and Wnt-2 were active in organ and skin involvement. Other studies have shown an increase Wnt-2 in SSc.^{32,44,45} In summary, Wnt-1 and Wnt-2 are active in SSc and may play roles in the pathogenesis of SSc.

5 | CONCLUSIONS

- For the SSc group, Wnt-1, Wnt-10b, Wnt-2, Wnt-6 genes were significantly increased compared to the control group, while the antagonist Axin-2, DKK-1, and Kremen 1 genes were decreased. We state that this analysis may be helpful in choosing the treatment

regimen or approach or predicting its effects.

- Increased gene expression of Wnt-3a and Wnt-10a in patients with generalized SSc in comparison with limited SSc is important in the classification of the disease.
- Significant increase of Wnt-1, Wnt-2 and Axin-2 gene expression in patients with PAH may be important in the follow up of the progression of the disease.
- No significant difference was found between the disease severity scale of the patients with SSc and the Wnt gene family.
- The significant correlation between the GIS involvement severity score of patients with SSc and Wnt-1, Wnt-2, Wnt-4, Wnt-8a, Wnt-9b may guide the clinical approach to the gastrointestinal involvement of the disease.
- The increase in Wnt-1, Wnt-2 gene expression shows that it is a strong biomarker candidate for SSc. Thus, optimization of treatment methods can be achieved by developing targeted therapies to the Wnt pathway.
- The evaluated Wnt gene family and antagonists may be promising as new prognostic markers in the treatment of SSc by investigating the treatment approaches with different mechanisms of action in terms of staging and organ involvement of the disease.

SSc is a systemic and complex disease which causes significant clinical changes in the skin and internal organs. A multidisciplinary approach is of utmost importance for the clinical monitoring of SSc patients because of the complications of the disease.

ORCID

Ayşe Koçak  <https://orcid.org/0000-0002-1510-2937>

REFERENCES

- Varga J. Systemic sclerosis: an update. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2008;66(3):198-202.
- Hunzelmann N, Gerth E, Krieg T, et al. The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47:1185-1192.
- Mayes MD, Lacey JV, Beebe-Dimmer J, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2246-2255.
- Allanore Y, Dieude P, Boileau C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49:203-210.
- Gabrieli A, Avvedimen EV to and Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med*. 2009;360(19):1989-2003.
- Kocak A, Harmanlı D, Cavdar Z, et al. Antioxidant effect of Epigallocatechin-3-Gallate in a bleomycin induced scleroderma model. *Arch Rheumatol*. 2019;34i-viii.
- Kocak A, Harmanlı D, Birişik M, et al. Effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on a scleroderma model of fibrosis. *Turk J Biochem*. 2018;43(4):464-473.
- den Hoogen V, Khanna F, Fransen D, et al. Classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2013;65:2737-2747.
- Krieg T, Takehara K. Skin disease: a cardinal feature of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(Suppl 3):14-18.



10. LeRoy EC, Medsger TA. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2001;28(7):1573-1576.
11. Chen X, Yang J, Evans PM, Liu C. WNT signaling: the good and the bad. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008;40(7):577-594.
12. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314-321.
13. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, et al. Activation of canonical WNT signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis. *Nat Commun*. 2012;2012(3):735.
14. Beyer C, Reichert H, Akan H, et al. Blockade of canonical WNT signalling ameliorates experimental dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(7):1255-1258.
15. Beyer C, Reichert H, Akan H, Mallano T, Schramm A, Dees C. Blockade of canonical WNT signalling ameliorates experimental dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(7):1255-1258.
16. He W, Dai C, Li Y, Zeng G, Monga SP, Liu Y. WNT/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(4):765-776.
17. Königshoff M, Kramer M, Balsara N, et al. WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2009;119:772-787.
18. Dees C, Schlottmann I, Funke R, et al. The WNT antagonists DKK1 and SFRP1 are downregulated by promoter hypermethylation in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(8):1232-1239.
19. Sveglanti S, Marrone G, Pezone A, et al. Oxidative DNA damage induces the ATM-mediated transcriptional suppression of the WNT inhibitor WIF-1 in systemic sclerosis and fibrosis. *Sci Signal*. 2014;7(341):ra84.
20. Ren S, Johnson BG, Kida Y, et al. LRP-6 is a coreceptor for multiple fibrogenic signaling pathways in pericytes and myofibroblasts that are inhibited by DKK-1. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(4):1440-1445.
21. Wei J, Fang F, Lam AP, et al. WNT/beta-catenin signaling is hyperactivated in systemic sclerosis and induces Smad-dependent fibrotic responses in mesenchymal cells. *Arthritis Rheum*. 2012;54(8):2734-2745.
22. Bergmann C, Akhmetshina A, Dees C, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta induces dermal fibrosis by activation of the canonical WNT pathway. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(12):2191-2198.
23. Distler A, Ziemer C, Beyer C, et al. Inactivation of evenness interrupted (EVI) reduces experimental fibrosis by combined inhibition of canonical and non-canonical WNT signalling. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(3):624-627.
24. Beyer C, Schramm A, Akhmetshina A, et al. Beta-catenin is a central mediator of pro-fibrotic WNT signaling in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(5):761-767.
25. Hamburg EJ, Abit RP. Sustained beta-catenin activity in dermal fibroblasts is sufficient for skin fibrosis. *J Invest Dermatol*. 2012;132(10):2469-2472.
26. Daoussis D, Tsamandou A, Antonopoulos I, et al. B cell depletion therapy upregulates Dkk-1 skin expression in patients with systemic sclerosis: association with enhanced resolution of skin fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 2016;18(1):118.
27. Distler A, Deloch L, Huang J, et al. Inactivation of tankyrase reduces experimental fibrosis by inhibiting canonical WNT signalling. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(9):1575-1580.
28. Khanna D, Hays RD, Maranian P, et al. Reliability and validity of the University of California, Los Angeles Scleroderma Clinical Trial Consortium Gastrointestinal Tract Instrument. *Arthritis Rheum*. 2009;61(9):1257-1263.
29. Khanna D, Furst DE, Maranian P, et al. Minimally important differences of the UCLA Scleroderma Clinical Trial Consortium Gastrointestinal Tract Instrument. *J Rheumatol*. 2011;38(9):1920-1924.
30. Taş YM, Hakim GD, Keskinoglu P, et al. The validity and reliability study of the University of California, Los Angeles Scleroderma Clinical Trial Consortium Gastrointestinal Tract (UCLA SCTC GIT) 2.0 questionnaire for the Turkish society. *Turk J Gastroenterol*. 2019;30:234-241.
31. Nazzareno G, Humbert M, Vachiery J-L, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *ERJ*. 2015;46:903-975.
32. Wei J, Melichian D, Komura K, et al. Canonical WNT signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipodystrophy: a novel mouse model for scleroderma. *Arthritis Rheum*. 2011;63:1707-1717.
33. Erming T, Fenghuang Z, Ronald W, et al. The role of the WNT-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J*. 2003;349:2483-2494.
34. Valencia A, Roman-Gomez J, Cervera J, et al. WNT signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of WNT antagonists in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009;23:1658-1666.
35. Guo H, Zhang TJ, Wen XM, et al. Hypermethylation of secreted frizzled-related proteins predicts poor prognosis in nonM3 acute myeloid leukemia. *Oncotargets Ther*. 2017;10:3635-3644.
36. Daoussis D, Papachristou D, Dimitroulas T, et al. Dickkopf-1 is downregulated early and universally in the skin of patients with systemic sclerosis despite normal circulating levels. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;113(4):45-49.
37. Laumanns IP, Fink L, Wilhelm J, et al. The noncanonical WNT pathway is operative in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;40:683-691.
38. de Jesus PV, Yuan K, Alastalo TP, Spiekeroetter E, Rabinovitch M. Targeting the WNT signaling pathways in pulmonary arterial hypertension. *Drug Discov Today*. 2014;19(8):1270-1276.
39. Taylan A, Birlik M, Kenar G, et al. Osteoprotegerin interacts with biomarkers and cytokines that have roles in osteoporosis, skin fibrosis, and vasculopathy in systemic sclerosis: a potential multifaceted relationship between OPG/RANKL/TRAIL and WNT inhibitors. *Mod Rheumatol*. 2018;25(6):1-6.
40. Shand L, Lunt M, Nihtyanova S, et al. Relationship between change in skin score and disease outcome in diffuse cutaneous systemic sclerosis: application of a latent linear trajectory model. *Arthritis Rheum*. 2007;56(7):2422-2431.
41. Steen VD, Medsger TA Jr. Improvement in skin thickening in systemic sclerosis associated with improved survival. *Arthritis Rheum*. 2001;44(12):2828-2835.
42. Steen VD, Medsger TA Jr. Rodnan G.P.D-Penicillamine therapy in progressive systemic sclerosis (scleroderma): a retrospective analysis. *Annals of Int Med*. 1982;97(5):652-659.
43. Dobrota R, Maurer B, Graf N, et al. Prediction of improvement in skin fibrosis in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a EUSTAR analysis. *Ann of the Rheum Dis*. 2016;75(10):1743-1748.
44. Bayle J, Fitch J, Jacobsen K, Kumar R, Lafyatis R, Lemaire R. Increased expression of WNT2 and SFRP4 in Tsk mouse skin: role of WNT signaling in altered dermal fibrillin deposition and systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*. 2008;128:871-881.
45. Gözel N, Duran F, Yildirim A, et al. Paricalcitol inhibits WNT/β-catenin signaling pathway and ameliorates dermal fibrosis in bleomycin-induced scleroderma model. *Arch Rheumatol*. 2017;33(3):288-294.

How to cite this article: Koçak A, Harmancı D, Güner Akdoğan G, Birlik M. Relationship of Wnt pathway activity and organ involvement in scleroderma types. *Int J Rheum Dis*. 2020;00:1-10. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13973>

8.5.3. Kocak Ayse, Harmanci Duygu, Cavdar Zahide, Ural Cemre, Birlik Merih, Sarioglu Sulen, Yilmaz Osman, Guner Akdoğan Gul. Antioxidant effect of Epigallocatechin-3-Gallate in a bleomycin induced scleroderma model. The Archives of Rheumatology. Arch Rheumatol 2019;34(x):i-viii. doi: 10.5606/ArchRheumatol.2019.6835.



Arch Rheumatol 2019;34(1):1-8
doi: 10.5606/ArchRheumatol.2019.6835

ORIGINAL ARTICLE

Antioxidant Effect of Epigallocatechin-3-Gallate in a Bleomycin-Induced Scleroderma Model

Ayşe KOÇAK¹, Duygu HARMANCI², Zahide ÇAVDAR¹, Cemre URAL¹, Merih BİRLİK²,
Sülen SARIOĞLU³, Osman YILMAZ⁴, Gül GÜNER AKDOĞAN⁵

¹Department of Molecular Medicine, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, İzmir, Turkey

²Department of Rheumatology, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, İzmir, Turkey

³Department of Pathology, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, İzmir, Turkey

⁴Department of Laboratory Animal Sciences, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, İzmir, Turkey

⁵Department of Medical Biochemistry, İzmir University of Economics, Medical Faculty, İzmir, Turkey

ABSTRACT

Objectives: This study aims to evaluate the antioxidant effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in a bleomycin (BLM)-induced scleroderma model.

Materials and methods: Thirty-two healthy female Balb-c mice (6-8-week-old, weighing 22±5 g) were used in this study. The mice were randomly divided into four groups: control (n=8), BLM (n=8), BLM+EGCG (n=8), and EGCG (n=8). Skin tissue specimens were collected at the end of the experiments. Histopathological examinations of skin tissues were performed. Skin samples were assessed for total superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content. The phosphorylation of p-38 mitogen-activated protein kinase and Akt protein (the serine-threonine protein kinase encoded by the AKT), as well as the nuclear factor-kappa B (NF-κB) levels, were analyzed by western blotting.

Results: Epigallocatechin-3-gallate-treated groups were observed to have reduced connective tissue fibrosis in the dermis area using Masson's trichrome staining method. p-p38 and NF-κB were found to decrease significantly in the BLM + EGCG group compared with the BLM group. Parallel to these findings, phosphorylated Akt protein was found to increase in the BLM + EGCG group compared with the BLM group. SOD activity was increased in the EGCG group and content of MDA level was decreased in EGCG groups.

Conclusion: The results of the present study demonstrated that EGCG represses p-p38 and NF-κB signaling pathways, exerting a protective effect for scleroderma through its anti-oxidative role.

Keywords: Antioxidant effect; fibrosis; oxidative stress; scleroderma.

Systemic sclerosis or scleroderma (SSc) is an autoimmune connective tissue disease.¹ SSc is characterized by fibrosis of skin and internal organs. The cause of SSc is unknown and pathogenesis is unclear; it is characterized by overproduction of excessive extracellular matrix (ECM).² In this disease, normal tissue architecture is broken and replaced with collagen-rich, stiff connective tissue.³ Also, SSc is a

very rare disease in the population and shows three pathological features: injuries to vascular endothelial cells, imbalanced immune system, and ECM accumulation.¹ As in other autoimmune diseases, females are at higher risk than males.^{3,5} In this disease, oxidative stress may play a role for pathogenesis.⁶⁻⁸ Recent studies showed a relationship between oxidative/antioxidative markers and SSc.⁹⁻¹²

Received: January 12, 2018 Accepted: February 20, 2018 Published online: May 07, 2018

Correspondence: Ayşe Koçak, PhD, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, 35330 Balçova, İzmir, Turkey.
Tel: +90 507 - 224 37 06 e-mail: kocak.ayse@gmail.com

Citation:

Koçak A, Harmancı D, Çavdar Z, Ural C, Birlik M, Sarıoğlu S, et al. Antioxidant effect of epigallocatechin-3-gallate in a bleomycin-induced scleroderma model. Arch Rheumatol 2019;34(1):1-8.

©2019 Turkish League Against Rheumatism. All rights reserved.

Animal models are used to provide clues and therapeutic interventions for human diseases. Bleomycin (BLM) is often used as an anti-tumor agent for several cancer types and is originally isolated from the fungus *Streptomyces verticillus*.¹³ Recent studies showed that BLM upregulates collagen messenger ribonucleic acid expression in human lung or dermal fibroblasts *in vivo* models like a normal SSc phenotype.^{14,15} Yamamoto et al.¹⁶⁻²¹ established a mice model for SSc by local treatment by BLM subcutaneous (sc) injections during 21 days.¹⁶⁻²¹ Concerning the *in vivo* research, the BLM-induced experimental SSc mouse is the most used model for studying SSc.²²

Overproduction of reactive oxygen species (ROS) is known to induce tissue damage and cell death, which could lead to several physiological and pathological processes. Studies have shown that ROS generation occurs in fibrosis. ROS, such as superoxide anions, hydrogen peroxides, and hydroxyl radicals have been demonstrated to be an important mediator of BLM-induced fibrosis.²³⁻²⁵ In SSc, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) signaling increases fibroblast proliferation, collagen synthesis and ROS production.^{26,27} This situation also leads to suppress the expression of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD).²⁷ The accumulation of matrix proteins is increased by both TNF- α signaling and ROS production.²⁷ Besides, there are studies showing that free radicals cause immune system activation and cytokine production and stimulate extracellular matrix elements and the amount of collagen.²⁸⁻³⁰

There are two types of antioxidant systems in human metabolism. The first one is the enzymatic antioxidant system, including SOD, glutathione peroxidase, and catalase enzymes. The second is the nonenzymatic antioxidant system, including carotenoids, vitamin E, vitamin C, thiol, and glutathione. Malondialdehyde (MDA) is a lipid peroxidation marker for oxidative stress.

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the most abundant catechin, is the major effective component of green tea and has been shown to have beneficial health effects on skin.^{31,32} In liver fibrosis, EGCG was shown to inhibit proliferation of fibroblasts, reducing collagen deposition, and upregulating the mitochondrial

respiratory chain.³³ EGCG has been shown to play protective role against breast cancer³⁴⁻³⁶ colon and prostate cancer.³⁷ Besides, it has been promising as a source of new molecular therapies. The possible role of EGCG in oxidative stress has attracted attention over the last few years. However, the role of EGCG on SSc focusing on the pathways involving oxidative stress has not been investigated. In this study, we aimed to evaluate the antioxidant effects of EGCG in a BLM-induced SSc model.

MATERIALS AND METHODS

Experiments were performed on dermal tissues obtained from previous study with approval of the Animal Care and Use Committee of the Dokuz Eylul University (Protocol No: 79/2012). This study was conducted at Dokuz Eylul University between April 2015 and May 2015. Skin fibrosis was induced in 32 pathogen-free female Balb/c mice (6-8-week-old; weighing 20-22 g) (Dokuz Eylul University, Department of Experimental Animals) by local injection of BLM for 21 days.^{16,20,38} The animals were kept under standard animal laboratory conditions: temperature of 20-22°C, humidity of 55-60%, photoperiod of 12:12 hour light: dark cycle. They had free access to standard laboratory feed and water, according to the study protocol. All methods including the euthanasia procedure were conducted in accordance with Guide for Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, National Institute of Health (NIH). The study protocol was reviewed and approved by Dokuz Eylul University Ethics Committee for Animal Research (Protocol No: 1/2018).

Bleomycin was used for SSc model (Onko Koçsel, İstanbul, Turkey). EGCG (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) solution was prepared as 20 mg/kg in saline as reported earlier.³⁹ The mice were randomly divided into four groups of eight animals each, as follows:

1. Control group was given 100 μ L (100 μ g) sc saline (SF) once a day, 100 μ L (100 μ g) intraperitoneal (ip) SF twice a week,
2. BLM group was given 100 μ L (100 μ g) sc BLM once a day, 100 μ L (100 μ g) ip SF twice a week,

3. BLM + EGCG group was given 100 μ L (100 μ g) sc BLM once a day, 100 μ L (100 μ g) ip EGCG twice a week,
4. EGCG group was given 100 μ L (100 μ g) sc SF once a day, 100 μ L (100 μ g) ip EGCG twice a week.

After 21 days, the animals were sacrificed under ether anesthesia in sterile condition. The injected skin section was removed and processed for analysis.

The injected sections of mice skin were fixed in 4% formalin and embedded in paraffin. Four micrometer (μ m) sections were stained with Masson's trichrome. Dermal thicknesses of the injected sections were analyzed with Nikon Eclipse C1 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) at 200-fold magnification and digitalized by Nikon DS-Fi2 camera. Dermal sections were measured (as μ m) on 10 areas. In each series of experiments, the dermal thicknesses were evaluated statistically.

All dermal tissues were stored at -80°C before the experiment. Dermal tissues were washed with cold phosphate buffer solution and homogenized using a TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany) in 50 mM potassium phosphate buffer pH: 7.8, containing 0.5 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/mL aprotinin, and centrifuged at 2500g for MDA analysis.

The protein content in each tissue was determined using the bicinchoninic acid protein assay (Thermo Pierce, Rockford IL, USA). Bovine serum albumin was used as a standard.

The MDA assay was based on the condensation of one molecule of MDA with two molecules of thiobarbituric acid (TBA) in the presence of reduced agents. The TBA + MDA complex was analyzed by high-performance liquid chromatography system. The MDA levels were expressed as $\mu\text{mol/g}$ protein.

For the SOD assay, homogenates were centrifuged at $11000\times g$ for 10 minutes. The supernatant was used for determination of SOD enzyme activity. SOD activity was analyzed by spectrophotometric assay kit (Cayman Chemical Company, Inc., Ann Arbor, MI, USA) and performed according to the manufacturer's instructions. This assay utilizes a tetrazolium salt for the detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine. The reaction was monitored

at 440 nm using a plate reader (Synergy HT, BioTek Instrument Inc., Winooski, USA). One unit (U) of SOD is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% dismutation of the superoxide radical. SOD activity data were expressed as U/mg protein.

The protein concentration was quantified using a bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Pierce, Rockford IL, USA). A total of 25 μ g of protein was separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a 0.45 μ m pore size, polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, USA) which was then blocked for one hour at room temperature using 5% skim milk/tris-buffered saline with tween (TBST). The blots were incubated overnight with a 1:1,000 dilution of appropriate primary antibody in 5% skim milk/TBST. The following antibodies were used: Rabbit pp-38, p-38, Akt (the serine-threonine protein kinase encoded by the AKT), phosphorylated Akt (p-Akt), nuclear factor-kappa B (NF- κ B) (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA). After the primary incubation, membranes were washed with TBST, the blots were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated mouse anti-rabbit secondary antibody (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA). As a control for equal protein loading, membranes were stripped and re-incubated for β -actin using a monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA). Protein bands were visualized using enhanced chemiluminescence (Millipore, Bedford, USA) and were quantitated using Image-J, NIH image densitometry software. Relative expressions of proteins were calculated using the ratios: NF- κ B/ β -actin, p-Akt/Akt, pp-38/p-38. All experiments were performed in triplicate and the western blotting images were presented as the representative of three images.

Statistical analysis

All experimental data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. The data were analyzed using Student's t-test and differences between multiple groups were evaluated by two-way analysis of variance. Statistical analyses were performed with IBM SPSS version 22.0 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA). $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

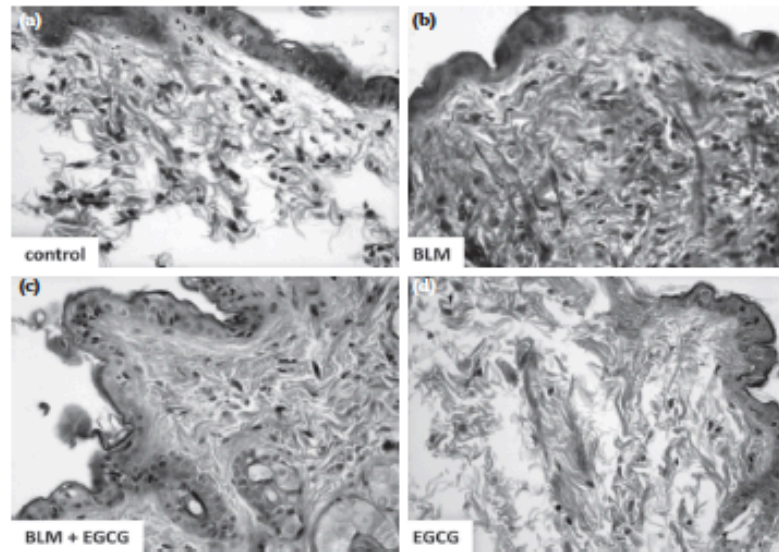


Figure 1. Masson's trichrome staining. Evidence of fibrosis (collagen content) was more prominent in bleomycin group than bleomycin + epigallocatechin-3-gallate group. Original magnification $\times 20$. (a) Control group, (b) bleomycin group, (c) bleomycin + epigallocatechin-3-gallate group, (d) epigallocatechin-3-gallate group. BLM: Bleomycin; EGCG: Epigallocatechin-3-gallate.

RESULTS

Masson's trichrome staining was performed and the histological examination of the skin tissues from the mice is shown in Figure 1. The dermal thicknesses in the BLM + EGCG injected mice were significantly lower than in the BLM injected mice respectively ($p < 0.05$, Figure 1).

The effect of EGCG on the activity of the SOD and MDA content is represented in Figure 2. A marked decrease in the SOD activity and a significant increase in the content of MDA were observed in the BLM groups compared with the controls. The MDA content was decreased and SOD activity was increased in the EGCG groups ($p < 0.05$) compared with the BLM groups.

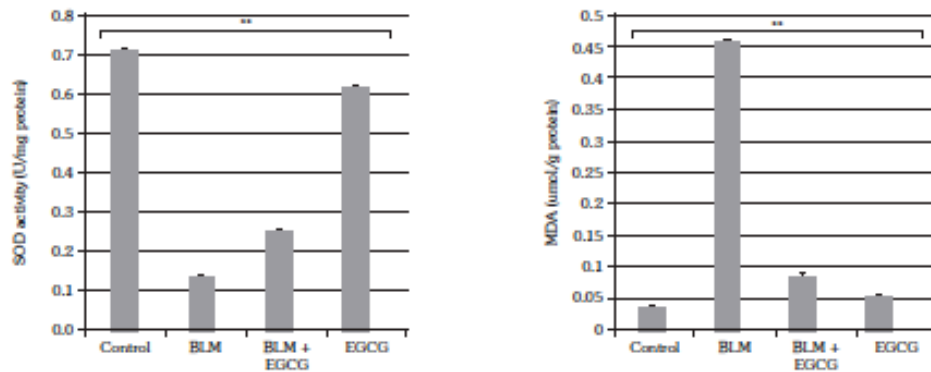


Figure 2. Epigallocatechin-3-gallate increased superoxide dismutase activity and decreased malondialdehyde activity (** $p < 0.05$). SOD: Superoxide dismutase; BLM: Bleomycin; EGCG: Epigallocatechin-3-gallate; MDA: Malondialdehyde.

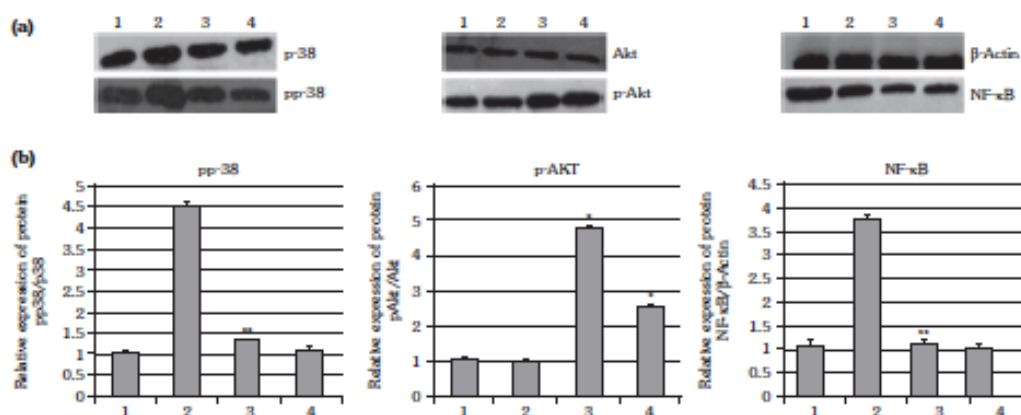


Figure 3. Effects of epigallocatechin-3-gallate treatment on p-Akt, pp-38 and nuclear factor-κB protein levels. (a) Western blotting were performed to measure protein levels of p-Akt, pp-38 and nuclear factor-κB, as described under materials and methods. (b) Quantitative results of p-Akt, pp-38 and nuclear factor-κB protein levels. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=3). (1) Control group, (2) bleomycin group, (3) bleomycin + epigallocatechin-3-gallate group, (4) epigallocatechin-3-gallate group (*p<0.05, **p<0.01). NF: Nuclear factor.

The western blotting analysis showed that EGCG increased the phosphorylation of Akt in the EGCG group compared with the control and BLM groups significantly (Figure 3, p<0.05).

The pp-38 and NF-κB protein levels did not differ between control, EGCG and BLM groups (p>0.05). As shown in Figure 3, p-Akt protein levels increased in the BLM + EGCG group compared with the BLM group (p<0.05). Also, pp-38 and NF-κB protein levels decreased (p<0.01) in the BLM+EGCG groups compared with the BLM groups.

DISCUSSION

In this study, the effect of EGCG on BLM-induced SSc mice model was evaluated, focusing on the oxidative stress pathways (p-38, p-Akt and NF-κB) as well as the oxidative stress parameter MDA and the anti-oxidant enzyme SOD.

The p-38-mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is conserved signaling pathway that responds to oxidative stress.⁴⁰ NF-κB signaling is also activated and it regulates cellular behavior. Also, PI3K/Akt pathway is considered as one of the most crucial factors for cell survival against oxidative stress.⁴¹

Scleroderma is a systemic autoimmune disease of unknown etiology and pathogenesis. It is characterized by progressive tissue fibrosis. Fibrosis, characterized by excessive accumulation of the extracellular matrix, is a clinical hallmark of many disorders such as SSc. Oxidative stress and tissue inflammation are the underlying events that accompany the development of fibrosis in SSc.⁴

A study investigated several dietary antioxidants in nature as therapeutic agents,⁴² and suggested that different antioxidants showed different defense mechanisms, and thus they possessed different potential therapeutic treatments. Authors reported that EGCG, one of the most active components of tea polyphenols, acts as antioxidant by scavenging reactive oxygen species. The significant antioxidant effect of EGCG is sweeping the free radicals. EGCG can act as electron traps to scavenge free radicals or inhibit the formation of ROS such as oxide and peroxynitrite.⁴³ However, the authors did not study role of EGCG on the signaling pathways in SSc.

In our study, SOD activity was decreased and MDA content was increased in the experimental group (Figure 2). SOD enzyme activity and MDA levels are important indicators of oxidative stress and respond to induced oxidative stress.⁴⁴

Epigallocatechin-3-gallate has also been shown by some studies to directly inhibit several molecular targets and regulate multiple signal transduction pathways such as MAPKs (p-38) and the redox-sensitive transcription factor (NF- κ B) in the cardiovascular and cancer studies.⁴⁵⁻⁴⁷ Akt signaling pathway plays an important role in cell growth, survival and motility. Several studies have also highlighted mechanisms by which EGCG could exert anti-fibrotic effects such as blocking the activation of NF- κ B.^{48,49} NF- κ B signaling pathway is activated by both oxidative stress and inflammatory factors and considered to be a prototypical pro-inflammatory signaling pathway for its role in the expression of other pro-inflammatory genes.⁵⁰ Dooley et al.⁵¹ and Kim et al.⁵² reported that EGCG reduces ROS, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways, as well as NF- κ B activity.^{51,52}

Our findings on the SSc mice model showed that Akt phosphorylation was increased in the experimental groups, and suggest that EGCG helps the survival of the cell (Figure 3). We also showed that EGCG could suppress phosphorylation of p-38 signaling and also decrease NF- κ B activity of dermal tissue of mice (Figure 3). Moreover, we revealed that NF- κ B phosphorylation decreased in the EGCG groups.

Our previous data indicated that EGCG can effectively inhibit collagen content and myofibroblasts and TNF beta signaling.⁵³ In this study, we suggest that the inhibitory effect of EGCG on fibrosis may be at least partly due to ROS inhibition.

The present study has two limitations. Firstly, the hypothesis of the study could also be investigated by other oxidative stress marker experiments. Secondly, the hypothesis could be analyzed in another scleroderma experimental model.

In conclusion, we state that EGCG reduced the severity of fibrosis in an experimental animal model of SSc. The improved pathology occurred in association with lower concentrations of pro-fibrogenic factors, lipid peroxides, Akt, p-38 and NF- κ B. This study presents novel data concerning the effect of EGCG on the oxidative state in a SSc model. In the future, these parameters may be investigated further for their possible role in the diagnosis and monitoring of SSc.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

Funding

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article.

REFERENCES

- Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. J Clin Invest* 2007;117:557-67.
- Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol* 2011;8:42-54.
- Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, Lehmacher W, Melchers I, Meurer M, et al. The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:1185-92.
- Allanore Y, Dieude P, Boileau C. Genetic background of systemic sclerosis: autoimmune genes take centre stage. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:203-10.
- Mayes MD, Lacey JV Jr, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 2003;48:2246-55.
- Herrick AL, Matucci Cerinic M. The emerging problem of oxidative stress and the role of antioxidants in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:4-8.
- Lundberg AC, Akeson A, Akeson B. Dietary intake and nutritional status in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1143-8.
- Servettaz A, Goulvestre C, Kavian N, Nicco C, Guipain P, Chéreau C, et al. Selective oxidation of DNA topoisomerase 1 induces systemic sclerosis in the mouse. *J Immunol* 2009;182:5855-64.
- Kawashiri SY, Ueki Y, Terada K, Yamasaki S, Aoyagi K, Kawakami A. Improvement of plasma endothelin-1 and nitric oxide in patients with systemic sclerosis by bosentan therapy. *Rheumatol Int* 2014;34:221-5.
- Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmü M. Statins as immunomodulators in systemic sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1110:670-80.
- Ricci V, Spadaro A, Fuksa L, Firuzi O, Saso L, Valesini G. Specific oxidative stress parameters differently correlate with nailfold capillaroscopy changes and organ involvement in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2008;27:225-30.

12. Ogawa F, Shimizu K, Muroi E, Hara T, Sato S. Increasing levels of serum antioxidant status, total antioxidant power, in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2011;30:921-5.
13. Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Okami Y. New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot (Tokyo)* 1966;19:200-9.
14. Yamamoto T, Eckes B, Krieg T. Bleomycin increases steady-state levels of type I collagen, fibronectin and decorin mRNAs in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2000;292:556-61.
15. Clark JG, Starcher BC, Uitto J. Bleomycin-induced synthesis of type I procollagen by human lung and skin fibroblasts in culture. *Biochim Biophys Acta* 1980;631:359-70.
16. Yamamoto T, Kuroda M, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. III: Histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Arch Dermatol Res* 2000;292:535-41.
17. Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. IV: induction of dermal sclerosis by bleomycin is T cell independent. *J Invest Dermatol* 2001;117:999-1001.
18. Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. V: Increased expression of alpha-smooth muscle actin in fibroblastic cells in bleomycin-induced scleroderma. *Clin Immunol* 2002;102:77-83.
19. Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. VI: Evaluation of bleomycin-induced skin sclerosis in nude mice. *Arch Dermatol Res* 2004;295:453-6.
20. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999;112:456-62.
21. Yamamoto T, Takahashi Y, Takagawa S, Katayama I, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. II. Bleomycin induced scleroderma in genetically mast cell deficient WBB6F1-W/W(V) mice. *J Rheumatol* 1999;26:2628-34.
22. Avouac J, Elhai M, Allanore Y. Experimental models of dermal fibrosis and systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 2013;80:23-8.
23. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20:933-56.
24. Hu C, Kilts DD. Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems in vitro. *Mol Cell Biochem* 2001;218:147-55.
25. Nakagawa H, Wachi M, Woo JT, Kato M, Kasai S, Takahashi F, et al. Fenton reaction is primarily involved in a mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate to induce osteoclastic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:94-101.
26. Badea I, Taylor M, Rosenberg A, Foldvari M. Pathogenesis and therapeutic approaches for improved topical treatment in localized scleroderma and systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:213-21.
27. Gabrielli A, Sveglia S, Moroncini G, Amico D. New insights into the role of oxidative stress in scleroderma fibrosis. *Open Rheumatol J* 2012;6:87-95.
28. Distler JH, Jünger A, Pilecky M, Zwerina J, Michel BA, Gay RE, et al. Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2007;56:4203-15.
29. Bozkurt M, Dag S, Oktayoglu P, Em S, Yuksel H, Caglayan M, et al. Serum prolyase enzyme activity and oxidative status in patients with scleroderma. *Acta Medica Mediterranea* 2014;30:127-32.
30. Gabrielli A, Sveglia S, Moroncini G, Pomponio G, Santillo M, Avvedimento EV. Oxidative stress and the pathogenesis of scleroderma: the Murrell's hypothesis revisited. *Semin Immunopathol* 2008;30:329-37.
31. Roh E, Kim JE, Kwon JY, Park JS, Bode AM, Dong Z, et al. Molecular mechanisms of green tea polyphenols with protective effects against skin photoaging. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017;57:1631-7.
32. OyetakinWhite P, Tribout H, Baron E. Protective mechanisms of green tea polyphenols in skin. *Oxid Med Cell Longev* 2012;2012:560682.
33. Santamarina AB, Carvalho-Silva M, Gomes LM, Okuda MH, Santana AA, Streck EL, et al. Decaffeinated green tea extract rich in epigallocatechin-3-gallate prevents fatty liver disease by increased activities of mitochondrial respiratory chain complexes in diet-induced obesity mice. *J Nutr Biochem* 2015;26:1348-56.
34. Imai K, Suga K, Nakachi K. Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population. *Prev Med* 1997;26:769-75.
35. Shrubsole MJ, Lu W, Chen Z, Shu XO, Zheng Y, Dai Q, et al. Drinking green tea modestly reduces breast cancer risk. *J Nutr* 2009;139:310-6.
36. Wu AH, Yu MC, Tseng CC, Hankin J, Pike MC. Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans. *Int J Cancer* 2003;106:574-9.
37. Guo Y, Zhi F, Chen P, Zhao K, Xiang H, Mao Q, et al. Green tea and the risk of prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2017;96:6426.
38. Yamamoto T. Animal model of sclerotic skin induced by bleomycin: a clue to the pathogenesis of and therapy for scleroderma? *Clin Immunol* 2002;102:209-16.
39. Sriram N, Kalayarasan S, Sudhandiran G. Enhancement of antioxidant defense system by epigallocatechin-3-gallate during bleomycin induced experimental pulmonary fibrosis. *Biol Pharm Bull* 2008;31:1306-11.
40. Tian L, Chen J, Chen M, Gui C, Zhong CQ, Hong L, et al. The p38 pathway regulates oxidative stress tolerance by phosphorylation of mitochondrial protein IscU. *J Biol Chem* 2014;289:31856-65.

41. Liang Y, Li J, Lin Q, Huang P, Zhang L, Wu W, et al. Research Progress on Signaling Pathway-Associated Oxidative Stress in Endothelial Cells. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:7156941.
42. Bruckdorfer KR. Antioxidants and CVD. *Proc Nutr Soc* 2008;67:214-22.
43. Tipoe GL, Leung TM, Hung MW, Fung ML. Green tea polyphenols as an anti-oxidant and anti-inflammatory agent for cardiovascular protection. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2007;7:135-44.
44. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15:316-28.
45. Khan N, Mukhtar H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Lett* 2008;269:269-80.
46. Stangl V, Dreger H, Stangl K, Lorenz M. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2007;73:348-58.
47. Yang CS, Lambert JD, Hou Z, Ju J, Lu G, Hao X. Molecular targets for the cancer preventive activity of tea polyphenols. *Mol Carcinog* 2006;45:431-5.
48. Yasuda Y, Shimizu M, Sakai H, Iwasa J, Kubota M, Adachi S, et al. (-)-Epigallocatechin gallate prevents carbon tetrachloride-induced rat hepatic fibrosis by inhibiting the expression of the PDGFRbeta and IGF-1R. *Chem Biol Interact* 2009;182:159-64.
49. Sakata R, Ueno T, Nakamura T, Sakamoto M, Torimura T, Sata M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cell line L190. *J Hepatol* 2004;40:52-9.
50. Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2017;17:545-58.
51. Dooley A, Shi-Wen X, Aden N, Tranah T, Desai N, Denton CP, et al. Modulation of collagen type I, fibronectin and dermal fibroblast function and activity, in systemic sclerosis by the antioxidant epigallocatechin-3-gallate. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:2024-36.
52. Kim J, Hwang JS, Cho YK, Han Y, Jeon YJ, Yang KH. Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on UVA- and UVB-induced skin damage. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001;14:11-9.
53. Kocak A, Harmancı D, Birlik M, Saroğlu S, Yılmaz O, Cavdar Z, et al. Effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on a scleroderma model of fibrosis. *Turk J Biochem* 2018. [Access: February 8, 2018]

8.6. Tezle İlişkili Konularda Başvuruya Hazırlık Aşamasında Olan Patent



İZMİR EKONOMİ ÜNİVERSİTESİ TEKNOLOJİ TRANSFER OFİSİ BULUŞ BİLDİRİM FORMU

A- Buluş Sahibi/sahipleri (Buluşu yapan gerçek kişi(ler)dir. Patent başvurusu sahibi değil iseler, buluşun kullanımı ve haklar üzerinde maddi tasarruf yetkileri yoktur)			
Adı-Soyadı	Gül Akdoğan	Adı-Soyadı	Ayşe Koçak Sezgin
Ünvan	Prof. Dr.	Ünvan	Dr. Öğr. Üyesi
Üniversite	İzmir Ekonomi Üniversitesi	Üniversite	Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Fakülte	Tıp Fakültesi	Fakülte	Tavşanlı Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu
Telefon	0 533 749 1796	Telefon	0 507 224 3706
E-posta	akdogan.gul@ieu.edu.tr	E-posta	ayse.kocaksezgin@ksbu.edu.tr
Uyruk/TC NO	TC/ 48862269128	Uyruk/TC NO	25393153898
Buluşta Pay Dağılımı	%30	Buluşta Pay Dağılımı	%10
Adı-Soyadı	Ferhan Sağın	Adı-Soyadı	Duygu Harmancı Karagülle
Ünvan	Prof. Dr.	Ünvan	Doktora Öğrencisi
Üniversite	Ege Üniversitesi	Üniversite	Dokuz Eylül Üniversitesi
Fakülte	Tıp Fakültesi	Fakülte	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Telefon	0 532 416 1288	Telefon	0 541 237 7647
E-posta	ferhan.sagin@gmail.com	E-posta	duyguharmanci@gmail.com
Uyruk/TC NO	TC/ 18202392502	Uyruk/TC NO	TC/ 17920772634
Buluşta Pay Dağılımı	%10	Buluşta Pay Dağılımı	%20
Adı-Soyadı	Cenk Demirdöver	Adı-Soyadı	Zihni Onur Uygun
Ünvan	Prof. Dr.	Ünvan	Araş. Gör.
Üniversite	Dokuz Eylül Üniversitesi	Üniversite	Ege Üniversitesi
Fakülte	Tıp Fakültesi	Fakülte	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Telefon	0 532 424 6269	Telefon	0 506 521 0009
E-posta	cenkddr@gmail.com	E-posta	onur_uygun@hotmail.com
Uyruk/TC NO	TC/ 24515341410	Uyruk/TC NO	TC/ 38812048408
Buluşta Pay Dağılımı	%10	Buluşta Pay Dağılımı	%20



B. Buluşun adı (kisa ve açıklayıcı olmalı)

Primer Fibroblast Hücre karakterizasyonu için biyosensör

Yukarıdaki isimlerin haricinde, herhangi bir danışmanlık hizmeti ya da gönüllü destek alındı mı? O kişilerin de buluş üzerinde payları var mı?

Yukarıdaki kişiler haricinde herhangi bir danışmanlık hizmeti ya da gönüllü desteği alınmamıştır. İzmir Ekonomi Üniversitesi'nden çalışmaya katkı sağlayan öğretim elemanları:
Prof. Dr. Gül Akdoğan

C. Buluş hakkında teknik detaylar ve süreç bilgisi

Buluşunuzun uygulama alanı/alanları nelerdir?

(Buluşunuzun ait olduğu teknik alan hakkında genel bilgi veriniz. Örnek: Buluşum x endüstrisinde, Y proseslerin de, Z yöntemi kullanılarak meydana getirilen xy ürünüdür.)

Buluş genel olarak biyosensörler alanında ve daha özel olarak, hücre kültürü biyobelirtecinin, bir elektrokimyasal ilecti üzerinde impedans sinyallerinin değıştirmek şekilde bağlanma veya başka şekilde reaksiyona sokmak için fonksiyonel yüzeylere sahip olan ilecticileri içeren biyosensörlerle ilgilidir.

Bildiğiniz benzer ürünler/uygulamalar nelerdir?

(Buluşunuzu gerçekleştirmeden önceki bence uygulamalar ve benzer uygulamadaki dezavantajları sorun ve yetersizlikleri eğer varsa şekil ve resimlerle açıklayınız. (Benzer bir uygulama yoksa bu gerekçe ortadan kalkar) Aksi takdirde hazırlayacağımız dosya da bu eksikliklerden bahsetmezsek patent alma sürecinde araştırma ve inceleme safhalarındaki bu durum ortaya çıkarak bize sorun teşkil edebilir.)

Veritabanı olarak Espacenet ve patent bilgi servisi olarak Patbase kullanılarak Ege Üniversitesi TTO ile birlikte yapılan patent taramasında, geliştireceğimiz ürüne benzer olmayan fakar aynı anahtar kelimelere sahip olarak 25 doküman bulunmuştur. Bizim ölçüm sistemimize en yakın olarak US8642287 cell-impedance sensorS, EP1773980 impedance based apparatuses and methods for analyzing cells and particles, US9448223 impedance spectroscopy-based cellular analysis device, US9448223 impedance-based sensing of adherent cells on a digital microfluidic device, US9121006 device for monitoring cell culture development isimli 5 çalışma saptanmıştır. Bu çalışmalarda ölçüm metodu bizim çalışmamızla benzer olsa da hedef molekülü farklı olan ölçüm sistemleri söz konusudur. Bu çalışmalara bakıldığında hepsi hücre ölçümü yapan impedans temelli ölçüm sistemleridir. Bu sistemlerin hiçbirisinde HSP47 ölçümü yapılmamıştır. Bu çalışmalarda uygulanan metodoloji sadece



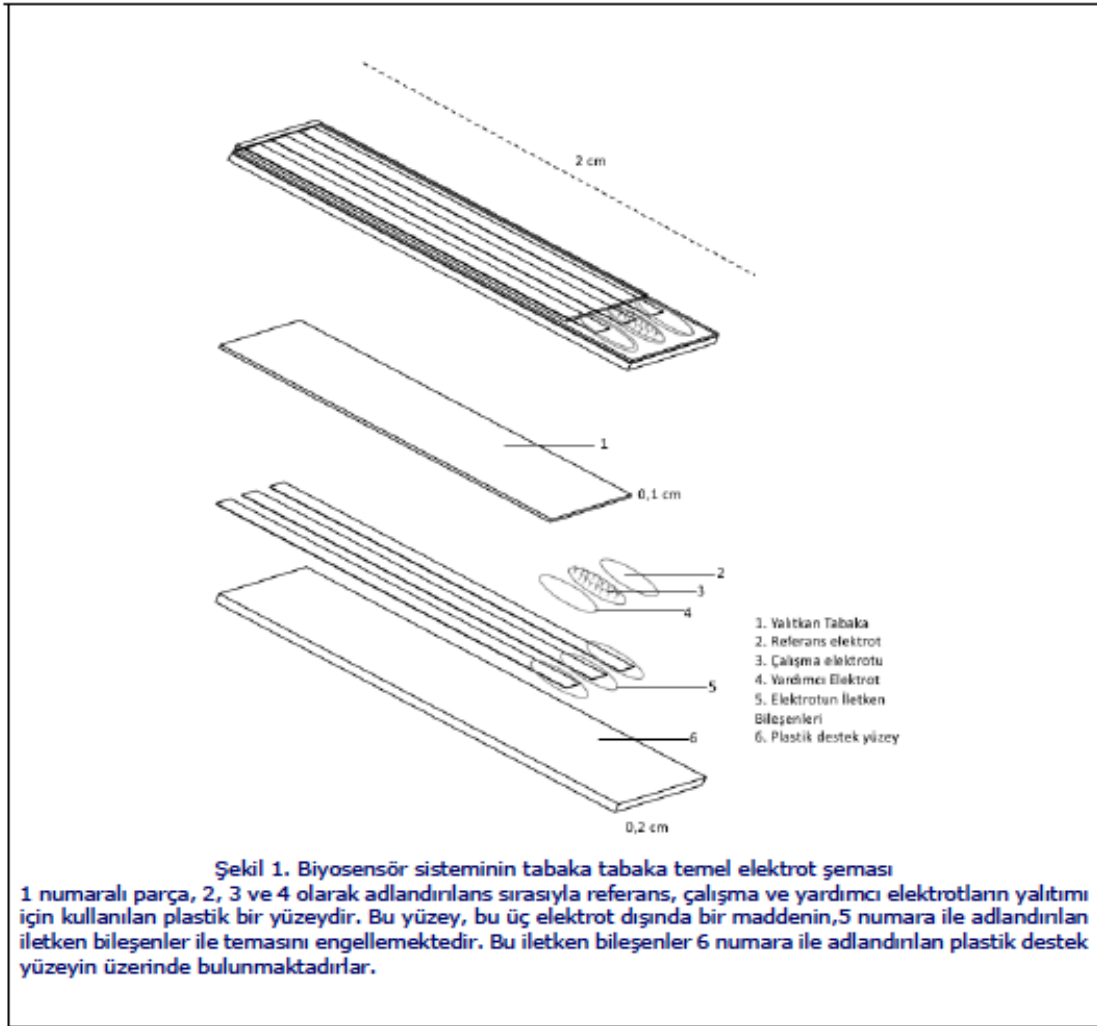
impedimetrik olarak belirli hücrelerin ölçülmesi üzerinedir. Geliştirdiğimiz sistem HSP47 'ye özgü olması açısından yenilikçi özelliği taşımaktadır.

Buluşunuzdan önce kullanılan sistemler/ürünler nasıl çalışıyordu? Bu sistemlerde/ürünlerdeki eksiklikler nelerdi? Buluşunuzdaki fark/ayrıcılıklar nelerdir? Hangi farkları yaratarak çözüm geliştirdiniz? Bu avantajlar ihtiyaç sahipleri için ne kadar önemli ve etkili? (maliyet avantajı, süre avantajı vs. detayında anlatınız)

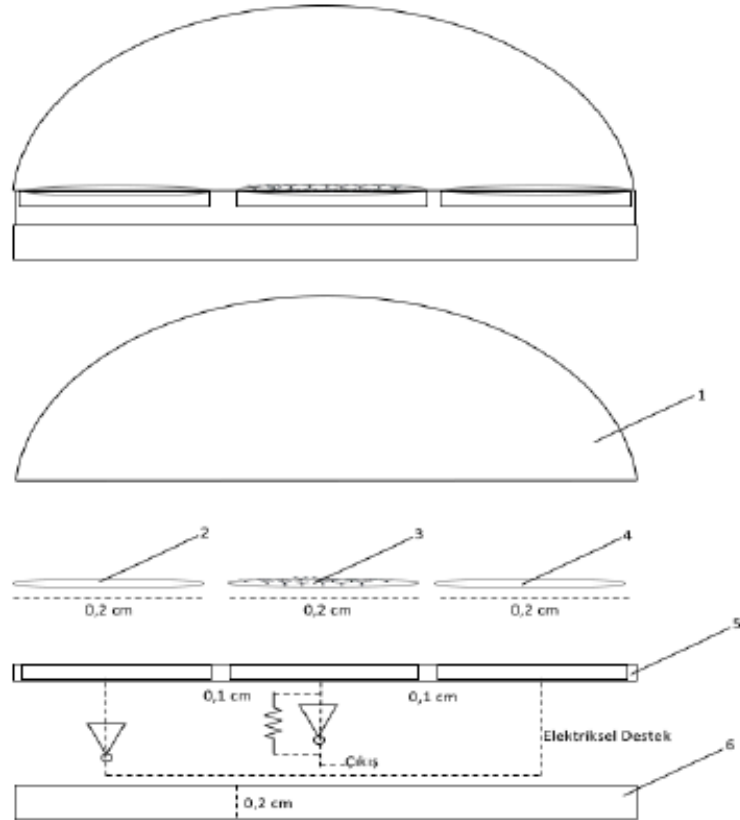
HSP 47 biyomolekülünün ölçümü, bizim geliştirdiğimiz metottan önce ve halen, enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA) denilen ve kompleks bir kit sistemi ile farklı kimyasalların farklı bekleme sürelerinde 96 kuyulu bir plak içindeki örnekler eklenerek ışık temelli bir ölçüm alınması ile (spektrofotometrik) kantitatif olarak yapılmaktadır. Bununla birlikte ayrıca, seçici olarak bir örnek üzerine damlatılan floresans işaretli bir immün boya (immunohistokimya/immunofloresan) ile genel olarak gözleme dayalı bir metot uygulanarak da hedef biyomolekülün belirleme çalışmaları yapılmaktadır. ELISA metodu, örneğin fiziksel özelliklerinden etkilenmektedir. Yani ölçüm anında örnekte bulanıklık veya şeffaf olmayan bir durum söz konusu olduğunda, ölçüm yapılamamakta ve yanlış sonuç elde edilmektedir. Ayrıca ELISA işlemi uzun süre alan ve gelişmiş ışık teknolojilerine sahip cihazlar ile ölçülebilen ve mutlaka cihaz konusunda yetkin bir personel gerektiren bir yöntemdir. İmmünohistokimya ise tamamen laboratuvar ortamında yapılması gereken ve altyapı gereklilikleri olan bir metoddur.

Mevcut sisteme (teknğin bilinen durumuna) göre buluş ile korunmak istenen unsurlar ve yöntemler nelerdir? (Detaylı olarak anlatınız) Varsa, buluşunuz ile ilgili teknik resimleri ve/veya formülleri forma ekleyiniz. Buluşunuzda renkli çizimler, çizimler içinde dolgular ve yazılar kullanılmamalıdır. Sadece şekillerin altına şekil numaraları verilmelidir (Şekil 1). Çizimlerde şekilleri meydana getiren parçalara (bir çizgi uzantısı ucuna) parça numarası verilmeli ve şekiller üzerindeki aynı parçalar aynı numara ile numaralandırılmalıdır.

Geliştirdiğimiz biyosensör sistemi ise, kullanılan örneğin kompozisyonundan etkilenmeyen, daha düşük maliyetli, laboratuvar ortamına gerek duymayan, düşük hacimde örnek ile doğrudan ölçüm yapılabilen ve bu alanda çalışan kişilerin kolaylıkla kullanabileceği bir sistemdir. Ayrıca, süre olarak 30 dakikanın altında ölçüm ile zamandan kazandıran ve daha duyarlı bir ölçüm metodu sunulmaktadır.



1. Örnek sıvısı
2. Referans elektrot
3. Çalışma elektrot
4. Yardımcı Elektrot
5. Elektrotun İletken Bileşenleri
6. Plastik destek yüzey



Şekil 2. Biyosensörün yandan görülen yapısı ve elektriksel devre şeması

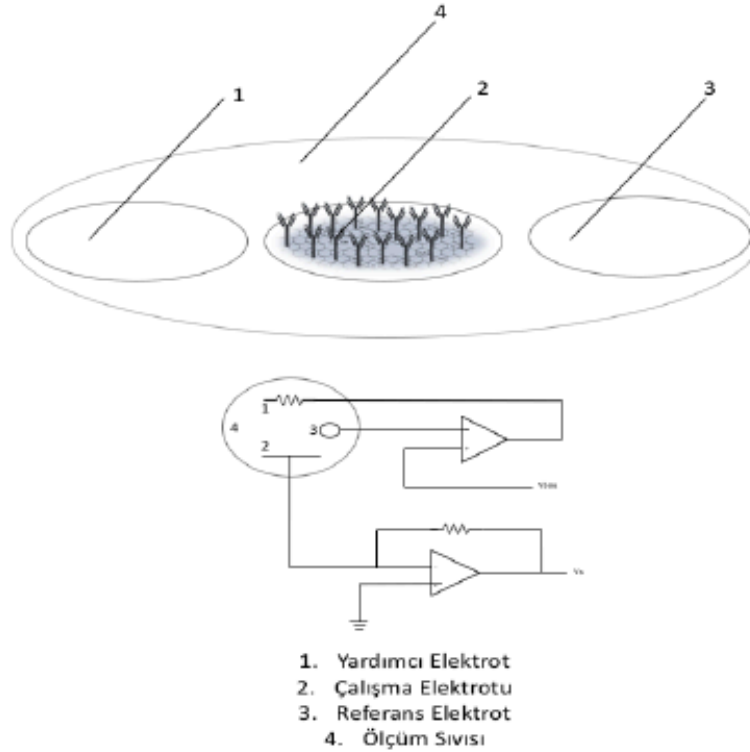
Şekil 2 de biyosensörün sıvı ile teması gösterilmektedir. 1 numara ile adlandırılan örnek sıvısı, 2, 3 ve 4 olarak adlandırılan sırasıyla referans, çalışma ve yardımcı elektrotlar ile temas etmektedir. Bu elektrotlar üzerindeki elektriksel akımı iletebilmek için 5 numaralı elektrotların iletken bileşenlerini tanımlayan kısım



ile temas halindedir. 2, 3 ve 4 numaralı parçalar dışında ölçüm sıvısı başka bir elektriksel iletken bileşen ile temas etmemektedir. Elektrotlar arası mesafe 0,2 cm olmaktadır.

Elektrotun üzerine damlatılan örnek zamanla ortada bulunan çalışma elektrotu ile temasa girecektir. Bu temas ile çalışma elektrotu üzerinde bulunan grafen tabakalarına zaman içerisinde bağlanacaktır. Bu bağlanma ile çalışma elektrotu üzerine yardımcı elektrot tarafından gönderilen impedans sinyallerinde artış söz konusu olacak ve bu sinyal ile ölçüm gerçekleştirilecektir.

Şekil 3'te devre şemasını elektriksel olarak tamamlayan ölçüm sıvısının şematize edilmiş yapısı ve elektriksel devre şeması görülmektedir.



Şekil 3. Biyosensörün elektriksel devre şeması

1, 2 ve 3 olarak adlandırılan 2, 3 ve 4 olarak adlandırılan sırasıyla referans, çalışma ve yardımcı elektrotların sıvı ile temasındaki (4) elektriksel devre şeması ve sistemin elektriksel çalışma prensibi gösterilmiştir.



3. Kişiler tarafından üretilebilecek alternatifler nelerdir? (Buluşumuzun olağan yapısının haricinde üretilebilecek benzer uygulamaları ve buluşumuzun kullanılabileceği diğer sistem ve uygulamaları da belirtmeniz gerekir.) Buluşun kullanılabilirliği özellikle bakıldığında, hedef molekülün yüzeye bağlanması ile yapılan impedimetrik/kapasitif ölçümün temel ölçüm prensibi olması nedeniyle, bu ölçüm yöntemi ve şekil şemasının bizim sistemimiz üzerinde yapılabilecek herhangi bir molekülün ölçümü için biyosensör sistemi optimize edilebilir.
Görüşmelerde, yukarıdaki isimlerden hangisi öncelikli kontak olmalı, lütfen belirtiniz. Araş. Gör. Zihni Onur UYGUN, görüşmelerde ağırlayıcı ve teknik bilgi sunabilmektedir.
Buluşunuzla ilgili, araştırma sürecinde, herhangi bir insandan biyolojik bir madde kullanıldı mı? Cevabınız evet ise etik kurallar ve sonuçların/buluşun ticari kullanımı için gerekli izinler alındı mı? Lütfen ayrı bir A4 sayfada tüm detayları ile belirtiniz. Araştırma sürecinde insan deri dokusu alınmıştır. Bununla ilgili detaylar ve etik kurul belgesinin kopyası ekte (EK1) sunulmuştur.
D- Buluş hakkında ticarileşme ve pazar bilgisi Buluşunuza benzer yayın, makale, patent başvurusu, alınmış patent gibi dokümanların araştırılması için kullanılmak üzere buluşunuzu tanımlayan anahtar kelimeleri belirtiniz. Buluşunuzla ilgili bir patent araştırması yaptıysanız bulduğunuz sonuçları, kullandığınız anahtar kelimeleri ve sizin projenizin tespit edilen dokümanlara göre farklı olduğunu düşündüğünüz yönlerini belirtiniz.
Buluşu tanımlayan anahtar kelimeler: biyosensör, impedans, kapasitans, HSP-47, hücre kültürü, fibroblast US5141868A1984-06-131992-08-25 Internationale Octrooi Maatschappij "Octropa" BvDevice for use in chemical test procedures



DE3789430T2	1986-06-17	1994-10-27	Baxter Diagnostics Inc	Homogenes fluortestverfahren mit abstoss des fluorzenten hintergrundes.
US4833073A	1987-01-27	1989-05-23	Hoffmann-La Roche Inc.	Immunoassay for tetrahydrocannabinol metabolites
DE68924026D1	1988-03-31	1995-10-05	Matsushita Electric Ind Co Ltd	Biosensor und dessen herstellung.
DE69030829T2	1989-03-10	1998-01-15	Hoffmann La Roche	Reagenzien zum Nachweis von Drogen
US5262035A	*1989-08-02	1993-11-16	E. Heller And Company	Enzyme electrodes
US4999632A	1989-12-15	1991-03-12	Boehringer Mannheim Corporation	Analog to digital conversion with noise reduction
US5243516A	1989-12-15	1993-09-07	Boehringer Mannheim Corporation	Biosensing instrument and method
US5192415A	1991-03-04	1993-03-09	Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.	Biosensor utilizing enzyme and a method for producing the same
US5264103A	1991-10-18	1993-11-23	Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.	Biosensor and a method for measuring a concentration of a substrate in a sample
US5846708A	*1991-11-19	1998-12-08	Massachusetts Institute Of Technology	Optical and electrical methods and apparatus for molecule detection
CA2096495C	1992-06-16	2002-07-09	Kathy Palmer Ordonez	Dosage immunologique pour deux analytes
DE4318519C2	*1993-06-03	1996-11-28	Fraunhofer Ges Forschung	Elektrochemischer Sensor
US5366609A	1993-06-08	1994-11-22	Boehringer Mannheim Corporation	Biosensing meter with pluggable memory key
US5405511A	1993-06-08	1995-04-11	Boehringer Mannheim Corporation	Biosensing meter with ambient temperature estimation method and system
US5352351A	1993-06-08	1994-10-04	Boehringer Mannheim Corporation	Biosensing meter with fail/safe procedures to prevent erroneous indications
WO1994029705A1	1993-06-08	1994-12-22	Boehringer Mannheim Corporation	Biometre detectant la mise en place idoine d'une electrode et distinguant entre une bandelette porte-echantillon et une bandelette de reference
US5494831A	*1993-08-30	1996-02-27	Hughes Aircraft Company	Electrochemical immunosensor system and methods
US5589326A	*1993-12-30	1996-12-31	Boehringer Mannheim Corporation	Osmium-containing redox mediator
US5437999A	1994-02-22	1995-08-01	Boehringer Mannheim Corporation	Electrochemical sensor
JP3027306B2	1994-06-02	2000-04-04	松下電器産業株式会社	バイオセンサおよびその製造方法
DE69528081T2	*1995-02-14	2003-04-30	Roche Diagnostics Corp	Osmium enthaltender redoxvermittler
US5817766A	1995-04-05	1998-10-06	Roche Diagnostic Systems, Inc.	Reagents for a cannabinoid immunoassay
US5698083A	*1995-08-18	1997-12-16	Regents Of The University Of California	Chemiresistor urea sensor
DE19610115C2	*1996-03-14	2000-11-23	Fraunhofer Ges Forschung	Detektion von Molekülen und Molekülkomplexen



US6358752B1	*1996-09-272002-03-19 Cornell Research Foundation, Inc.Liposome-enhanced test device and method
US5958791A	*1996-09-271999-09-28 Innovative Biotechnologies, Inc.Interdigitated electrode arrays for liposome-enhanced immunoassay and test device
US5874046A	*1996-10-301999-02-23 Raytheon Company Biological warfare agent sensor system employing ruthenium-terminated oligonucleotides complementary to target live agent DNA sequences
US5939332A	1998-02-271999-08-17 Roche Diagnostics Corp. Phencyclidine analogs for immunoassay
CA2333732C	1998-06-012005-10-11 Roche Diagnostics Corporation Conjugues d'un complexe imidazole-osmium a oxydo-reduction reversible
US6338790B1	*1998-10-082002-01-15 Therasense, Inc.Small volume in vitro analyte sensor with diffusible or non-leachable redox mediator
US6676816B2	2001-05-112004-01-13 Therasense, Inc.Transition metal complexes with (pyridyl)imidazole ligands and sensors using said complexes
US7276146B2	2001-11-162007-10-02 Roche Diagnostics Operations, Inc.Electrodes, methods, apparatuses comprising micro-electrode arrays
US8288544B2	*2003-07-012012-10-16 Roche Diagnostics Operations, Inc.Electrochemical affinity biosensor system and methods

E. Buluşa Fikri/Sınai Mülkiyete konu olan proje kapsamında destek bilgisi

Buluş Fikri/Sınai Mülkiyete Konu olan proje kapsamında desteklendi mi?			
☒ Evet ☐ Hayır			
Evet ise:			
Destek Programları	Başlangıç-Bitiş Tarihleri	Projenin Toplam Bütçesi	Sağlanan Destek Tutarları
TÜBİTAK-1005	01/12/18-01/06/20	199.488,00	
FSMH sınırlaması oldu mu? ☐ Evet ☒ Hayır			
Anlaşma yapıldı mı? ☐ Evet ☒ Hayır			
Fikri/sınai mülkiyet hakkına konu olan araştırma/ proje herhangi bir ayni destek -mesela ekipman, hammadde, vb- kullandı mı? Yanıtınız evet ise lütfen tutarı belirtiniz			
Zihni Onur Uygun tarafından potansiyostat cihaz desteği sunulmuştur.			
Fikri/sınai mülkiyet hakkına konu olan araştırma/ proje herhangi bir üniversite desteği alındı mı?Üniversite kaynağı kullanıldı mı?			
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı AR-LAB hücre kültürü laboratuvarı kullanılmıştır.			



F. Buluşa ait yayın bilgisi

Buluş konusu çalışmanızı daha önce yayınladınız mı?

☐ Evet
☒ Hayır

Evet ise:

Yayınlandığı Mecra	Yayın Tarihi	Yayın İçeriği

Buluş konusu çalışmanızla ilgili yayın yapmayı planlıyor musunuz ?

☐ Evet ☒ Hayır

Evet ise:

Yayınlanacağı Mecra	Yayın Tarihi	Yayın İçeriği



G-Başvuru Sahibi/sahipleri (Başvuru sahibi adına patent başvurusu yapılan kişi(ler)dir. Patentün sahibi olup, ileride patent üzerinde her türlü maddi ve manevi haklara ve bu hakların kullanımına ilişkin tasarruf yetkisine sahip kişi(ler)dir.)
Başvuru sahibi ile buluş sahibi aynı kişi ise doldurmayınız.

Adı-Soyadı		Adı-Soyadı	
Ünvan		Ünvan	
Üniversite	İzmir Ekonomi Üniversitesi	Üniversite	Ege Üniversitesi
Fakülte	Tıp Fakültesi	Fakülte	Tıp Fakültesi
Telefon		Telefon	
E-posta		E-posta	
Uyruk/TC NO		Uyruk/TC NO	
Adı-Soyadı		Adı-Soyadı	
Ünvan		Ünvan	
Üniversite	Dokuz Eylül Üniversitesi	Üniversite	Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Fakülte	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Fakülte	Tavşanlı Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu
Telefon		Telefon	
E-posta		E-posta	
Uyruk/TC NO		Uyruk/TC NO	

Bu formda verdiğim bilgilerin doğru, gerçek ve tam olduğunu kabul ve beyan ederim.

Adı/Soyadı : Duygu Harmancı Karagülle Tarih: 11/12/2020 İmza:

Önemli Not:

- Bu başvuru formunu doldurarak ve gerekli bilgileri vererek İzmir Ekonomi Üniversitesi İEU-TTO'nun burada yer alan proje ile ilgili fikri mülkiyet hakkı sürecini izleme ve gerekiyorsa ilgili kuruluşlara başvuru yapma sürecini başlatmış oluyorsunuz. Bu durum; bundan sonraki adımlara gerekli desteği vereceğiniz ve gerekli bilgiyi sağlayacağınız anlamına gelmektedir. Bu başvuruda verilen ve bundan sonra verilecek bilgilerin eksik, yanlış ve ya açık olmaması sonucunda doğabilecek maddi ve manevi tazminatlar şahsınıza rücu ettirilebilecektir. Bu başvuruyu yaparak bu hususu kabul etmiş oluyorsunuz.
- Bu formu dolduran kişiler söz konusu fikri mülkiyet hakkının oluşturulmasına katkı sağlamış olabilirler. Ancak bu durum; formu dolduran herkesin söz konusu fikri mülkiyet hakkının maliki olacağı veya yasal hak kazanacağı anlamına gelmez.

8.7. Sözlü Sunum



www.TurkJBiochem.com

TÜRK BİYOKİMYA DERGİSİ

Turkish Journal of Biochemistry

TBD ULUSLARARASI BİYOKİMYA KONGRESİ 2018
29. ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ
26-30 Ekim 2018, Muğla

TBS INTERNATIONAL BIOCHEMISTRY CONGRESS 2018
29TH NATIONAL BIOCHEMISTRY CONGRESS
26-30 October 2018, Muğla

Türk Biyokimya Derneği'nin yayın organıdır.
[Published by the Turkish Biochemical Society]

2018
Cilt [Volume] 43
Ek Sayı [Supplement] 5

YER ALDIĞI
İNDEKSLER
[INDEXED BY]

SCI Expanded,
Journal Citation
Reports/Science
Edition, Chemical
Abstracts, Index
Copernicus,
Embase, Scopus,
Ulakbim Türk
Tıp Dizini,
Ulrich's Periodical
Directory, EBSCO,
Türkiye Atf Dizini

Briefly, it don't account for all results, bias correction is applied twice and the foremost there is no harmonization in the tolerance limits. The harmonization problem was addressed in our study and sigma values were calculated by different tolerance limits recommended by various organizations. In addition, sigma calculation has been performed analyte-based goals which was determined to the quality expectations of our laboratory in line with Milan hierarchy. MATERIALS and METHODS: Sigma values were calculated using CLIA, Ricos, RCPA and Turkey TEa goals for 15 parameters. The benchmark performance was accepted 3σ. RESULTS: In our study, RCPA goals are the most stringent, followed by the Ricos BV Desirable, CLIA, and finally the Turkey TEa goals coming in last. According to RCPA goals, seven analytes failed to reach the required sigma level. In contrast, all analytes have met required quality level for Turkey TEa. In analyte-based goals only albumin showed borderline performance when electrolytes were excluded. CONCLUSIONS: It is important to ensure harmonization of tolerance limits for objectively international comparison. Furthermore, it is considered that the utilization of analyte-based goals is the most reasonable way, up to international consensus on tolerance limits. Keywords: Six Sigma, Quality management, Harmonization

OP-021 RATIONAL USE OF LABORATORY TEST REQUEST PROCEDURE: 25-HYDROXY VITAMIN D

Habib Özdemir, Zeki An, Cevval Ulman
Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Manisa

OBJECTIVES: Rational Use of Laboratory Test Request Procedure released by Ministry of Health, Republic of Turkey on 06 March 2018 recommends 90 day request interval for 25-Hydroxy-Vitamin-D. In this study we aimed to determine the rate of recurrent testing for Vitamin D. MATERIALS and METHODS: Numbers of Vitamin D test requests for year 2017 were obtained from laboratory information system. Patients were divided into two groups as adult and pediatric. Requests were evaluated based on Vitamin D test per patient in 90 days and also as low and normal based on reference range. RESULTS: There were 22580 Vitamin D tests requested in year 2017 and 4290 (19%) of them were repeated test request in 90 days. Among the 4290 repetition of tests for Vitamin D, 4104(95.7%) of them were requested from adult and 186 (4.3%) test from pediatric patients. The most frequent repetitions were from Internal Medicine inpatient and outpatient clinics (80%) within adult patients. It is noteworthy that Vitamin D test results from 2342 (56.2%) adult patients were low if repeated in the last 90 days. CONCLUSIONS: Although the Ministry of Health recommends 90 days testing interval in the procedure, we observed 19% of repeat rate. Laboratory tests should answer a specific question and be performed only if their results can have an impact on patient care. Because most of our repetitions were from low reference range patients, we believe an exception of 90 days limit for those in needs, could have an impact on patient care. Keywords: Rational Use of Laboratory Test Request Procedure, 25-Hydroxy Vitamin D, Appropriate Test Request

OP-022 MIR-29b-2 REGULATES LYSYL OXIDASE-LIKE 2 AND HEAT SHOCK PROTEIN 47 IN HYPERTROPHIC SCAR

Doğru Harmancı¹, Ayşe Koçak², Cenk Demirdöver³, Gül Güner Akdoğan⁴
¹Department of Molecular Medicine, Graduate School of Health Sciences, Dokuz Eylül University, İzmir
²Department of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery, School of Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir
³Department of Medical Biochemistry, School of Medicine, İzmir University of Economics, İzmir

OBJECTIVES: Hypertrophic scars are characterized by erythematous and raised fibrous lesions predominantly composed of excessive amounts of collagen deposits. Despite many studies that have examined the pathophysiology of hypertrophic scars, the underlying causes and the best treatment modalities are still unknown. The miR29 family in humans includes four different members. The particular interest of miR29 family members is due to their ability to inhibit the synthesis of extracellular matrix (ECM) proteins, especially collagens. The aim of this study was to investigate the role of miR-29 family on the collagen maturation in primary hypertrophic scar cells. MATERIALS and METHODS: Tissue specimens were collected and established primary normal and hypertrophic scar fibroblast cell cultures. Evaluation of miR-29 family members' gene expression was determined by using qPCR. After transfection, extracellular LOX activity was measured using LOX activity kit in supernatants. LOX and HSP47 protein expressions were determined by using Western Blotting. RESULTS: The significant decrease in miR-29b-2 gene expression in skin hypertrophic scar tissue was determined in comparison to healthy control skin. After miR-29b-2 transfection, extracellular LOX activity decreased in transfected hypertrophic scar fibroblast cells compared to non-transfected scar cells. Transfection of primary hypertrophic scar cells with miR29b-2 led to a significant increase HSP47 and LOXL2 protein expression.

CONCLUSIONS: Downregulation of miR-29b-2 caused overexpression of LOXL2 and HSP47 in hypertrophic scar. Overexpression of these genes enhances the aggressiveness of this disease. The identification of novel pathways regulated by the downregulation of miRNA may lead to a better understanding of molecular pathogenesis in fibrotic diseases. Keywords: hypertrophic scar, HSP47, LOX, miR-29 family,

OP-023 MGLU2 MGLU3 EXPRESSION LEVELS AT DIFFERENT L-GLUTAMATE DOSES IN SCHIZOPHRENIA MODEL

Doğru Vardaglı¹, Muhsin Öztürk², Emel Ulakoglu Zengin³
¹Medical Laboratory Techniques Program, Istanbul Esenyurt University, Istanbul
²Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Istanbul Esenyurt University/Istanbul
³Cerrahpaşa Medical School, Department of Biochemistry, Istanbul University, Istanbul

OBJECTIVES: Glutamate and glutamate receptors which are widely to serve in the brain synapses, suggesting that the brain main glutamate pathways in the etiology of many diseases hosting psychosis. Although a narrower range as a group of diseases using the diagnostic criteria of psychosis, schizophrenia is one of the diseases in this scale. In this research, we planned a ketamine induced NMDA antagonism in Wistar rats, in order to examine the role of metabotropic glutamate receptors modulation and expression in schizophrenia pathology. MATERIALS and METHODS: Ketamine which is an anesthetic is treated daily in 30mg/kg for 5 days. On the day when the injections are completed, brain tissues of the animals will immediately be removed under phenobarbital (50mg/kg) anesthesia and these tissues are maintained under -80°C until the laboratory research time. Receptors expression levels are detected by western blotting method in control and ketamine groups and also in the experiment groups generated by different L-glutamate doses. We evaluate the statistical significance of the data, SPSS 20 program. RESULTS: According to the statistical results we obtained in our study; metabotropic glutamate receptor levels (mGlu2, mGlu3) in both brain regions prefrontal cortex and striatum were decreased in high concentrations of L-glutamate, whereas no significant changes in the metabotropic glutamate receptor expressions in lower concentrations of L-glutamate. CONCLUSIONS: Decreasing expression level of metabotropic glutamate receptor at high concentrations of L-glutamate suggests that if intracellular calcium concentration state is primary related with autoreceptor function. Keywords: Ketamine, Schizophrenia, mGlu2, mGlu3, Glutamate

OP-024 DETERMINING OF NIS GENE EXPRESSION IN GASTRIC TISSUE OF MORBID OBESE INDIVIDUALS

Deniz Mihcioglu¹, Filiz Özbaş Gerçekler², Başar Aksoy³, Nimet Yılmaz⁴, Süleyman Nezir Hekim⁵
¹Department of Medical Biology, School of Medicine, SANKO University, Gaziantep
²Department of Biology, Faculty of Art and Science, Gaziantep University, Gaziantep
³Department of General Surgery, School of Medicine, SANKO University, Gaziantep
⁴Department of Gastroenterology, School of Medicine, SANKO University, Gaziantep
⁵Department of Medical Biochemistry, School of Medicine, Cumhuriyet University, Sivas

OBJECTIVES: Obesity is seen as one of the top ten (10) illness's listed by World Health Organization (WHO). Sodium Iodide Symporter (NIS) gene is a plasma membrane glycoprotein that mediates iodide uptake in thyroid glands, stomach, salivary glands, lactating mammary glands and intestine. The aim of the study is to determine the Sodium Iodide Symporter (NIS) gene expression level between morbid obese and non-obese individuals in gastric tissue. MATERIALS and METHODS: In this study, 33 individuals diagnosed with obesity and control group consisted of gastric tissue of 21 subjects with normal BMI were collected. RNA isolation, cDNA synthesis and qRT-PCR analyses were performed on the samples to determine NIS gene expression. TSH levels of morbid obese patients were compared to non-obese group. RESULTS: Demographic data of obese and control groups had significant differences (p<0.001) in age, weight and BMI. TSH levels of obese patients were compared to non-obese group. Statistically significant difference was found between preoperation of morbid obese and control groups (p=0.015) and between preoperation and postoperation of obese group (p=0.001). No significant difference (p>0.05) was observed between the obese and control groups in NIS gene expression levels. CONCLUSIONS: Because of the interaction between NIS and the other ion pumps, new studies are needed for better understanding the ion channel mechanisms. Additionally, as the obesity is influenced by genetic factors, the research will also contribute to the question of the familial transition while the samples are collected from the obese individuals. Keywords: Gene Expression, NIS, Obesity,

TBD ULUSLARARASI BİYOKİMYA KONGRESİ 2018

29. ULUSAL BİYOKİMYA KONGRESİ

TBS INTERNATIONAL BIOCHEMISTRY CONGRESS 2018

29TH NATIONAL BIOCHEMISTRY CONGRESS



Sayın

Duygu Harmancı Karagülle

**HİPERTROFİK SKARDA miR-29b-2 LİZİL OKSİDAZ BENZERİ PROTEİN 2 VE ISI ŞOK
PROTEİNİ 47'Yİ DÜZENLER**

TBD Uluslararası Biyokimya Kongresi 2018 -
XXIX. Ulusal Biyokimya Kongresi'nde sözlü sunum olarak sunulmuştur.
Katılım ve katkılarınızdan dolayı teşekkür ederiz.

26-30 Ekim 2018

Hilton Bodrum Türkbükü / Bodrum - MUĞLA

Doğan YÜCEL
Türk Biyokimya Derneği Başkanı