

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (HGF) İLE LİSANSLANMIŞ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE ANTI-FİBROTİK miRNA İFADE
DÜZEYLERİ

Ali Berk Alişan

Kök Hücre Programı

Yüksek Lisans Tezi

ANKARA

2024

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (HGF) İLE LİSANSLANMIŞ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE ANTI-FİBROTİK miRNA İFADE
DÜZEYLERİ

Ali Berk Alişan

Kök Hücre Programı

Yüksek Lisans Tezi

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. AYŞEN GÜNEL ÖZCAN

ANKARA

2024

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (HGF) İLE LİSANSLANMIŞ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE ANTI-FİBROTİK miRNA İFADE
DÜZEYLERİ

Ali Berk Alişan

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Betül ÇELEBİ SALTIK

(İmza)

Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN

(İmza)

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

(İmza)

Ankara Üniversitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir⁽³⁾

27.06.2024

(İmza)

Ali Berk Alişan

“**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**”

(1) **Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.**

(2) **Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.**

(3) **Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan iş birliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.**

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

*** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini, kullanılan hücrelerin ticari olarak satın alınmış olması sebebiyle etik kurul başvurusu gerektirmediğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

(İmza)

Ali Berk ALIŞAN

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans öğrenim sürecimin başından sonuna kadar; gece-gündüz ya da hastalık-sağlık farketmeksizin her zaman desteğini hissettiren hem teknik hem de teorik gelişimim için karşılığı ödenemeyecek kadar emek ve vakit harcayan, 2021 yılında girmiş olduğum akademik yolda ilerleyebilmek için gerekli vizyonu her geçen gün daha çok benimsememde önemli katkıları olan çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN'a sonsuz teşekkürlerimi ve hürmetlerimi sunarım.

Araştırma ekibimizin üyeleri Öğr. Gör. Dr. Özge Burcu ŞAHAN'a ve doktora öğrencisi Mustafa KELEŞ'e bana hem birer abla ve ağabey, hem laboratuvar arkadaşı oldukları ve tez sürecim boyunca aktardıkları tecrübeler ile bana kattıkları değerler için,

Hacettepe Kök Hücre ailesinin değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA, Prof. Dr. Fatma Visal OKUR, Prof. Dr. Betül ÇELEBİ SALTİK, Doç. Dr. Fatima AERTS-KAYA ve Dr. Öğr. Üyesi Cansu ÖZDEMİR-SAKA'ya gerek derslerde, gerekse ders dışında bizlere aktardıkları bilgi birikimleri ve mentörlükleri için,

Buraya geldiğim günden bugüne kadar ihtiyacım olan birçok konuda desteklerini esirgemeyen ve her birinin bende ayrı yeri olan; Öğr. Gör. Dr. Burcu Özçimen, Sena Babadağ, Sema Nur Gür, Emin Şeker ve Özgür Doğuş Erol başta olmak üzere Kök Hücre Anabilim Dalı öğretim görevlileri, öğrencileri ve çalışanlarının tamamına yüksek lisans sürecimin eğlenceli ve mutlu geçmesini sağladıkları için,

Eğitim hayatıma ilk başladığım günden beri her zaman desteklerini arkamda hissettiğim, biricik aile üyelerim babam Ayhan Alişan, annem Necmiye Alişan ve canım kardeşim Aleyna Alişan'a; yüksek lisans öğrenimim, tez sürecim ve gelecekte yapmak istediklerim hakkında bana daima inandıkları, yanımda oldukları ve hayatımı güzelleştirdikleri için,

Son olarak çok kıymetli dostum Enes Kuloğlu'na, tercih ettiğim bu zor yolda karşıma çıkan zorluklarda yanımda olduğu ve hayatımda büyük bir boşluğu doldurduğu için, Teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Alişan, AB., Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) ile Lisanslanmış Mezenkimal Kök Hücrelerde Anti-fibrotik miRNA İfade Düzeyleri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2024. Mezenkimal kök hücreler (MKH) yara iyileşmesinde ve fibrozis oluşumunda kritik rol oynamaktadır. Salgıladıkları sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri; fibrozis fizyopatogenezinde ve oluşan doku hasarının sağlıklı iyileşmesinde doğrudan etkilidirler. MKH'ler tarafından salgılanan büyüme faktörlerinden bir tanesi olan Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) üzerinde yapılan *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarda; HGF ile uyarılan MKH'lerin çeşitli stres koşullarına karşı dirençlerinin ve rejeneratif kapasitelerinin arttığı gösterilmiştir. Fibrozis ilerleyişinde gerekli olan mekanizmaları, hedefledikleri gen transkriptlerini yıkarak inhibe eden anti-fibrotik miRNA'lar da MKH'lerin buldukları ortama salgıladığı elemanlardan biridir. Bu çalışmada insan kemik iliği kaynaklı MKH'leri (Kİ-MKH) HGF ile lisansladıktan sonra hücrelerde ifadenmesi değişen anti-fibrotik miRNA'lar kantifiye edildi ve HGF lisanslaması ile ifadenmesi iki kat üzerinde değişen üç miRNA tespit edildi. Bunlardan miR-32-5p (fibrotik) ve miR-377-3p (anti-fibrotik) ifadesi arttığı, miR-10a-5p (fibrotik) ifadesinin azaldığı görüldü. Bu miRNA'ların hedeflerinin veritabanlarında araştırılması sonucunda üç miRNA'nın ortak hedefleri, fibrozis ana mekanizmalarından olan TGF- β , WNT ve Hippo yollarına odaklı değerlendirildiğinde HGF lisanslamasının MKH'lere anti-fibrotik özellik kazandırdığına işaret etmiştir. Ayrıca HGF'nin canlılığı etkilemediği, yara iyileşmesini hızlandırdığı ve popülasyon ikiye katlanmasını kısıtladığı gösterildi. MKH'leri TGF- β ile indüksiyonu ile myofibroblast yönünde farklılaşmaya yönlendirdiğimiz fibrozis modeli üzerinde *transwell* sistemi ile HGF-MKH'leri kokültür ederek lisanslamının etkilerini incelediğimizde HGF lisanslamasının fibrozisi çözücü etkisini saptayamadık. Bulgularımızın biyolojik anlamlılığını ortaya koymak için, sonuçların daha detaylı karakterizasyonlar ile değerlendirilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, fibrozis, HGF, anti-fibrotik miRNA'lar

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: THD-2022-20332

ABSTRACT

Alişan, AB., Expression Levels Of Anti-Fibrotic miRNA's in Hepatocyte Growth Factor (HGF) Primed Mesenchymal Stem Cells, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Stem Cell Program Master's Thesis, Ankara, 2024.

Mesenchymal stem cells (MSCs) play a critical role in wound healing and fibrosis formation. The cytokines, chemokines and growth factors they secrete are directly involved in the physiopathogenesis of fibrosis and the actual healing of tissue damage. In vivo and in vitro studies on Hepatocyte Growth Factor (HGF), one of the growth factors secreted by MSCs, have shown that MSCs stimulated with HGF are more resistant to hypoxia and apoptosis, their proliferation and migration potential is increased, and their tissue repair capacity is enhanced by its immunoregulatory effect. Antifibrotic miRNAs are also secreted into the environment and they inhibit the mechanisms necessary for the progression of fibrosis by degrading the gene transcripts they target. In this study, we quantified the antifibrotic miRNAs whose expression changed in cells after priming human bone marrow-derived MSCs (BM-MSC) with HGF, and three miRNAs whose expression level changed more than two-fold with HGF priming were identified. Among these, miR-32-5p (fibrotic) and miR-377-3p (anti-fibrotic) expression have been increased and miR-10a-5p (fibrotic) expression has been decreased. As a result of searching the targets of these miRNAs in databases, when the common targets of the three miRNAs were evaluated focused on TGF- β , WNT and Hippo pathways, which are among the main mechanisms of fibrosis, indicated that HGF priming provided antifibrotic properties to the MSCs. It was also shown that HGF does not affect viability, accelerates wound healing and restricts population doubling. When we examined the effects of licensing by coculturing HGF-MSCs with a transwell system on the fibrosis model in which we induced myofibroblast differentiation by TGF- β induction, we could not detect a fibrosis-resolving effect. In order to demonstrate the biological significance of our findings, the results need to be evaluated with more detailed characterizations.

Keywords: mesenchymal stem cell, fibrosis, HGF, anti-fibrotic miRNA's

This thesis was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects

Coordination Unit. Project number: THD-2022-20332.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mezenkimal Kök Hücreler	4
2.2. Fibrozis	4
2.3. MKH'lerin Tedavi Amaçlı Kullanım Alanları	6
2.4. Fibrozis Tedavisinde Ön Koşullanmış MKH'ler ve miRNA'lar	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM	10
3.1. Antifibrotik miRNA'ların Belirlenmesi	10
3.2. MKH Kültürü ve HGF ile Lisanslanması	10
3.3. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve RT-qPCR	12
3.3.1. Total RNA Miktarı ve cDNA Dilüsyonları İçin Optimizasyon Çalışmaları	13
3.4. HGF ile Lisanslanmış MKH'lerde Farklı İfade Olan Fibrozis ile İlişkili miRNA İfadeleme Düzeylerinin RT-qPCR ile Belirlenmesi	14

3.4.1. Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel - Çalışma 1	14
3.4.2. Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel - Çalışma 2	17
3.5. HGF Lisanslaması ile İfadesi Değişen miRNA'ların Hedef Genlerinin Belirlenmesi ve Biyolojik/Fonksiyonel Zenginleştirme Analizleri	18
3.6. WST-1 Metabolik Aktivite Testi	19
3.7. Popülasyon İkiye Katlanma Tayini	20
3.8. Lateral Motilite Testi	20
3.9. Fibrozis Modeli Üzerinde Kokültür Deneyleri	21
4. BULGULAR	22
4.1. Fibrozis ile İlişkili miRNA'ların Saptanması	22
4.2. MKH Kültüründe Mycoplasma Kontaminasyonunun Tayini	23
4.3. RNA Ölçümleri ve Kalite Tayini	23
4.4. Panelde Kullanılacak Optimum cDNA'yi Belirleme Çalışmalarının Sonuçları	24
4.5. Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel – Çalışma 1 Sonuçları ve Değerlendirmesi	30
4.6. Optimizasyon Çalışmaları İçin 800 ng, 2000 ng ve 4000 ng Total RNA ile Yapılan qPCR Sonuçları	34
4.7. Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel – Çalışma 2 Sonuçları ve Değerlendirmesi	35
4.8. Biyolojik ve Fonksiyonel Zenginleştirme Analizlerinin Sonuçları	39
4.9. WST-1 Metabolik Aktivite Testi: HGF Uyarımı MKH'lerin Canlılığını Etkilememektedir.	45
4.10. Profilerasyon ve Popülasyon İkiye Katlanma Sürelerinin Tayini	45
4.11. Lateral Motilite (Yara İyileşmesi) Deneyi	48

4.12. Fibozis Modeli Oluşturulması ve Kokültür Deneyleri Sonuçları	50
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR VE NERİLER	59
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER	68
EK 1. Orijinallik Raporu	68
EK 2. Dijital Makbuz	69
9. ZGEMİŐ	70



SEMBOLLER VE KISALTMALAR

ACTA2	Düz Kas Alfa Aktin Proteini
ALI	<i>Acute Lung Injury</i>
ALS	<i>Amyotrophic lateral sclerosis</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
cDNA	Komplementer DNA
CFU-F	<i>Colony Forming Units-Fibroblasts</i>
CO₂	<i>Carbon dioxide</i>
COL1A1	Kolajen 1
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxide</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
EMT	Epitel-Mezenkimal Dönüşüm
EndMT	Endotel-Mezenkimal Dönüşüm
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FN	Fibronektin
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GVHD	<i>Graft-versus-Host Disease</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HGF-MKH	HGF ile Lisanslanmış MKH
IPF	<i>Idiopathic Pulmonary Fibrosis</i>
Kİ-MKH	Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i>

MKH	Mezenkimal Kök Hücre
miRNA	mikro RNA
ng	nanogram
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PPARγ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ</i>
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
qPCR	<i>quantitative PCR</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	<i>Reverse Transcription</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TGF-β1	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VIM	Vimentin
WST-1	<i>Water-soluble tetrazolium 1</i>
μL	mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1.1. İş Akış Şeması	2
2.1. Myofibroblast farklılaşması ve fibrozis oluşumundaki etkenler. Görsel Gibb ve ark. (2020)'den uyarlanmıştır.	5
3.1. Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel'de mevcut olan 84 adet miRNA, negatif kontroller ve referans genler.	15
4.1. Literatür taramasından elde edilen fibrozis ilişkili miRNA listesi ile, insan kemik iliği MKH'lerinde ifade olan miRNA'ların kesişim kümesi.	22
4.2. İnsan kemik iliği kaynaklı MKH'lerde ifade olan miRNA'lar ile Human Fibrosis Focus panelindeki miRNA'ların kesişim kümesi.	22
4.3. İnsan kemik iliği MSC'lerinden izole edilmiş olan RNA'dan 20 ng, 40ng ve 80ng'larda sentezlenen cDNA'lerin, 1/40, 1/60 ve 1/80 oranında yapılan dilüsyonlarıyla yapılan gerçek zamanlı PCR reaksiyonunun erime sıcaklıkları grafiği.	26
4.4. İnsan kemik iliği MSC'lerinden izole edilmiş olan RNA'dan 80 ng, 160ng ve 320ng'larda sentezlenen cDNA'lerin, 1/60 ve 1/80 oranında yapılan dilüsyonlarıyla yapılan gerçek zamanlı PCR reaksiyonunun erime sıcaklıkları grafiği.	29
4.5. Geneglobe analiz sayfasında Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel için gerçekleştirilen analizlerde kullanılan referanslar SNORD44, SNORD38B ve SNORD49A olarak seçildi.	30
4.6. Yüksek miktarda total RNA ile yapılan cDNA'lerin, qPCR'da miRNA ifadeleri üzerindeki etkilerinin araştırılması için ön çalışma.	34
4.7. İkinci çalışmada kullanılan referans genler, internal amplifikasyon kontrolü, Ct cut-off değeri ve analiz yöntemi için kullanılacak olan referans genler.	36
4.8. 4000 ng total RNA'dan sentezlenen 1/40 dilüe cDNA ile gerçekleştirilen miRCURY LNA miRNA PCR Panel ile gerçekleştirilen RT-qPCR sonucunda miRNA ifade değişimlerinin dağılım grafiği.	38
4.9. 4000 ng total RNA'dan sentezlenen 1/40 dilüe cDNA ile gerçekleştirilen miRCURY LNA miRNA PCR Panelde ifadeleri değişen miRNA'ların Targetsan, miRDB ve miRTarBase	40

veritabanlarındaki hedeflerinin Venny şemaları. a) hsa-miR-32-5p için 40 ortak hedef, b) hsa-miR-10a-5p için 24 ortak hedef ve c) hsa-miR-377-3p için 27 ortak hedef saptandı.

- 4.10.** ENCORI/STARBASE veritabanından ulaşılan, hsa-miR-32-5p için 1652, hsa-miR-10a-5p için 1272 ve hsa-miR-377-3p için 1687 hedef genin kesişim şeması. 41
- 4.11.** hsa-miR-32-5p, hsa-miR-10a-5p ve hsa-miR-377-3p'nin hedef genleri ile TGF- β (a), WNT (b) ve Hippo (c) yolaklarında rol oynayan genlerin kesişim kümeleri. 43
- 4.12.** WNT Yolağı üzerinde üç miRNA tarafından da hedeflenen genlerin şematik gösterimi. Kırmızı işaret bulunan genler üç miRNA tarafından da hedeflenmektedir. 44
- 4.13.** WST-1 solüsyonu ile inkübasyon inkübasyonun ardından mikropilaka okuyucuda ölçülen absorbans değerlerinin HGF uygulanmış olan MKH'lerde kontrol grubuna göre yüzde değişimi. 45
- 4.14.** İki farklı yoğunlukta ekilen ve HGF uygulamasına maruz kalan/kalmayan MKH'lerin hücre sayıları ve toplandığı pasajdaki popülasyon ikiye katlanma süreleri verilmiştir. 47
- 4.15.** MKH ve HGF-MKH grubunun 0, 8, 16 ve 24. saatte yarayı kapatma durumlarının ışık mikroskobu fotoğrafları. 49
- 4.16.** HGF ile indüklenmiş MKH'lerin normal MKH'lere göre 0,8,16 ve 24. saatteki yara alanlarının karşılaştırmalı grafiği. 50
- 4.17.** TGF- β 1 ile farklı saatler boyunca uyarılmış Kİ-MKH'lerde ACTA2, COL1A1 ve FN genleri için $-\Delta$ Ct değerleri. 50
- 4.18.** 10 ng/mL TGF- β 1 uyarımının 24. saatinde (a) ve 48. saatinde (b) başlatılan ko-kültür deneylerinde ACTA2, COL1A1 ve FN ifade düzeyleri. Bütün ko-kültürler 24 saat boyunca sürdürüldü. 53

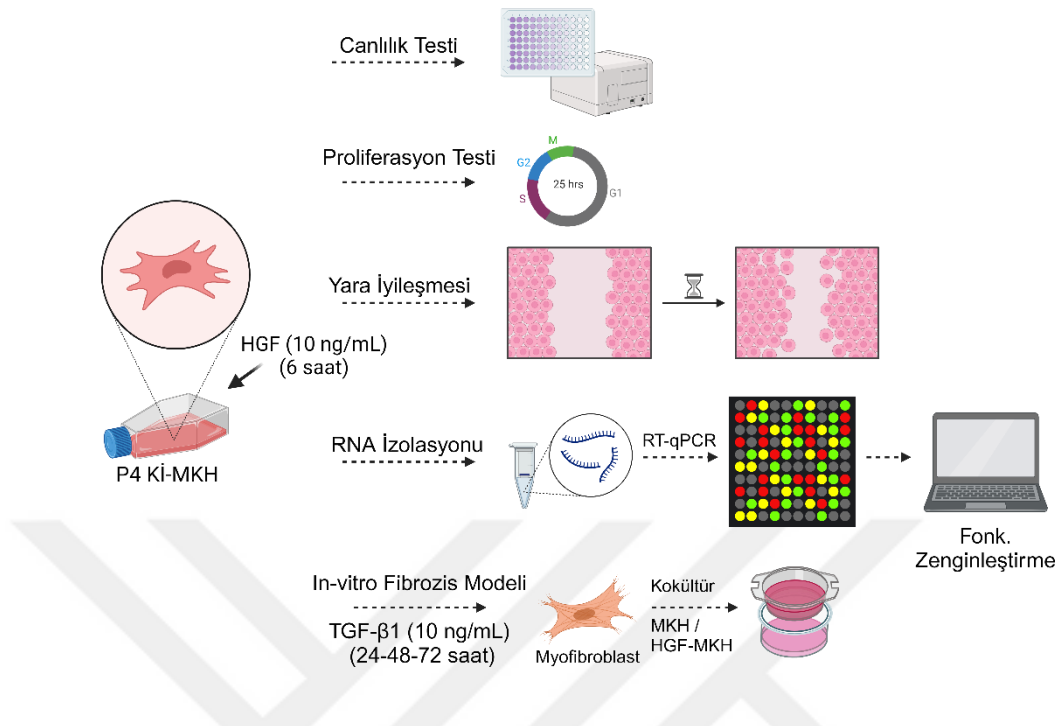
TABLOLAR

Tablo	Sayfa
4.1. miRNA ifadelerinin RT-qPCR’da saptanmasında kullanılacak optimum RNA ve cDNA konsantrasyonlarının belirlenmesi-1	25
4.2. miRNA ifadelerinin RT-qPCR’da saptanmasında kullanılacak optimum RNA ve cDNA konsantrasyonlarının belirlenmesi-2.	28
4.3. Panel analizi için kullanılan referans miRNA’lar ve Ct değerleri.	31
4.4. 800 ng total RNA ile cDNA’in 1/60 dilüsyonunun kullanıldığı Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel ile yapılan RT-qPCR sonucunda ifade kat değişimi 2’nin üzerinde olan miRNA’lar.	33
4.5. 4000 ng total RNA’dan sentezlenen 1/40 dilüe cDNA ile gerçekleştirilen miRCURY LNA miRNA PCR Panel ile gerçekleştirilen miRNA profillemesinde referans olarak seçilen genlerin Ct ortalamaları.	36
4.6. 4000 ng total RNA’dan sentezlenen 1/40 dilüe cDNA ile gerçekleştirilen miRCURY LNA miRNA PCR Panelde ifadenmesi 2’nin üzerinde değişen miRNA’lar.	37
4.7. Çalışma 1’de HGF-MKH’lerde MKH’lere göre kat regülasyonu değişimi görülüp, Çalışma 2’de bu değişimlerin azaldığı ya da kaybolduğu miRNA’ların kat regülasyon değerlerinin listesi.	39
4.8. DAVID fonksiyonel zenginleştirme aracına göre hsa-miR-32-5p, hsa-miR-10a-5p ve hsa-miR-377-3p’nin farklı veritabanlarından elde edilen ortak hedeflerinin rol aldıkları yollar.	40
4.9. Üç miRNA’nın da hedefliyor olduğu 122 genin fonksiyonel zenginleştirme analizi sonucunda çıkan yollar.	42
4.10. TGF-β1 uyarımı yapılan Kİ-MKH’lerde ifadenmesi incelenen fibrozis ile ilişkili genlerin Ct değerleri.	52

1. GİRİŞ

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) yara iyileşmesi ve fibrozis üzerindeki etkilerini anlamak için yapılan çalışmalar, bu hücrelerin potansiyelini ve önemini vurgulamaktadır. Özellikle, MKH'lerin çevresel koşullara uyum sağlama yetenekleri ve doku onarım süreçlerine katkıları, rejeneratif tıp alanında önemli bir araştırma alanı olmuştur. MKH'lerin çeşitli stres koşullarına dayanıklılıklarını veya rejeneratif potansiyellerini artırmaya yönelik olarak sitokin ve büyüme faktörleri ile belirli doz ve sürelerde indüklenmeleri ile ilgili çalışmalar son yıllarda öne çıkan önemli araştırma alanıdır ve bu süreç lisanslama (*priming/preconditioning*) olarak tanımlanmaktadır.

MKH'lerin tedavi potansiyelini artıracak etkin lisanslama yaklaşımları için, hücrelerin moleküler mekanizmalarının derinlemesine anlaşılması gerekmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada MKH'lerin HGF ile uyarılması sonucunda ortaya çıkan miRNA profili ve bu miRNA'ların hedeflediği genlerin belirlenmesi, MKH tedavilerinin etkinliğini artırmaya yönelik stratejilerin geliştirilmesine ışık tutabilir. Diğer yandan, fibrozis gibi kompleks bir patolojide tedaviye yönelik yaklaşımların geliştirilmesi, hastalığın temel mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını gerektirir. Hastalık mekanizmalarından yola çıkarak geliştirilen indüksiyon stratejileri ile MKH'lerin antifibrotik etkileri, bu hücrelerin fibrozis önleme ve tedavisinde potansiyellerinin artırılabilmesine yönelik çalışmalar dikkat çekicidir. Bunlar arasında bulunan HGF ile indüklenme yaklaşımının, MKH'lerin reaktif oksijen türlerine (ROS) ve apoptoza dirençlerini artırdığı, immün düzenleyici aktivitesi ve doku tamir kapasitesi yükselttiği ve migrasyon ve proliferasyon potansiyelleri artırdığı raporlanmıştır.



Şekil 1.1. İş Akış Şeması

Bu tez çalışmasında ticari olarak satın alınmış olan anonimleştirilmiş Kİ-MKH'ler, HGF ile indüklendikten sonra total RNA izolasyonu ve cDNA (komplementer DNA) sentezi yapılmıştır. MKH'lerdeki antifibrotik miRNA'ların ifadenme düzey değişimleri ticari insan fibrozis odaklı panel kullanılarak gerçek zamanlı PCR ile belirlenmiştir. İfadesi değişen (artan/azalan) miRNA'lar için hedef tahmini yapılarak bu hedef genlerin rol aldığı biyolojik süreçler arasında fibrozis ile ilişkili olanlar dikkate alınmıştır. Metabolik aktivite tayini, popülasyon ikiye katlanma oranı ve zamanı, yara iyileşmesi testleri ve TGF- β ile uyarılmış MKH'ler üzerinde yapılan kokültür deneyleri ile HGF lisanslamasının MKH'lerin davranışları üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen veriler, MKH'lerin HGF indüksiyonu ile salgıladığı fibrotik ve anti-fibrotik miRNA'ları değiştirebileceği hipotezine dayanarak hücresel yollar üzerindeki hedef molekülleri üzerinden anti-fibrotik etkilerinin moleküler düzeydeki temelini aydınlatmaktadır. Bu bağlamda, MKH'lerin tedavi stratejilerinde nasıl kullanılabileceğine dair daha fazla anlayış geliştirmek, fibrozis gibi önemli bir

sağlık sorununun yönetiminde yeni ve etkili yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlayabilir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemik iliği, göbek kordonu ve yağ dokusu gibi birçok dokudan elde edilebilen, kültür ortamında fibroblast benzeri şekle sahip, kendini yenileme ve çeşitli hücrelere farklılaşabilme potansiyelleri olan erişkin multipotent kök hücrelerdir (1). MKH'ler; fibroblast benzeri iğsi şekilleri, kültür kabında yüzeye yapışabilme özellikleri, *in-vitro* ortamda fibroblast kolonileri (CFU-F) oluşturabilmeleri, ifade ettikleri yüzey proteinleri ve osteojenik, adipojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaşabilme özellikleri ile karakterize edilmektedir (2-7). Tamamen MKH'lere özgü bir yüzey belirteci olmaması sebebiyle stromal belirteçler olan CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 ve CD271 yüzey belirteçleri için pozitif, hematopoetik ve endotelial belirteçler olan CD11b, CD14, CD31, CD34, CD45 ve HLA-DR belirteçleri için negatif olmaları ile ayırt edilebilmektedir(1, 2).

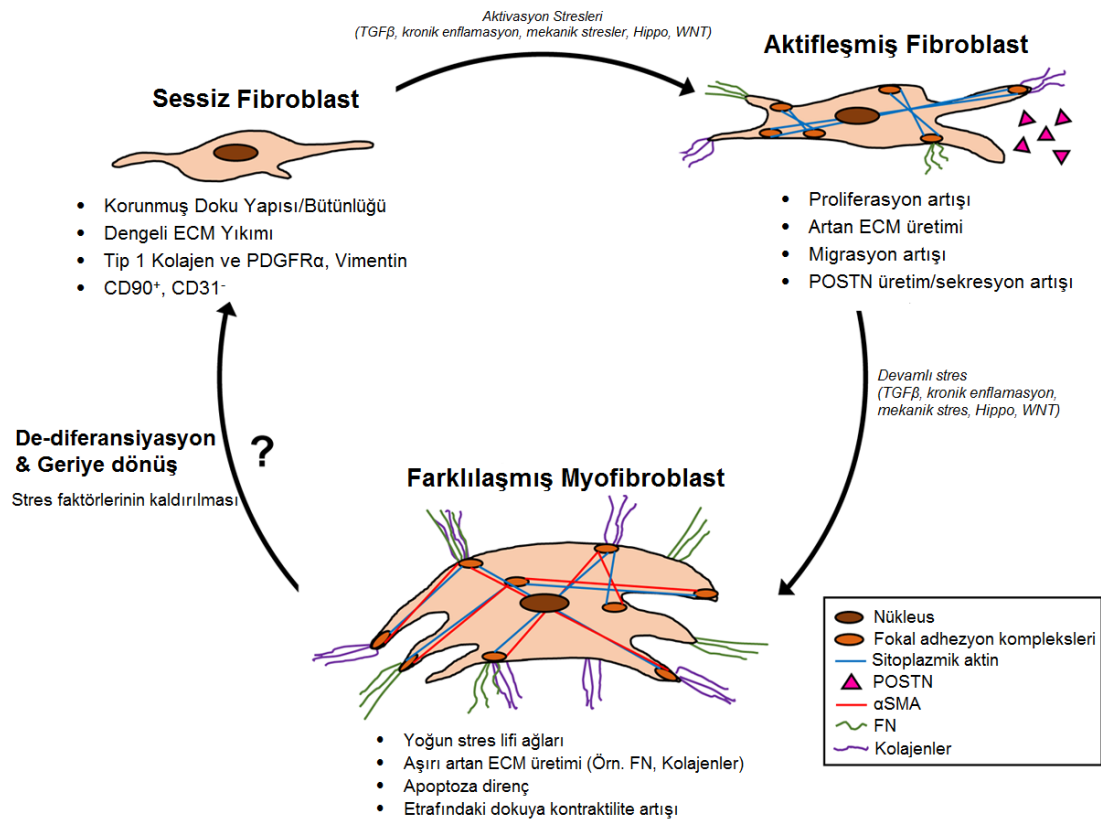
2.2. Fibrozis

Fibrozis, dokularda yara iyileşmesi sürecinde fibroblast proliferasyonunun ve myofibroblast farklılaşmasının artışı ile; aşırı miktarda ekstraselüler matriks üretimi ve birikimi sonucunda sertleşmiş ve işlevini kaybetmiş dokuların (skarlaşmış dokuların) meydana gelmesidir (8, 9). Myofibroblastlar, *ACTA2* geni ile kodlanan düz kas alfa aktin proteini (alfa-SMA) açısından zengin hücrelerdir. Kolajen ve fibronektin gibi ekstraselüler matriks proteinlerinin birikiminden ve depolanmasından sorumludurlar (8, 9). Fibrotik dokularda hücreler arası sıvı elemanlarının miktarlarında artış, alfa-SMA ve VIM (Vimentin) gibi myofibroblast belirteci proteinlerin ve transkriptlerin miktarında artış ve epitelyal hücrelerin daha adheran mezenkimal hücrelere dönüşümü (EMT) de gerçekleşir (10).

Fibrozis çeşitli sitokin, kemokin ve enflamasyon faktörlerinin kombine etkisi ile meydana gelir ve pulmoner fibrozis, karaciğer kanseri, renal fibroze bağlı böbrek yetmezliği, kardiyak fibrozis, siroz gibi çok çeşitli hastalığa, organ yetmezliğine ve önemli oranda ölüme yol açmaktadır (8, 9, 11-13). Bu hastalıklardan bazılarının sebebi

bilinmemekte (idiyopatik) olup birçoğu çeşitli anomalilere, yaşam tarzlarına, komplikasyonlara ya da genetik yatkınlıklara bağlı ortaya çıkan, nispeten daha iyi tanımlanmış etiyojilere sahip hastalıklardır (8).

MKH'lerin fibrozis fizyopatogenezinde önemli rolleri vardır. Çevreye saldıkları birçok faktörden bazıları fibroblastları aktifleştirerek, fibril ağları daha kuvvetli ve daha adheran olan myofibroblastlara farklılaşmalarını tetikler (10). Bu durum iskemiye, fibrozise ve organ yetmezliğine sebep olabilmektedir. MKH'lerin buldukları ortama salgıladıkları büyüme faktörlerinden birisi olarak, fibrozis oluşumunun ana tetikleyicisi olan transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β); birçok *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmada gösterildiği üzere epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMT) ve endotelyal-mezenkimal dönüşümü (EndMT) indükleyerek myofibroblast farklılaşmasını ve sağ kalımını desteklemektedir (10, 14-18).



Şekil 2.1. Myofibroblast farklılaşması ve fibrozis oluşumundaki etkenler. Görsel Gibb ve ark. (2020)'den uyarlanmıştır.

Aktifleşen fibroblastların ve MKH'lerin myofibroblastlara farklılaşması ile oluşan fibrozisin gelişimini yavaşlatmak ya da geriye çevirmek için, myofibroblast

farklaşmasını tetikleyen faktörlerin ortadan kaldırılmasına yönelik stratejiler geliştirilmektedir (10).

2.3. MKH'lerin Tedavi Amaçlı Kullanım Alanları

1970'lerde Friedenstein tarafından kemik iliği MKH'lerin keşfedilmesinin ardından, göbek kordonu, plasenta, amniyotik sıvı, diş kökleri ve yağ dokusu gibi çeşitli dokulardan elde edilen MKH'lerin etkileri prelinik ve klinik çalışmalarla araştırılmaktadır(19). Doku homeostazını ve yenilenmesini korumanın yanı sıra immün modülasyon etkileri, MKH'leri klinik çalışmalara uygun kılmaktadır(20, 21). MKH'ler kolay erişilebilen, laboratuvar ortamında üstün bir genomik stabilite ile kültürü yapılabilen multipotent kök hücreler olup klinikte kullanılabilmesi için belirli etik düzenlemelere tabidir (20). MKH'lerin sekretomlarında içerdikleri büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler ve çeşitli protein veya miRNA'ları taşıyan mikroveziküller/eksozomlar gibi birçok biyoaktif molekül de hücrel tedavi ve doku tamiri gibi klinik çalışmalar için dikkatleri MKH'lere çekmektedir (22).

MKH'ler, *graft-versus-host* hastalığı (GVHD) (23), amyotrofik lateral skleroz (ALS) (24), myokardiyal enfarktüs (25), idiyopatik pulmoner fibrozis (26), COVID19 (27), Akut solunum yetmezliği (ARDS) (28) gibi hastalık süreçlerinde tedavi amaçlı kullanılmıştır (21). Çeşitli dejeneratif ve otoimmün hastalıklar da dahil olmak üzere 2021 yılı itibariyle 300'ü aşkın tamamlanmış klinik çalışma mevcuttur ve bu çalışmaların %35'i KI-MKH'lerin kullanıldığı çalışmalar olup, bunu %23 göbek kordonu kaynaklı, %19 yağ dokusu kaynaklı ve %23 diğer (kas, diş vb.) dokulardan elde edilmiş MKH'lerin kullanıldığı çalışmalar takip etmektedir (21).

Klinik çalışmalarda hastaya verilen MKH'lerin büyük bir kısmının akciğerde tutunması sebebiyle engrafman oranının düşük olması, hücrelerin apoptoza yönelmesi ve hasarlı bölgeye ulaşan hücre sayısının düşük olması, MKH'lerin klinikte kullanımlarını sınırlayan başlıca etkenlerdendir (29). Bu sebeple MKH'lerin reaktif oksijen türlerine (ROS), hipoksiye, apoptoza dayanıklılığının, antifibrotik etkilerinin, immün düzenleyici etkisinin ve doku tamir kapasitesinin artırılması için 'lisanslama' ya da 'ön-koşullama' adı verilen çeşitli *priming/preconditioning* stratejileri üzerine çalışmalar yürütülmektedir. Bu çalışmalara örnek olarak LPS indüklenmiş akciğer hasarında, *in-vitro* ortamda düşük doz TGF-B1 ile muamele edilen MKH'lerin

kollajen 1, 4 ve fibronektin gibi hücrelerarası sıvı proteinlerinin ifadelerinin arttığı ve bu hücreler tedavi olarak verildiğinde sağ kalımlarının hiçbir muamele yapılmayan MKH'lere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (30). Akut bacak iskemisinde kan pulcuğu kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ile uyarılan MKH'lerden elde edilen ekstraselüler veziküller, immün düzenleyici ve anti-inflamatuar faktörlerin salınımını ve periferik kandaki tek çekirdekli hücrelerin endotele tutunmasını artırmakta ve kas dokusunu akut iskemiden korumaktadır (31). MKH'lerin rejeneratif potansiyellerini, immün-modülasyon etkilerini, hayatta kalma kapasitelerini artırmak ve hastalığa/dokuya özel tedavilerin daha verimli olmalarını sağlamak amacıyla çeşitli faktörler ile MKH'lerin ön-koşullanma stratejilerinin önemi gün geçtikçe artmaktadır (29).

2.4. Fibrozis Tedavisinde Ön Koşullanmış MKH'ler ve miRNA'lar

TGF- β ve myofibroblastların sebep olduğu fibrotik süreci yavaşlatmak veya tersine çevirmek için geliştirilen stratejiler genellikle TGF- β yolağının inhibe edilmesi ve myofibroblastların dediferansiyasyonuna dayanmaktadır. Farelerde bleomisin ile indüklenmiş akciğer fibrozisinde ve idiopatik pulmoner fibrozisli (IPF) insan akciğerinden elde edilmiş dokularda; PPAR γ 'nın TGF- β 'ya antagonist çalışarak fibrozisi tersine çevirdiği ve aktif myofibroblastların muhtemel dediferansiyasyonu ile lipofibroblastlara dönüştüğü gösterilmiştir (32). Farelerde oluşturulan cilt fibrozis modelinde ise kıl foliküllerinin bulunduğu bölgelerde BMP sinyalinin güçlendiği ve myofibroblastların dediferansiye olarak adiposit-benzeri hücrelere dönüştüğü gözlemlenmiştir (33).

MKH'ler tarafından buldukları ortama salgılanan faktörlerden biri olan hepatosit büyüme faktörü (HGF) ise epitel ve endotel hücreler için bir büyüme faktörü olmakla birlikte, fibrozis oluşumunu baskılamaktadır ve myofibroblastlarda apoptozu tetiklemektedir (34). Fare modellerinde yapılan çalışmalarda HGF'nin akciğer fibrozisinin (35, 36) ve renal fibrozisin ilerleyişini hafiflettiği ve geri çevirdiği (37) gösterilmiştir. Hastalık modellerinde direkt olarak organizmaya verilen rekombinant HGF ya da taşıyıcı vektörler ile sağlanan HGF aşırı ifadesinin yanı sıra *in-vitro* ortamda belirli doz ve süre ile HGF indüksiyonunun ardından yapılan değerlendirmeler de mevcuttur. HGF ile lisanslanan MKH'lerin reaktif oksijen

türlerine (ROS) ve apoptoza dirençleri artmakta, immün düzenleyici aktivitesi ve doku tamir kapasitesi yükselmekte ve migrasyon ve proliferasyon potansiyelleri artmaktadır (22, 38, 39).

Sıçanlarda oluşturulan *in-vivo* karaciğer fibrozis modelinde tedavi için HGF ekspresyon vektörleri ile transfekte edilmiş MKH'ler verildiğinde hasarlı alanda transfekte edilmiş olan MKH sayılarının, vektörü taşımayan MKH'lere göre daha fazla olduğu ve fibrozisi anlamlı bir şekilde iyileştirdiği gösterilmiştir (40). HGF indüksiyonu, H₂O₂ (hidrojen peroksit) hasarına maruz kalan MKH'lerin sağkalımını artırmış, anti-oksidatif ve anti-inflamatuar etkiler göstererek hasarı azaltmıştır (41).

HGF lisanslamasının MKH'ler üzerinde yol açtığı anti-fibrotik etkilerin miRNA ifadelerindeki değişim bağlamında moleküler düzeyde aydınlatılması, fibrozis mekanizması üzerinde inhibe edici etkiler gösteren ve fibrozis tedavisinde son yıllarda yeni terapötik yaklaşımlar oluşturmak amacıyla kullanılan anti-fibrotik miRNA'ların artmasına da sebep olacağı ön görülmektedir. miRNA'lar 18-25 nükleotidden meydana gelen küçük nükleik asitlerdir (42). miRNA'ların sentezi genellikle; onları kodlayan genlerden oluşan transkriptlerin mikro-işleyici bir kompleks yardımıyla pre-miRNA'lara dönüştürülmesi ve çekirdek dışına taşınarak RNase III endonükleaz enzimi olan Dicer ile kesilerek olgun miRNA'ya dönüştüğü kanonik yolak üzerinden gerçekleşmektedir (43, 44). Sitoplazmada hedefledikleri gen transkriptlerine bağlanarak onları yıkarlar ve hedef genin ifadenmesini baskırlar (42, 45). Bu baskılama "seed region" olarak adlandırılan, olgun miRNA'nın 5' ucundaki 2-8. nükleotidlerinin, hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesine Watson-Crick baz eşlenmesi ile bağlanması durumunda gerçekleşir (42). Çoğunlukla hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlanan miRNA'ların 5'-UTR, kodlayan sekans ve gen promotörleri gibi çeşitli bölgelere bağlandığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (46). miRNA'ların bazı özel koşullar altında gen ifadenmesini artırdığı da gösterilmiştir (47). miRNA'lar translasyon ve transkripsiyon dahil olmak üzere birçok hücresel süreçte rol almaktadır (48). Çeşitli biyolojik süreçlerde kritik öneme sahip olan miRNA'ların ifadenmelerindeki aberan değişimler birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir (49-51).

MKH'lerin salgıladığı birçok sitokin, kemokin ve büyüme faktörü ile beraber miRNA'lar da ekstraselüler (hücrelerarası) ortamda bulunmaktadır (52). MKH'lerin

salgıladığı ekstraselüler veziküller içerisinde bulunan bazı miRNA'ların fibrotik süreçlerde etkili olduğu bilinmektedir (53). Örneğin miR-144-3p, miR-451, miR-200b ve miR-328 kardiyak fibroziste rol alırken miR-34a, miR-17-5p, miR-122, miR-146a ve miR-350 karaciğer fibrozisi süreçlerinde rol almaktadırlar (53). Juema küçük domuzlarında oluşturulan myokardiyal enfarktüs modeli ile yürütölen bir çalışmada miR-144-3p'nin PTEN'in transkripsiyonu ve translasyonunu baskılayarak α -SMA, Col1A1 ve Col3A1 ifadelerinin artışına sebep olduğu, miR-144-3p inhibitörü ile bu etkinin tersine döndüğu gösterilmiştir (54).

Antifibrotik miRNA'ların varlığı fibrozisin oluşmasına ve ilerlemesine engel olmaktadır ve fibrotik dokularda antifibrotik miRNA'ların ifadesi büyük oranda düşmektedir. Fibrotik miRNA'ların ise inhibitörlerinin kullanıldığı tedavi yaklaşımları mevcuttur (55).

Bu tez çalışmasında HGF uyarımının MKH'ler üzerindeki antifibrotik etkisini miRNA gen değişimi düzeyinde tespit etmek ve HGF uyarımıyla Kİ-MKH'lerde ifadesi değişen fibrozis-ilişkili miRNA'ların *in-silico* hedefleri ile, HGF ile MKH'lerin antifibrotik etkilerini güçlendirme mekanizmalarını araştırmak amaçlanmıştır. Bulgular ve yapılan analizlerin sonuçları, gelecek çalışmalar için bir temel teşkil etmektedir ve fibrozis tedavisi için yeni yaklaşımlar ortaya koymak üzere ilerideki çalışmalara ışık tutmaktadır.

Bu tez çalışmasında ticari olarak satın alınmış olan anonimleştirilmiş Kİ-MKH'ler, HGF ile indüklendikten sonra - total RNA izolasyonu ve cDNA (komplementer DNA) sentezi sonrası MKH'lerdeki antifibrotik miRNA'ların ifadenme düzey değişimleri ticari insan fibrozis odaklı panel ile gerçek zamanlı PCR ile belirlenmiştir. İfadesi değişen (artan/azalan) miRNA'lar için hedef tahminlemesi yapılarak bu hedef genlerin rol aldığı biyolojik süreçlerden fibrozis ile ilişkili olanlar dikkate alınmıştır. Metabolik aktivite tayini, popölasyon ikiye katlanma düzeyleri ve yara iyileşmesi deneyleri gibi yöntemler ile HGF lisanslamasının MKH'lerin davranışları üzerindeki etki değişimleri incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Antifibrotik miRNA'ların Belirlenmesi

Öncelikle, antifibrotik miRNA'lar için ‘*fibrosis*’, ‘*miRNA*’ ve ‘*antifibrotic*’ anahtar kelimeleri ile literatür taraması yapılarak insan dokularında ifade olan fibrotik ve antifibrotik miRNA ların listesi oluşturuldu. Literatür taraması sonucunda oluşturulmuş olan **fibrozis ile ilişkili miRNA** listesi, insanda karaciğer fibrozis, akciğer fibrozis, kardiyak fibrozis ve renal fibroziste rol oynayan ve MKH'ler dahil çeşitli hücrelerden sentezlenen **233 adet** miRNA belirlendi.

Fibrozis ile ilişkili miRNA listesi içerisinde insan kemik iliği kaynaklı MKH'lerde ifade olan miRNA'ları saptayabilmek için, daha önce grubumuzca yayınlanan (56) ve GEO veritabanına yüklenen (GEO Numarası: GSE 183227) Affymetrix GeneChip 2.0 mikrodizin ile MKH'lerde ifade olan miRNA verilerimiz ile bu literatür taramasından elde ettiğimiz fibrozis ile ilişkili miRNA listesinin kesişim kümesi, Venny diyagramı (57) kullanılarak oluşturuldu (Şekil 4.1).

69 adet fibrozis ile ilişkili miRNA'nın, insan Kİ-MKH'lerinde ifadesi olduğu saptandı. Bu 69 miRNA'dan 47'si antifibrotik, 20'si fibrotik olmakla beraber, 2'si hakkında ise bilgi yoktu. Bu kesişim kümesi sonucu ortaya çıkan, insan Kİ-MKH'lerinden ifadelendiği bilinen 69 adet miRNA, elimizde mevcut olan 384 kuyucuklu panellerin çalışılmasına olanak sağlayan Light Cycler® 480-II (Roche) cihaza uyumlu ticari *Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel*'in miRNA listesi ile Venny (2) diyagramı kullanılarak karşılaştırıldı (Şekil 4.2) ve 69 miRNA'nın tamamının *Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel*'inde bulunduğu belirlendi. Bu sebeple, *Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Katolog Panel*'inin (YAHS-217Z, Qiagen) (Şekil 3.1) çalışmamızda kullanılmasına karar verildi.

3.2. MKH Kültürü ve HGF ile Lisanslanması

Ekibimizin daha önceki projelerinin desteği ile satın alınmış sıvı azot tankındaki dondurulmuş olan ticari insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök

hücreler (Pasaj 3 Kİ-MKH) (Kat No: PT-2501, Lonza) kryostoktan çıkarılarak Pasaj 3 Kİ-MKH'ler buz üzerine alınarak laboratuvara taşındı ve hemen ardından 37°C'de hızlı bir şekilde son buz parçası kalana kadar çözündürülerek dondurma ortamındaki DMSO %1'in altına düşecek şekilde kültür besiyeri (MSCGM™ Mesenchymal Stem Cell Growth Medium BulletKit™, Kat No: PT-3001, Lonza) eklenerek dondurma ortamındaki DMSO dilüe edildi. Hücrelerin CD105, CD166, CD29 ve CD44 yüzey proteinleri açısından pozitif, CD14, CD34 ve CD45 yüzey proteinleri açısından ise negatif oldukları, üretici firma tarafından akım sitometri ile gösterilmiştir. Daha sonra 5000 hücre /cm² olacak şekilde iki ayrı hücre kültür kaplarına ekildi ve 37°C, 5% CO₂ içeren humidifiye inkübatörlerde inkübe edildi. İlk besiyeri değişim günü geldiğinde hücrelerin içinde bulunduğu kültür ortamı, DMF10 bazal kültür ortamı [%10 oranında fetal buzağı serumu (Kat No:105000064, Gibco), %1 penisilin/streptomisin (Kat No: 15140122, Gibco) ve %1 L-glutamin (Kat No: K0100-670, Cegrogen) içeren DMEM-LG] ile değiştirildi ve üç-dört günde bir besiyeri değişimleri yapılarak hücreler çoğaltıldı.

İki farklı zamanda çözülen hücre kültürleri ile deneyler gerçekleştirildi ve kryostoktan açılan hücreler kültürün 3 veya 4. gününde mikoplazma testi (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit-Kat. No: LT07-318, Lonza) yapıldıktan sonra deneyler için kültürlerle devam edildi.

Mikoplazma testi için hücre kültüründen 2 mL alınarak 200 x g'de 5 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi. Hücreler dibe çöktüğünde süpernatanın 75 µl'si steril polipropilen tüp içerisine alındı. Daha sonra 75 µl MycoAlert Reagent eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve Lonza Lucetta (TM) Luminometre (Kat. No: 11640461, Lonza) cihazı ile okutma yapıldı. Bu okutma sonucunda çıkan "A" değeri not edildi. Ardından 75 µl MycoAlert Substrat eklendikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında beklenecek bir okutma daha yapıldı. Bu okutma sonucu çıkan "B" değeri de not edildi. Örnek içerisinde mikoplazma kontaminasyonu varsa ikinci okutma (B) değeri, ortamda yükselen ATP miktarı ile yapılan ışımadan dolayı ilk okutma (A) değerine göre yükselmektedir. B/A değeri < 0.9 ise "mikoplazma negatif", 0.9 < B/A < 1.2 ise "sınırdaki", B/A > 1.2 ise örnek "mikoplazma kontamine" olarak kabul edildi (58).

Hücreler %70-80 oranında kültür tabağını kapladığında kültür kaplarından biri HGF lisanslama için, diğeri ise kontrol olarak kullanıldı. HGF ile lisanslama için; hücrelerin ortamı, serumsuz ortam (%2 FBS içeren büyüme ortamı) ile değiştirildi ve gece boyu inkübe edildi. Daha sonra 10 ng/ml HGF (Kat No: 11343413, Immunotools) eklenerek 6 saat inkübe edildi (59). Hücreler santrifüj edilip kültür ortamı uzaklaştırıldı ve yıkamaların ardından total RNA izolasyonu yapmak üzere Qiazol eklenerek -80 °C’de muhafaza edildi.

3.3. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve RT-qPCR

Kültür kabına ekilen hücreler tripsin ile kaldırıldı ve DPBS (Kat no: 14190144, Gibco) yıkamasının ardından 700 µL Qiazol (Qiagen, Almanya) içerisinde çözülerek 1,5 ml’lik ependorf tüpe alındı ve -80 °C’de saklandı. RNA izolasyonu için miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak, kitin protokolüne göre total RNA izolasyonu yapıldı. Qiazol içerisindeki hücreler öncelikle fenol/guanidin tiyosiyanat bazlı solüsyon ile oda sıcaklığında 5 dakika boyunca liziz edildi. Ardından kloroform eklenerek şiddetli bir biçimde 15 saniye çalkalandı ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildikten sonra 15 dakika boyunca 4 °C’de, 12000 x g’de santrifüj edildi; üst fazda RNA, daha aşağıdaki fazlarda ise DNA ve proteinlerin mevcut olduğu üç faz ayrımı oluşması sağlandı. RNA’yı içeren üst faz, ayrı bir tüpe alınarak üzerine 1,5 kat kadar %100 etanol eklendi. Tek seferde maksimum 700 µl örnek, kolon bulunan tüpe alınarak 9000 x g’de 15 saniye boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi ve örneğin tamamı kolondan geçirilene kadar bu işlem tekrarlandı. Olası genomik DNA (gDNA) kontaminasyonunu temizlemek için örnekler, RNase-free DNase Digestion (Qiagen, Almanya) ile 30 dakika muamele edildi. Santrifüjden sonra kolon içerisindeki örneğe 700 µl RWT tampon çözeltisi (kit ile birlikte gelen) eklenerek 9000 x g’de 15 saniye boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi. Kolon içerisindeki örneğe 500 µl RPE tampon çözeltisi (kit ile birlikte gelen) eklenerek bir kez daha aynı santrifüj işlemi uygulandı. Bu işlemlerin her birinin ardından, santrifüjden çıkarılan kolondan aşağı süzölmüş olan kısım atıldı. RPE ile yıkamanın ardından, kolon yeni bir tüp içerisine aktarıldı ve oda sıcaklığında 1 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj edildi. Ardından kolon, RNA’nın toplanacağı steril yeni bir tüpe alındı ve 32 µl RNase

içermeyen dH₂O eklendi ve 9000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüj ile oda sıcaklığında elüsyon yapıldı ve örneklerin RNA konsantrasyonları ölçüldü.

Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, ABD) spektrofotometrede ölçüm yapılarak ve kalitesi A260/280 ve A260/230 değerleri belirlenerek saptandı. A260'ta ölçülen 1 absorbans değeri; 40 µg/ml RNA'ya tekabül ettiği bilgisine dayanarak (60), ölçülen absorbans değerleri üzerinden konsantrasyonları hesaplandı. RNA saflığı A260/280 oranı 2'ye yakın olmasına göre belirlendi. 2'nin altındaki değerler A280'de absorbans veren proteinlerin ve DNA'nın kontaminasyonu olduğuna işaret eder. A260/230 değeri ise RNA'nın ekstraksiyonunda kullanılan bileşenler (230 nm dalga boyunda pik veren guanidin izotiyosiyanat gibi) sebebi ile değişebilmektedir. RNA ekstraksiyon artığı kirlilik durumu RNA'nın A260/A230 değeri ile belirlendi (60).

3.3.1 Total RNA Miktarı ve cDNA Dilüsyonları İçin Optimizasyon Çalışmaları

miRNA'dan cDNA sentezi için Kilitli Nükleik Asit (LNA: Locked Nucleic Acid) içeren tersinir transkripsiyon (RT) kiti (Kat. No: 339340, Qiagen) kullanıldı. miRCURY LNA RT Kit'i; hem miRNA'nın poliadenilasyonunu sağlayıp cDNA'ye çevrilmesi, hem de kilitli nükleik asit içeren primerler sayesinde bu cDNA'nın özgün bir şekilde amplifiye edilmesini sağlamaktadır.

Ön deneylerde düşük miRNA'ları da saptanabilecek optimum cDNA'yı elde etmek için totalde 20 ng, 40 ng, 80 ng, 160 ng ve 320 ng RNA'dan cDNA sentezlendi. 9 µl nükleaz içermeyen dH₂O içerisine 4 µl 5x miRCURY SYBR Green RT Reaction Buffer eklenip, sonra sırasıyla 2 µl 10x miRCURY RT Enzyme Mix, 1 µl UniSp6 RNA spike-in ve son olarak 4 µl total RNA (5ng/µl, 10 ng/µl, 20ng/µl, 40ng/µl, 80 ng/µl konsantrasyonlarda hazırlanan) eklenerek total 20 µl'de RT-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşulları kullanarak Eppendorf AG 22331 Hamburg PCR cihazı ile gerçekleştirildi:

- Tersinir transkripsiyon aşaması → 60 dakika, 42 °C
- Reaksiyonun inaktivasyon aşaması → 5 dakika, 95 °C
- Saklama/Reaksiyon sonrası bekleme aşaması → Süresiz, 4°C idi.

RT-qPCR panelinde kullanılacak cDNA dilüsyon optimizasyonu için; 1/40, 1/60 ve 1/80 cDNA dilüsyonları ve MKH'lerde yüksek ifadesi olduğu bilinen hsa-miR-137-3p (Kat No: YP00206062, Qiagen) ve düşük ifadesi olduğu bilinen hsa-miR-200a-3p (Kat No: YP00204707, Qiagen) primerleri kullanılarak optimum cDNA konsantrasyonu gerçek zamanlı PCR cihazından (Roche LightCycler 480 II) alınan Ct değerlerine göre saptandı. Referans gen olarak hsa-miR-103a-3p (Kat. No: YP00204063, Qiagen) ve deney kontrolü (spike-in) olarak ise Unisp6 (Kat. No: YP00203954, Qiagen) kullanıldı.

Gerçek zamanlı PCR için plakadaki kuyu başına 10 µl'lik reaksiyonlar hazırlandı; sırasıyla kuyu başına 1 µl nükleaz içermeyen dH₂O, 5 µl 2x miRCURY LNA SYBR Green Master Mix ve 1 µl primer içerecek şekilde toplam kuyu sayısı için reaksiyon karışımı hazırlanıp kuyulara dağıtıldı. Daha sonra her kuyuya 3'er µl 1/40, 1/60 ve 1/80 cDNA dilüsyonları eklendi. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu, Roche LightCycler 480 II cihazında aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi.

- Denatürasyon aşaması → 95 °C 2 dakika,
- Amplifikasyon aşaması → 95 °C (denatürasyon) 10 saniye; 56 °C (annealing) 1 dakika 45 döngü
- Melting Curve analizi → 60- 95 °C arasında yapıldı.

Optimizasyon çalışmalarının sonuçları $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu (61) ile analiz edildi.

3.4. HGF ile Lisanslanmış MKH'lerde Farklı İfade Olan Fibrozis ile İlişkili miRNA İfadelenme Düzeylerinin RT-qPCR ile Belirlenmesi

3.4.1 Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel - Çalışma 1

84 adet miRNA içeren panelde (Şekil 3.1) mevcut olan 4'er kuyuya, MKH ve HGF-MKH gruplarından elde edilen cDNA'lerin ikişer kuyu olarak çalışıldığı Human Fibrosis Focus panellerinin ilki 800 ng total RNA'dan sentezlenen cDNA'in 1/60 dilüsyonu ile gerçekleştirildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	01	01	02	02	03	03	04	04	05	05	06	06	07	07	08	08	09	09	10	10	11	11	12	12
B	01	01	02	02	03	03	04	04	05	05	06	06	07	07	08	08	09	09	10	10	11	11	12	12
C	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	24	24
D	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	24	24
E	25	25	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35	36	36
F	25	25	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35	36	36
G	37	37	38	38	39	39	40	40	41	41	42	42	43	43	44	44	45	45	46	46	47	47	48	48
H	37	37	38	38	39	39	40	40	41	41	42	42	43	43	44	44	45	45	46	46	47	47	48	48
I	49	49	50	50	51	51	52	52	53	53	54	54	55	55	56	56	57	57	58	58	59	59	60	60
J	49	49	50	50	51	51	52	52	53	53	54	54	55	55	56	56	57	57	58	58	59	59	60	60
K	61	61	62	62	63	63	64	64	65	65	66	66	67	67	68	68	69	69	70	70	71	71	72	72
L	61	61	62	62	63	63	64	64	65	65	66	66	67	67	68	68	69	69	70	70	71	71	72	72
M	73	73	74	74	75	75	76	76	77	77	78	78	79	79	80	80	81	81	82	82	83	83	84	84
N	73	73	74	74	75	75	76	76	77	77	78	78	79	79	80	80	81	81	82	82	83	83	84	84
O	Ca	Ca	Ca	Ca	SN1	SN1	SN2	SN2	SN3	SN3	SN4	SN4	SN5	SN5	SN6	SN6	hRTC	hRTC	hRTC	hRTC	PPC	PPC	PPC	PPC
P	Ca	Ca	Ca	Ca	SN1	SN1	SN2	SN2	SN3	SN3	SN4	SN4	SN5	SN5	SN6	SN6	hRTC	hRTC	hRTC	hRTC	PPC	PPC	PPC	PPC

Şekil 3.1. Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel’de mevcut olan 84 adet miRNA, negatif kontroller ve referans genler.

Sırasıyla: hsa-let-7d-5p, hsa-miR-1-3p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-107, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-211-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-216a-5p, hsa-miR-217-5p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-27b-3p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-325, hsa-miR-32-5p, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-377-3p, hsa-miR-378a-3p, hsa-miR-382-5p, hsa-miR-449a, hsa-miR-449b-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-5011-5p, hsa-miR-503-5p, hsa-miR-5692a, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-661, hsa-miR-663a, hsa-miR-744-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-874-3p, hsa-miR-92a-3p, cel-miR-39-3p, cel-miR-39-3p,

SNORD44 (hsa), SNORD38B (hsa), SNORD49A (hsa), U6 snRNA (v2), UniSp2, UniSp4, UniSp5, UniSp6, UniSp3 IPC, UniSp3 IPC.

Her grup için toplamda 15 µl cDNA kullanılmış olup, dilüsyon işlemi aşağıdaki şekilde aşamalı olarak yapıldı;

- 15 µl cDNA + 60 µl nükleaz içermeyen dH₂O = 75 µl, 1/5 dilüsyonlu cDNA
- 75 µL 1/5 cDNA + 225 µl nükleaz içermeyen dH₂O = 300 µl, 1/20 dilüsyonlu cDNA
- 300 µl'lik 1/20 cDNA + 600 µl nükleaz içermeyen dH₂O = 900 µl, 1/60 cDNA

Panel için kuyu başına 5 µl SYBR Green ve 1 µl nükleaz içermeyen dH₂O ile 384 kuyu için reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışım her kuyuya 6 µl olacak şekilde dağıtıldıktan sonra her kuyuya 4 µl 1/60 dilüsyonlu cDNA eklendi. Gerçek zamanlı kantitatif PCR reaksiyonunun koşulları, ön deneylerde uygulanan koşullarda gerçekleştirildi. Her miRNA için panelde 4 kuyu bulunduğundan dolayı, 4 kuyunun ikisinde MKH, diğer ikisinde HGF-MKH ait cDNA'ler kalıp olarak kullanıldı. Panel reaksiyon koşulları aşağıdaki gibidir.

- Denatürasyon aşaması → 95 °C 2 dakika,
- Amplifikasyon aşaması → 95 °C (denatürasyon) 10 saniye; 56 °C (annealing) 1 dakika 45 döngü
- Melting Curve analizi → 60- 95 °C arasında yapıldı.

Deney sonuçları "<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>" sayfasındaki analiz aracına YAHS-217Z Human Fibrosis Focus katalog numarasını seçerek RT-qPCR çıktıları ham veri halinde bir excel tablosu olarak yüklendi. Ardından "Sample Manager" sekmesinde kullanılacak olan referans genler (SNORD44, SNORD38B, SNORD49A), internal amplifikasyon kontrolü (UniSp6), Ct cut-off değeri (40) ve analiz yöntemi için kullanılacak olan test (T-Test) seçildi.

RT-qPCR sonucunda, GeneGlobe sayfasından analiz yapılabilmesi için üçüncü değer gerektiğinden, iki teknik tekrarın ortalaması üçüncü değer olarak girildi. Analizler sonucunda, 2 ve üzeri olan kat değişimleri değerlendirmeye alındı. Referans genler belirlenirken Ct değerleri MKH grubu ile HGF-MKH grubu arasında stabil olan genler seçildi.

3.4.2 Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel - Çalışma 2

Panelde çalışılmak üzere 4000 ng total RNA'dan cDNA sentezlendi. Bütün kuyulara yeterli olması amacıyla iki kez reverz transkriptaz PCR (RT-PCR) reaksiyonu ile toplamda 40 µl cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Her grup için sentezlenen cDNA'lerin 25 µl'si kullanılarak, aşağıda belirtildiği şekilde aşamalı dilüsyon işlemi ile 1/40 dilüe cDNA elde edildi ;

- 25 µlDNA + 100 µl nükleaz içermeyen dH₂O = 125 µl, 1/5 dilüsyonlu cDNA
- 125 µL 1/5 cDNA + 375 µl nükleaz içermeyen dH₂O = 500 µl, 1/20 dilüsyonlu cDNA
- 500 µl'lik 1/20 cDNA + 500 µl nükleaz içermeyen dH₂O = 1000 µl, 1/40 cDNA

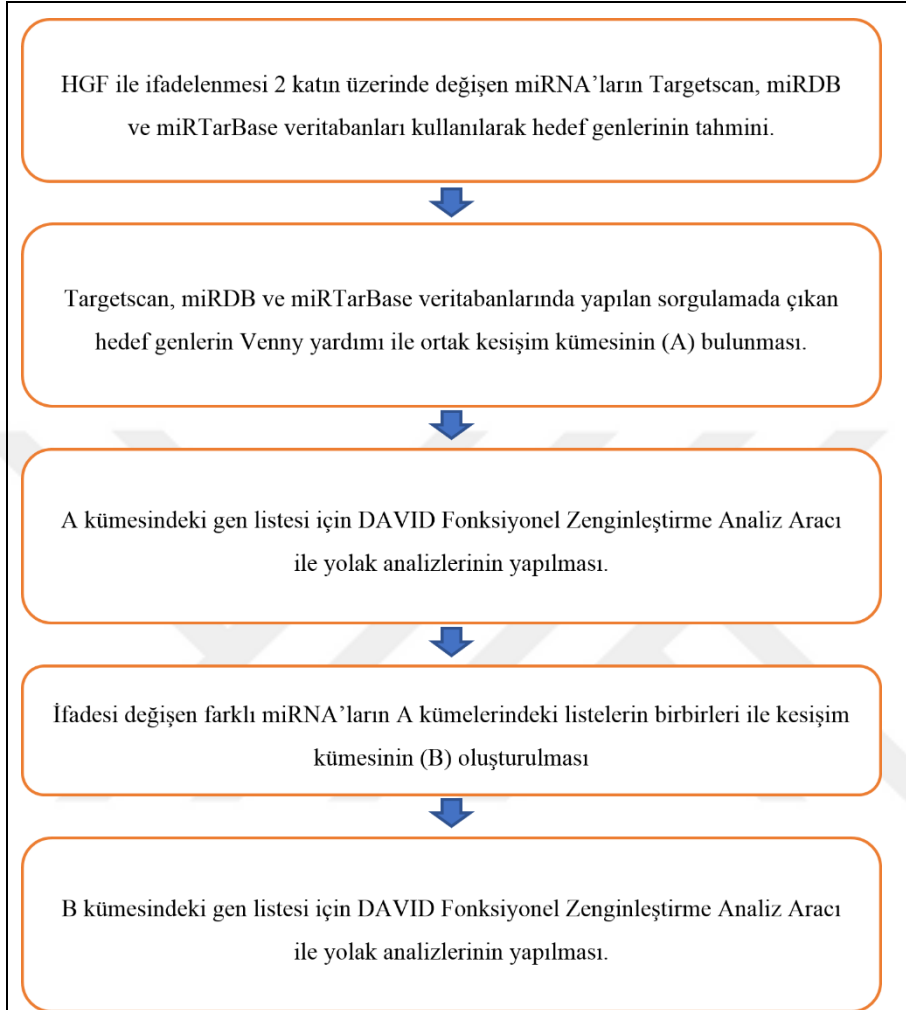
Gerçek zamanlı semikantitatif PCR (RT-qPCR) reaksiyonu daha önce anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

84 adet miRNA için panelde mevcut olan 4'er kuyuya, MKH ve HGF-MKH gruplarından elde edilen cDNA'lerin ikişer kuyu olarak çalışıldığı deney sonucunda, GeneGlobe sayfasından analiz yapılabilmesi için üçüncü bir değer gerektiğinden, iki teknik tekrarın ortalaması üçüncü değer olarak girildi.

“<https://geneglobe.qiagen.com/tr/analyze>” sayfasındaki analiz aracına “YAHS-217Z Human Fibrosis Focus” katalog numarasını seçerek RT-qPCR'ın ham veri çıktılarını excel tablosu olarak yükledi. Ardından “Sample Manager” sekmesinde; kullanılacak olan referans genler, internal amplifikasyon kontrolü, Ct cut-off değeri ve analiz yöntemi için kullanılacak olan T-Test seçildi. Referans gen olarak MKH grubu ile HGF-MKH grubu arasında ifadesi stabil olan miRNA genleri seçildi.

Yapılan analizler sonucunda ifadesi 2 kat ve üzerinde değişen (artan/azalan) miRNA'lar tespit edildi ve daha sonraki fonksiyonel analizler bu miRNA'ların hedefledikleri genler üzerinden yapıldı. 800 ng total RNA'dan sentezlenen cDNA'nın 1/60 oranında kullanıldığı Çalışma- 1 (Tablo 4.4) ile 4000 ng total RNA'dan sentezlenen cDNA'nın 1/40 oranında kullanıldığı Çalışma- 2 sonuçları (Tablo 4.6) gösterildi.

3.5. HGF Lisanslaması ile İfadesi Değişen miRNA'ların Hedef Genlerinin Belirlenmesi ve Biyolojik/Fonksiyonel Zenginleştirme Analizleri



HGF ile lisanslanan MKH'lerde ifadesi 2 katın üzerinde değişen miRNA'ların hedef genleri 3 farklı veri tabanı ile tahmin edilip bu 3 veri tabanındaki (62-64) hedef gen listelerinin kesişim kümeleri (A) üzerinden yolak analizleri yapıldı. Bununla beraber, birden fazla miRNA'nın aynı yolak üzerinde etkili olup olmadığını tespit etmek amacıyla, miRNA'lar arasında A kümelerinin kesişimleri oluşturularak ortaya çıkan B kümeleri ile yolak analizleri yapıldı. Bu yöntem, ifadesi değişen her miRNA'nın rol oynadığı yolları tespit etmenin yanı sıra, bu miRNA'ların kolektif olarak bir yolak üzerinde rolü olup olmadığını saptamak amacıyla tercih edildi.

3.6. WST-1 Metabolik Aktivite Testi

WST-1 Cell Proliferation Assay Kit (Kat No: 10008883, Cayman Chemicals) içeriğindeki WST-1 isimli tetrazolyum tuzunun hücresel mitokondrial dehidrogenazlar aracılığıyla formazana dönüşmesi ile hücrelerin metabolik aktivitesi ile canlılığını ölçmeye yarayan bu test, içerisinde çözündüğü sıvıdaki renk değişimine bağlı absorbans değerleri ile hücrelerde mitokondriyal aktivitelerinin değerlendirilmesi esasına dayanır (65).

P4 Lonza insan KI-MKH'ler 96-kuyucuklu plakaya kuyu başına 5000 hücre yoğunlukta ekildi ve ertesi güne kadar (24 saat) hücrelerin tutunması beklendi. Ardından hücreler gece boyu aç bırakıldı ve HGF-MKH grubu için 10 ng/mL HGF uygulaması başlatıldı. 6 saatlik HGF uyarımı tamamlandığında kit içeriğinde bulunan Electron Mediator Solution ve WST-1 Developer Reagent 1:1 oranında karıştırılarak WST-1 solüsyonu hazırlandı. Kuyu başına 100 µL taze DMF10 ve 10 µL WST-1 karışımı eklendi.

37 °C'de 2 saatlik inkübasyonun ardından örneklerin absorbans değerleri *microplate* okuyucuda (Tecan, İsviçre) 450 nm dalga boyunda okutuldu. Deneyde WST-1 karışımı eklenmemiş kültürler ve içerisinde hücre bulunmayan WST-1 karışımı eklenmiş besiyeri (blank) grupları için de ölçümler sonucu analizler gerçekleştirildi.

Her grup için 5 tekrarlı, blank için 3 tekrarlı kuyuların okutulması sonucunda çıkan absorbans değerlerinin blank gruplarından farkları alındı. HGF-MKH grubu için

bu değerin HGF uygulanmayan MKH grubuna oranı Graphpad Prism (versiyon 8.0.1) kullanılarak hesaplandı ve grafik üzerinde gösterildi (Şekil 4.13).

3.7. Popülasyon İkiye Katlanma Tayini

HGF uyarımının popülasyon ikiye katlanmaya etkisi ve HGF ile ön-koşullanmış MKH'lerin standart besiyerinde çoğaltılan MKH'lere göre popülasyon ikiye katlanma değişimini belirlemek için standart kültür ortamında MKH'ler ve HGF ile indüklenen MKH'ler karşılaştırılmalı olarak değerlendirildi. Deneyler için 6-kuyulu kültür kaplarında 1250 hücre/kuyu ve 2500 hücre/kuyu yoğunlukta hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin bulunduğu kuyular yaklaşık %70 yoğunluğa ulaştığında serumsuz besiyerine (%2 FBS içeren DMEM) geçirildi ve gece boyu beklendikten sonra HGF-MKH grubu için 10 ng/mL HGF eklenerek 6 saat inkübasyona bırakıldı. 6 saatlik uyarımın ardından besiyeri DMF10 ile değiştirildikten sonra KI-MKH'lerin ikiye katlanmasına zaman vermek üzere 18 saat beklendi. Kontrol grubu ise standart kültür ortamı DMF10 içinde aynı süre boyunca kültüre edildi.

Hücrelerin sayımında her grup için üçer tekrarlı hücre ekilen kuyulardan sayım yapıldı. HGF-MKH ile MKH arasındaki popülasyon ikiye katlanma süresi ise aşığıdaki eşıtlile göre hesaplandı (66).

$$\text{Popülasyon katlanma zamanı (Doubling Time)} = [T \times (\ln 2)] / [\ln (X_e / X_b)]$$

T= Herhangi bir birimde zaman

X_e= Ekilen hücre sayısı

X_b= Toplanan hücre sayısı

3.8. Lateral Motilite Testi

İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin HGF indüksiyonu ile fibrotik iyileşme yerine sağlıklı doku iyileşmesine sebep olup olmadığı sorusuna cevap aramak amacıyla kültür tabağında pipet ucu ile oluşturulan yaranın HGF uygulaması ile normale göre nasıl iyileştiniğini saptamak için "scratch assay" olarak bilinen lateral motilite testi uygulandı.

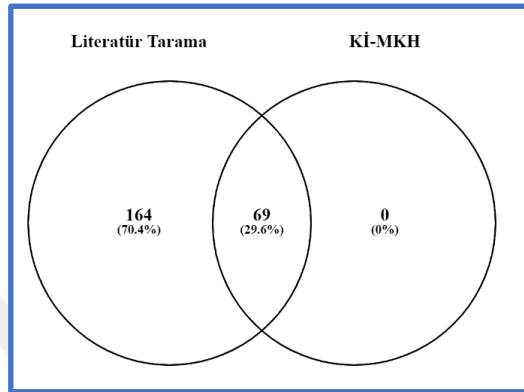
İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler 6-kuyucuklu kültür kaplarına 30.000 hücre/kuyu yoğunlukta olacak şekilde ekildi. 3 günde bir besiyeri değişimi yapılarak idame edilen kültürde hücreler kültür tabağını doldurduğunda gece boyu aç bırakılmanın ardından HGF-MKH grubuna 10 ng/mL HGF uygulandı. 6 saatlik HGF uyarımı bittiği an sıfırinci saat olarak kabul edilerek iki grubun da besiyerleri DMF10 ile değiştirdi ve 0, 8, 16 ve 24. saatlerde fotoğraflar çekildi (OLYMPUS CKX41, Japonya). Çekilen fotoğraflarda pipet ucu ile oluşturulan yaraların alanları ImageJ (versiyon 1.54d) programında, yara iyileşmesi deneyleri için oluşturulan bir eklenti yardımıyla (67) hesaplandı ve saatlere göre yara alanının MKH ile HGF-MKH arasındaki farkını gösteren grafik çizildi (Şekil 4.15).

3.9. Fibrozis Modeli Üzerinde Kokültür Deneyleri

HGF ile lisanslanan insan Kİ-MKH'lerin, *in-vitro* fibrozis modeli üzerindeki etkisini α -SMA (ACTA2), COL1A1 ve FN ifade düzeyleri saptanarak incelemek amacıyla kokültür deneyleri gerçekleştirildi. *In-vitro* fibrozis modeli oluşturmak için MKH'ler 10 ng/mL TGF- β 1 ile uyarıldı (68). Fibrozis modelinin oluşması için gerekli optimum süreyi belirlemek için insan Kİ-MKH'ler 6 ve 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekilip yaklaşık %70 yoğunluğa geldiklerinde 24 saatliğine serumsuz besi ortamına alındı. Ardından 10 ng/mL TGF- β 1 ile 24, 48 ve 72 saat uyarıldı ve RNA izole edilerek RT-qPCR ile ACTA2, COL1A1 ve FN ifadeleri değerlendirildi. Deneylerde referans gen olarak RPLP0 kullanıldı (69). Kokültür ile tedavi grupları için ise TGF- β 1 uyarımının 24. ve 48. saatlerinde başlatılmak üzere 4 μ m porlara sahip transwell sistem üzerine DMF10 ile, MKH ile ve HGF-MKH ile 24 saatlik kokültürler gerçekleştirildi. Tedavi süresi olarak belirlediğimiz 24 saatlik kokültürün ardından toplanan hücrelerden elde edilen RNA'lardan 250 ng cDNA sentezlendi ve bu cDNA'lar 1:2 oranında dilüe edilerek ACTA2, COL1A1 ve FN primerlerinin kullanıldığı RT-qPCR reaksiyonunda kullanıldı. Gen ifade değişimleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile analiz edildi (70).

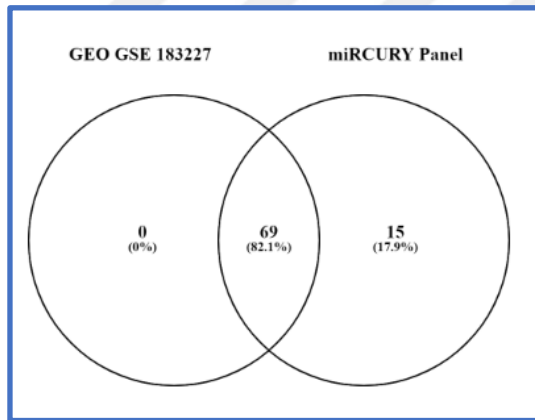
4 BULGULAR

4.1. Fibrozis ile İlişkili miRNA'ların Saptanması



Şekil 4.1. Literatür taramasından elde edilen fibrozis ilişkili miRNA listesi ile, insan Kİ-MKH'lerinde ifade olan miRNA'ların kesişim kümesi.

Literatür taramasından elde edilen 233 adet fibrozis ile ilişkili miRNA listesi ile GSE 183227 numaralı veri setinde insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde ifadesi gösterilmiş olan 69 adet miRNA listesinin karşılaştırılması. Veri setindeki 69 miRNA'nın tamamı, literatürden elde edilen listenin kapsamında idi.



Şekil 4.2. İnsan Kİ-MKH'lerinde ifade olan miRNA'lar ile Human Fibrosis Focus panelindeki miRNA'ların kesişim kümesi.

İnsan Kİ-MKH'lerinde ifade olduğu saptanmış olan 69 miRNA'yı içeren listenin tamamı, Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel'de mevcuttu.

4.2. MKH Kültüründe Mycoplasma Kontaminasyonunun Tayini

MycoAlert kiti, örnekteki mikoplazmaların parçalanmasına ve içerisindeki enzimlerin MycoAlert substratı ile reaksiyona girmesi ile ortamdaki ADP'nin ATP'ye dönüşmesine sebep olan ve bu süreçte lusiferaz enzimi ile ışımaya olmasını sağlayan biyokimyasal bir testtir. Örnek içerisinde mikoplazma kontaminasyonu varsa ikinci okutma (B) değeri, ortamda yükselen ATP miktarı ile yapılan ışımadan dolayı ilk okutma (A) değerine göre yükselmektedir. Örneklerin B ve A değerleri sırasıyla 34718 RLU/s ve 15089 RLU/s olarak bulundu. B/A değeri 0.43 olduğu için örnek mikoplazma negatif olarak değerlendirildi.

4.3. RNA Ölçümleri ve Kalite Tayini

Optimizasyon deneylerinde kullanılan total RNA'nın ölçüm sonuçları aşağıdaki gibidir;

MKH-P4 RNA konsantrasyonu: 156,4 ng/μl

MKH-P4 A260/ A280 = 1,94

MKH-P4 A260/A230 = 0,55

HGF-MKH-P4 RNA konsantrasyonu: 452,3 ng/μl

HGF-MKH-P4 A260/ A280= 1,96

HGF-MKH-P4 A260/A230= 0,99

A260/230 değeri RNA'nın, içerisinde çözünmüş olduğu Qiazol'ün bileşenlerinden guanidyum izotiyosiyanatın 230 nm dalga boyunda pik vermesinden dolayı beklenen 2.0 – 2.2 arasındaki değerlerden düşük saptandı. Bu sonuç RNA izolasyonu yapılırken teknik hatalardan kaynaklanmış olup, elde edilen RNA'da Qiazol kontaminasyonu olabileceğini işaret etmektedir.

- Human Fibrosis Focus PCR Panelinde kullanılmak üzere izole edilmiş olan total RNA'nın ölçüm sonuçları aşağıdaki gibidir;

MKH-P4 RNA konsantrasyonu: 540,97 ng/μl

MKH-P4 A260/ A280 = 2,00

MKH-P4 A260/A230= 1,97

HGF-MKH-P4 RNA konsantrasyonu: 356,36 ng/ μ l

HGF-MKH-P4 A260/ A280 = 1,98

HGF-MKH-P4 A260/A230= 0,77

Kontrol (MKH) grubunda A260/A280 ve A260/A230 değerleri temiz bir RNA'yı işaret etmektedir. Fakat HGF ile lisanslanmış MKH grubunda (HGF-MKH) A260/A230 değerinin düşük olması, Qiazol kontaminasyonu olabileceğini düşündürdü.

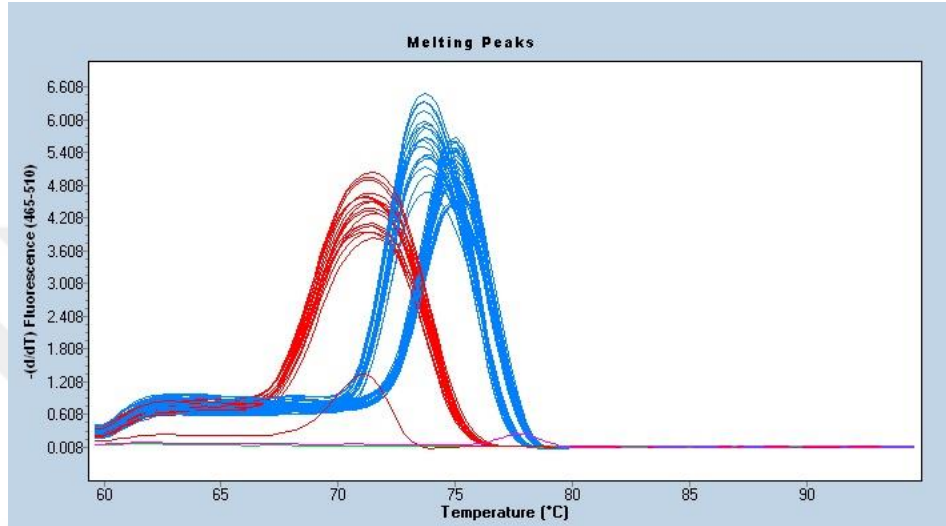
4.4. Panelde Kullanılacak Optimum cDNA'yi Belirleme Çalışmalarının Sonuçları

Panelde kullanılacak optimum cDNA'yi belirleyebilmek için düşük düzeyde (hsa-miR-137-3p, miR-200a-3p) ve yüksek düzeyde (hsa-miR-103a-3p) ifade edildiğini bildiğimiz ve laboratuvarımızda bulunan primerler ile RT-qPCR çalışmaları gerçekleştirildi.

Tablo 4-1. miRNA ifadelerinin RT-qPCR’da saptanmasında kullanılacak optimum RNA ve cDNA konsantrasyonlarının belirlenmesi-1

	Ortalama Ct	Standart Sapma
20ng - 1/40 - hsa-miR-137-3p	30.76	0.14
20ng - 1/40 - hsa-miR-103a-3p	28.69	0.10
20ng - 1/40 - unisp6	21.83	0.07
20ng - 1/60 - hsa-miR-137-3p	31.58	0.11
20ng - 1/60 - hsa-miR-103a-3p	29.47	0.04
20ng - 1/60 - unisp6	22.52	0.05
20ng - 1/80 - hsa-miR-137-3p	32.01	0.16
20ng - 1/80 - hsa-miR-103a-3p	29.66	0.10
20ng - 1/80 - unisp6	22.97	0.01
40ng - 1/40 - hsa-miR-137-3p	29.25	0.04
40ng - 1/40 - hsa-miR-103a-3p	27.60	0.11
40ng - 1/40 - unisp6	21.35	0.13
40ng - 1/60 - hsa-miR-137-3p	29.84	0.06
40ng - 1/60 - hsa-miR-103a-3p	28.13	0.01
40ng - 1/60 - unisp6	21.89	0.05
40ng - 1/80 - hsa-miR-137-3p	30.35	0.19
40ng - 1/80 - hsa-miR-103a-3p	28.43	0.20
40ng - 1/80 - unisp6	22.28	0.11
80ng - 1/40 - hsa-miR-137-3p	27.80	0.05
80ng - 1/40 - hsa-miR-103a-3p	25.65	0.10
80ng - 1/40 - unisp6	21.28	0.00
80ng - 1/60 - hsa-miR-137-3p	28.47	0.06
80ng - 1/60 - hsa-miR-103a-3p	26.30	0.04
80ng - 1/60 - unisp6	21.94	0.16
80ng - 1/80 - hsa-miR-137-3p	28.86	0.02
80ng - 1/80 - hsa-miR-103a-3p	26.84	0.07
80ng - 1/80 - unisp6	22.49	0.00

İnsan Kİ-MKH'lerinden izole edilmiş olan farklı konsantrasyonlardaki RNA'dan (20 ng, 40ng ve 80ng) RNA'dan sentezlenen cDNA'lardan, 1/40, 1/60 ve 1/80 oranında yapılan dilüsyonlarda hsa-miR-137-3p'nin ifadesi saptanmıştır. Referans gen olarak hsa-miR-103a-3p kullanılmış olup, unisp6 (Kat. No: YP00203954, Qiagen) ise deney kontrolüdür (spike-in). hsa-miR-137-3p'ler üçer tekrarlı, diğerleri iki tekrarlı çalışıldı.



Şekil 4.3. İnsan Kİ-MKH'lerinden izole edilmiş olan RNA'dan 20 ng, 40ng ve 80ng'larda sentezlenen cDNA'lerin, 1/40, 1/60 ve 1/80 oranında yapılan dilüsyonlarıyla yapılan gerçek zamanlı PCR reaksiyonunun erime sıcaklıkları grafiği.

Tablo 4.1 incelendiğinde hsa-miR-137-3p için 80 ng total RNA'dan sentezlenmiş olan ve 1/40 ile 1/60 dilüsyonlu cDNA'nın kullanıldığı gerçek zamanlı PCR reaksiyonunda en yüksek Ct değerleri dikkat çekmekteydi (sırası ile Ortalama Ct değerleri 27.8 ± 0.05 ve 28.47 ± 0.06). İlginç olarak 1/80 dilüsyonlu cDNA'de hsa-miR-137-3p'nin Ct değeri 1/60 dilüsyon ile benzerdi (28.86 ± 0.02). hsa-miR-103a-3p ifadesinde de 80 ng total RNA'dan sentezlenmiş olan ve 1/40 ile 1/60 dilüsyonlu cDNA'nın kullanıldığı gerçek zamanlı PCR reaksiyonunda en yüksek Ct değerleri mevcuttu (sırası ile 25.65 ± 0.1 ve 26.3 ± 0.04). Spike-in kontrolü olan UniSp6 için tüm plaka Ct ortalaması 22.06 ± 0.556 idi.

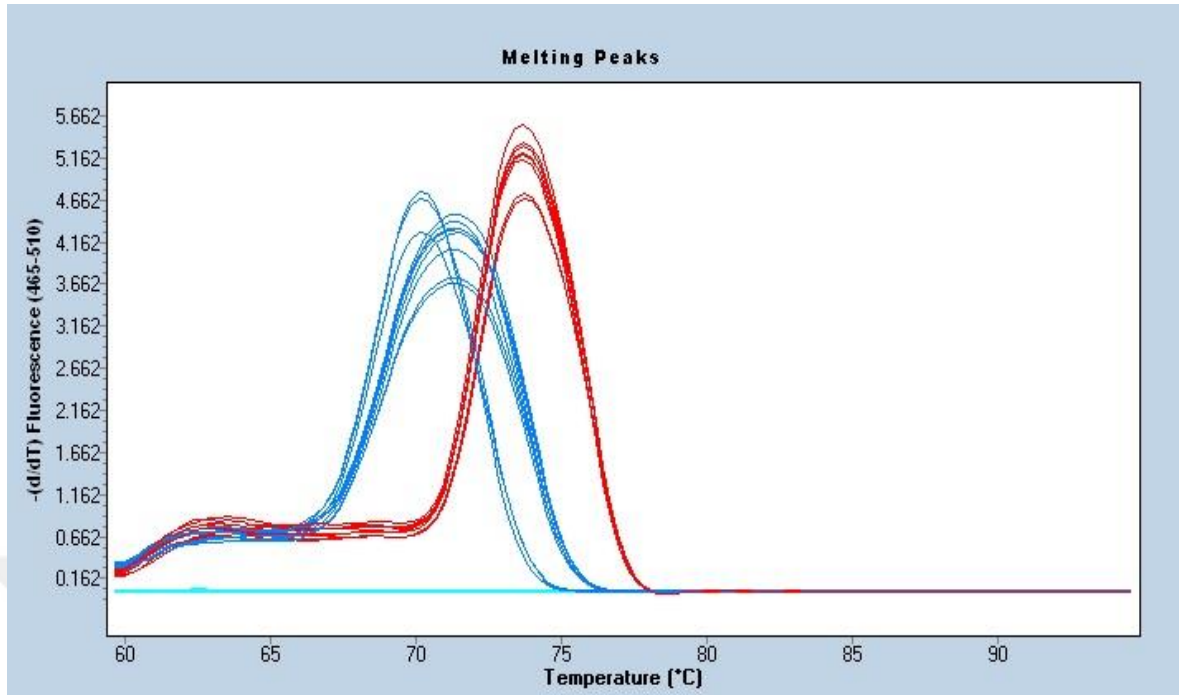
Daha düşük miRNA ifadeleneşmesi olan miR-200a-3p düzeyleri için 160 ng ve 320 ng total RNA'dan elde edilen cDNA'lerin 1/60 ve 1/80 dilüsyonları ile gerçek zamanlı PCR da yapıldı. Bu cDNA'ler ile miR-103a-3p ve unisp6 ifadeleri de test edildi. 320 ng total RNA'dan elde edilen cDNA'nın kullanıldığı PCR reaksiyonunda miR-200a-3p ifadesi saptanabildi. 1/80 dilüsyonda iki tekrardan sadece bir tanesinde

Ct değeri saptanabildi. 1/60 dilüsyonda ise miR-200a-3p'nın ortalama Ct'si 37.61 ± 1.06 idi (Tablo 4.2). Gen ifadelerinin az olduğu durumlarda RT-qPCR tekrarlanabilirliğin düşük olması gerçek zamanlı PCR cihazının limitasyonudur ve bu nedenle standart sapmalar da daha yüksek görülmektedir. Bazı araştırmacılar 35-40 arasındaki Ct değerleri uç değer olarak kabul ederek bu değerleri analizlere dahil etmemeyi tercih etmektedirler (71). Spike-in kontrolü olan unisp6 için tüm plaka Ct ortalaması 25.20 ± 0.295 idi. Kullanılan total RNA miktarı arttığında spike-in kontroldeki Ct değerindeki düşüş dikkat çekici idi. Yüksek RNA miktarına bağlı inhibitör etki olabileceği değerlendirildi. Ancak miR-103a-3p'de, cDNA sentezinde kullanılmış olan total RNA miktarında 80 ng'dan 160 ng'a geçiş ile 1/60 dilüsyon ile Ct değerinde, daha yüksek ifadelenmeye tekabül eden 1.1 siklus düşüş görülmesi inhibisyon olmadığına işaret etmektedir (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2 karşılaştırması). Aynı şekilde 160 ng total RNA ile 320 ng total RNA'dan elde edilen cDNA'ların 1/60 dilüsyonlu PCR sonuçları arasında 1.25 sikluluk fark saptanmaktadır (sırası ile Ct değerleri 25.19 ve 23.94; Tablo 4.2).

Tablo 4-2. miRNA ifadelerinin RT-qPCR’da saptanmasında kullanılacak optimum RNA ve cDNA konsantrasyonlarının belirlenmesi-2.

Örnek İsmi	Ortalama Ct	Standart Sapma
160 ng - 1/60 - miR-200a-3p	-	-
160 ng - 1/60 - miR-103a-3p	25.19	0.21
160 ng - 1/60 - unisp6	25.04	0.04
160 ng - 1/80 - miR-200a-3p	-	-
160 ng - 1/80 - miR-103a-3p	25.67	0.05
160 ng - 1/80 - unisp6	25.58	0.01
320 ng - 1/60 - miR-200a-3p	37.61	1.06
320 ng - 1/60 - miR-103a-3p	23.94	0.01
320 ng - 1/60 - unisp6	24.91	0.06
320 ng - 1/80 - miR-200a-3p	36.85	0.00*
320 ng - 1/80 - miR-103a-3p	24.21	0.02
320 ng - 1/80 - unisp6	25.29	0.02

İnsan Kİ-MKH’lerinden izole edilmiş olan 80ng, 160ng ve 320ng RNA’dan sentezlenen cDNA’lardan 1/60 ve 1/80 oranında yapılan dilüsyonlarda; insan Kİ-MKH’lerinde düşük ifade olduğu bilinen hsa-miR-200a-3p’nin ifadesi saptanmıştır. 80 ng ve 160 ng RNA’dan sentezlenmiş olan cDNA’lerin kullanıldığı miR-200a-3p örneklerinde ifade saptanamadı. Referans gen olarak hsa-miR-103a-3p kullanılmış olup, unisp6 ise deney kontrolüdür (spike-in). * = İki tekrardan sadece birinde Ct değeri alındı.



Şekil 4.4. İnsan Kİ-MKH'lerinden izole edilmiş olan RNA'dan 80 ng, 160ng ve 320ng'larda sentezlenen cDNA'lerin, 1/60 ve 1/80 oranında yapılan dilüsyonlarıyla yapılan gerçek zamanlı PCR reaksiyonunun erime sıcaklıkları grafiği.

20, 40, 60 ve 80 ng ve 160 ng RNA'dan sentezlenen cDNA'lerin kullanıldığı örneklerde, insan Kİ-MKH'lerinde ifadesi düşük olan hsa-miR-200a-3p'nin ifadesi saptanamadı. 320 ng total RNA'dan sentezlenen cDNA kullanıldığında ise 36 ve üzeri Ct değerlerinde hsa-miR-200a-3p ifadesi görüldü. Bu sebeple miR-200a-3p gibi düşük düzeyde ifade olan miRNA'ları da güvenilir olarak saptamak amacıyla, Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel çalışılırken total RNA konsantrasyonunu daha da yükselterek 800 ng total RNA'dan cDNA sentezlenmesine ve 1/60 dilüsyon kullanılmasına karar verildi.

4.5. Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel – Çalışma 1 Sonuçları ve Değerlendirmesi

800 ng total RNA ile cDNA'ın 1/60 dilüsyonunun kullanıldığı Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel ile yapılan RT-qPCR çalışmasında yapılan Geneglobe analizleri için her iki çalışma grubunda ortalama Ct değerleri benzer olan SNORD44, SNORD38B ve SNORD49A'lar normalizasyon referansları (internal kontrol) olarak kullanıldı (Şekil 4.5). Bu üç referans genin ortalama Ct değerleri hem MKH grubunda, hem de HGF-MKH grubunda 20.72'di (Tablo 4.3). İki katın üzerinde değişim gösteren ve teknik tekrarlarda Ct varyasyonu en az olan üç miRNA (hsa-miR-223-3p, hsa-miR-5011-5p, hsa-miR-661) saptandı (Tablo 4.4). U6 snRNA (v2) HGF lisanslaması ile MKH'lerde iki kattan fazla değişim göstermesi de dikkat çekiciydi.

The screenshot displays the 'miRCURY LNA miRNA PCR Data Analysis' software interface. The 'Sample Manager' tab is active, showing a list of miRNAs and internal amplification controls. The 'Internal Amplification Controls' section is selected, showing a list of miRNAs including SNORD44, SNORD38B, and SNORD49A. The 'Selected Reference miRNA' section on the right lists these three miRNAs. The interface also includes options for 'Use Single C, Ct/Ch' and 'Define Assay-Specific C, Ct/Ch using Negative Control Samples'.

Şekil 4.5. Geneglobe analiz sayfasında Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel için gerçekleştirilen analizlerde kullanılan referanslar SNORD44, SNORD38B ve SNORD49A olarak seçildi.

Tablo 4-3. Panel analizi için kullanılan referans miRNA'lar ve Ct değerleri.

	SNORD44	SNORD38B	SNORD49A	Ort. Ct	Ort. Ort. Ct.
MKH1	19.94	21.00	21.18	20.71	20.72
MKH2	19.96	21.03	21.21	20.73	
HGF-MKH1	19.89	21.09	21.20	20.73	20.72
HGF-MKH2	19.86	21.05	21.18	20.70	

Panel analizi için referans olarak belirlenen genlerin tamamının ortalamaları alınarak (GeneGlobe aracının kullandığı normalizasyon algoritmasına göre) analizler bu referans ortalamaları üzerinden yürütüldü.

İfadesi belirgin ve anlamlı biçimde değişmiş olan hsa-miR-223-3p (MKH Ort Ct= 36.25, HGF-MKH Ort Ct= 32.69), hsa-miR-661 (MKH Ort Ct= 33.88, HGF-MKH Ort Ct= 32.84) ve hsa-miR-5011-5p (MKH Ort Ct= 35.06, HGF-MKH Ort Ct= 33.81) için Targetscan, miRDB ve miRTarBase veritabanlarından hedef tahminlemesi yapıldı ardından fonksiyonel zenginleştirme analizleri yapıldı ve daha sonraki yolak analizleri bu üç miRNA ile devam ettirildi.

Bu profillemeye sonucunda Kİ-MKH'lerde ifadenmesi çok düşük ve çok yüksek olan bazı miRNA'lar da saptanmıştır: hsa-miR-21-5p (Ort Ct MKH=16.50, Ort Ct HGF-MKH= 16.28), hsa-miR-125b-5p (Ort Ct MKH= 17.31, Ort Ct HGF-MKH= 17.14) ve hsa-miR-23a-3p (Ort Ct MKH= 18.70, Ort Ct HGF-MKH= 18.59) en yüksek ifadesi görülen miRNA'lar iken, hsa-miR-208a-3p, hsa-miR-372-3p ve hsa-miR-5692a'nın ifadelerinin olmadığı görüldü.

Bunların yanı sıra, Ct değerleri 35'in yukarısında olmasından kaynaklı olarak iki grup arasında ortalama Ct değerleri farklı olsa da tekrarlanabilirliğindeki varyasyonlar nedeniyle bir çıkarım yapmaya elverişli olmayan birkaç miRNA da mevcuttu. Bu miRNA'lardan birisi olan miR-211-5p'nin MKH grubunda ifadesi yokken, HGF-MKH grubundaki iki tekrarın birinde Ct değeri 37.82 olarak saptanmıştır. hsa-miR-325 ise MKH grubunda tek tekrarda 38.75 Ct değerleri verirken HGF-MKH grubunda ifadesinin olmadığı görüldü.

Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel ile yapılan RT-qPCR deneyi sonucunda 33. Döngü ve daha sonrasında ışına vermiş olan miRNA'ların ifadelenmelerindeki değişimlerin yeterince güvenilir değildir. Dolayısıyla hem miRNA ifade değişimlerinin daha erken sikluslarda gösterilmesi, hem de ifadesine rastlanmayan miRNA'ların gösterilebilmesi amaçlanarak, ikinci panelde çalışmak üzere kullanılacak olan total RNA miktarı artırılarak optimizasyon çalışmalarına geri dönüldü.



Tablo 4-4. 800 ng total RNA ile cDNA'nın 1/60 dilüsyonunun kullanıldığı Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel ile yapılan RT-qPCR sonucunda ifade kat değişimi 2'nin üzerinde olan miRNA'lar.

miRNA İsmi	MKH	MKH	HGF MKH	HGF MKH	Kat Değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Kat Regülasyonu* ($-1 / \text{kat değişimi}$)	miRNA ID
hsa-miR-223-3p	36.31	36.19	33.0	32.38	11.81	11.81	MIMAT0000280
hsa-miR-5011-5p	34.76	35.36	33.54	34.09	2.36	2.36	MIMAT0021045
hsa-miR-661	33.94	33.83	32.84	32.84	2.06	2.06	MIMAT0003324
U6 snRNA (v2)	27.21	27.59	25.96	25.99	2.69	2.69	X59362 (NCBI referans)

*Kat regülasyonu kavramı, kat değişimi değerlerinin biyolojik olarak anlamlı bir şekilde ifade edilmesidir. 1'in üzerinde olan kat değişimi değerleri ifade artışlarını işaret eder ve kat regülasyonu değeri ile kat değişimi değeri birbirine eşittir. 1'in altında olan kat değişimi değerleri ise ifade azalışını işaret eder ve bu durumda kat regülasyonu değeri, kat değişimi değerinin çarpmaya göre tersinin negatiftir. Örneğin kat değişimi 0.25 olan bir genin kat regülasyonu: $-(1/0.25) = -4$ 'tür (68).

4.6. Optimizasyon Çalışmaları İçin 800 ng, 2000 ng ve 4000 ng Total RNA ile Yapılan qPCR Sonuçları

800 ng total RNA'dan sentezlenen cDNA kullanıldığında			Ortalama Ct	Std. Sapma
B1	hsa-miR-200a-3p 800 ng 1/40	38.74	36.86	2.65872
B2	hsa-miR-200a-3p 800 ng 1/40	34.98		
B3	hsa-miR-103a-3p 800 ng 1/40	22.88	22.825	0.07778
B4	hsa-miR-103a-3p 800 ng 1/40	22.77		
B5	UniSp6 800 ng 1/40	24.04	23.985	0.07778
B6	UniSp6 800 ng 1/40	23.93		
C1	hsa-miR-200a-3p 800 ng 1/60		0	0
C2	hsa-miR-200a-3p 800 ng 1/60			
C3	hsa-miR-103a-3p 800 ng 1/60	23.44	23.44	0
C4	hsa-miR-103a-3p 800 ng 1/60	23.44		
C5	UniSp6 800 ng 1/60	24.53	24.49	0.05657
C6	UniSp6 800 ng 1/60	24.45		

2000 ng total RNA'dan sentezlenen cDNA kullanıldığında			Ortalama Ct	Std. Sapma
D1	hsa-miR-200a-3p 2000 ng 1/40	34.09	33.96	0.18385
D2	hsa-miR-200a-3p 2000 ng 1/40	33.83		
D3	hsa-miR-103a-3p 2000 ng 1/40	20.34	20.395	0.07778
D4	hsa-miR-103a-3p 2000 ng 1/40	20.45		
D5	UniSp6 2000 ng 1/40	23.04	23.035	0.00707
D6	UniSp6 2000 ng 1/40	23.03		
E1	hsa-miR-200a-3p 2000 ng 1/60	34.9	35.45	0.77782
E2	hsa-miR-200a-3p 2000 ng 1/60	36		
E3	hsa-miR-103a-3p 2000 ng 1/60	20.98	21.035	0.07778
E4	hsa-miR-103a-3p 2000 ng 1/60	21.09		
E5	UniSp6 2000 ng 1/60	23.8	23.78	0.02828
E6	UniSp6 2000 ng 1/60	23.76		

4000 ng total RNA'dan sentezlenen cDNA kullanıldığında			Ortalama Ct	Std. Sapma
F1	hsa-miR-200a-3p 4000 ng 1/40	32.91	32.85	0.08485
F2	hsa-miR-200a-3p 4000 ng 1/40	32.79		
F3	hsa-miR-103a-3p 4000 ng 1/40	19.49	19.475	0.02121
F4	hsa-miR-103a-3p 4000 ng 1/40	19.46		
F5	UniSp6 4000 ng 1/40	23.03	23.14	0.15556
F6	UniSp6 4000 ng 1/40	23.25		
G1	hsa-miR-200a-3p 4000 ng 1/60	33.85	34.035	0.26163
G2	hsa-miR-200a-3p 4000 ng 1/60	34.22		
G3	hsa-miR-103a-3p 4000 ng 1/60	19.93	20.04	0.15556
G4	hsa-miR-103a-3p 4000 ng 1/60	20.15		
G5	UniSp6 4000 ng 1/60	23.85	23.94	0.12728
G6	UniSp6 4000 ng 1/60	24.03		

Şekil 4.6. Yüksek miktarda total RNA ile yapılan cDNA'lerin, qPCR'da miRNA ifadeleri üzerindeki etkilerinin araştırılması için ön çalışma.

İfadesi düşük olan hsa-miR-200a-3p'nin 800 ng total RNA ve 1/60 cDNA dilüsyonu kullanıldığında ifadesine rastlanmazken 4000 ng total RNA ve 1/40 cDNA dilüsyonunda çalışıldığında ortalama Ct değeri 32.85 olarak saptandı. Kİ-MKH'lerde ifadesi yüksek olan hsa-miR-103a-3p'nin ise 800 ng total RNA ve 1/60 cDNA

dilüsyonunda Ct değerleri ortalaması olan 23.44, RNA miktarı 4000 ng'a çıkarılıp 1/40 cDNA dilüsyonu ile çalışıldığında 19.475 olarak saptanmıştır. Bu durum yüksek RNA miktarı ve cDNA konsantrasyonunun qPCR'ı inhibe etmediğine işaret etmektedir.

RNA miktarının 800 ng'ın üzerine çıkarılmasının herhangi bir inhibisyona neden olup olmadığını ve düşük ifadeli miRNA'ları saptayabilmek için gereken RNA miktarını saptamak amacıyla çalışma yapıldı.

Yukarıda elde ettiğimiz sonuçlar ışığında düşük ifade olan miRNA'larda değişimleri saptayabilmek için yüksek konsantrasyonda RNA'dan cDNA sentezlenerek miRNA PCR panelinin her iki grup için tekrarlanmasına karar verildi. Bunun için 4000 ng total RNA'dan cDNA sentezlendi ve 1/40 cDNA dilüsyonu ile RT-qPCR ile miRNA profili çalışıldı.

4.7. Human Fibrosis Focus, miRCURY LNA miRNA PCR Panel – Çalışma 2 Sonuçları ve Değerlendirmesi

4000 ng total RNA'dan cDNA sentezlendi ve 1/40 cDNA dilüsyonu ile gerçekleştirilen miRNA profillemeye çalışmasında ilk çalışmadan farklı olarak SNORD49A, referans olarak seçilen genler arasından çıkarıldı (Şekil 4.7). Bunun sebebi SNORD49A'nın Ct ortalaması MKH grubunda 19.17 iken HGF-MKH grubunda 18.64 olması idi. Bu farklılık, analiz için kullanılacak referansların ortalamasında yanıltıcı sonuçlar elde etmeye sebebiyet verdiği için ikinci çalışmada SNORD44 ve SNORD38B kullanıldı. Geneglobe analizleri sonucu MKH'ların HGF lisanslaması ile iki katın üzerinde değişim gösteren miRNA'lar (hsa-miR-32-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-377-3p) bir önceki çalışmadan farklıydı (Tablo 4.6). U6 snRNA (v2) ifadesindeki değişim (2.19 kat) ise bir önceki çalışma (2.69 kat) ile benzerdi (Tablo 4.4 ve Tablo 4.6).

Şekil 4.7. İkinci çalışmada kullanılan referans genler, internal amplifikasyon kontrolü, Ct cut-off değeri ve analiz yöntemi için kullanılacak olan referans genler.

Tablo 4-5. 4000 ng total RNA'dan sentezlenen 1/40 dilüe cDNA ile gerçekleştirilen miRCURY LNA miRNA PCR Panel ile gerçekleştirilen miRNA profillemesinde referans olarak seçilen genlerin Ct ortalamaları.

	SNORD44	SNORD38B	Ort. Ct	Ort. Ort. Ct.
MKH1	16.80	18.18	17.49	17.44
MKH2	16.70	18.07	17.39	
HGF-MKH1	16.85	17.86	17.35	17.44
HGF-MKH2	17.02	18.02	17.52	

Verilerin normalizasyonu için QIAGEN tarafından tasarlanan panel analiz aracında, işlenmiş veriler karşımıza çıkmaktadır. İşlenmiş veriler, aynı örneklerin farklı panellerde çalışıldığı durumlarda paneller-arası varyasyonu kalibre etmek için büyük önem taşımaktadır (72). Bu nedenle paneller-arası kalibrasyonu sağlamak için aşağıdaki denklem ile ham Ct değerleri (C_{qGOI}), düzeltilmiş Ct değerlerine (C_{qnorm}) dönüştürülmektedir:

$$C_{qnorm} = C_{qGOI} - \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \left(C_{qIPC_j} - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n C_{qIPC_i} \right)$$

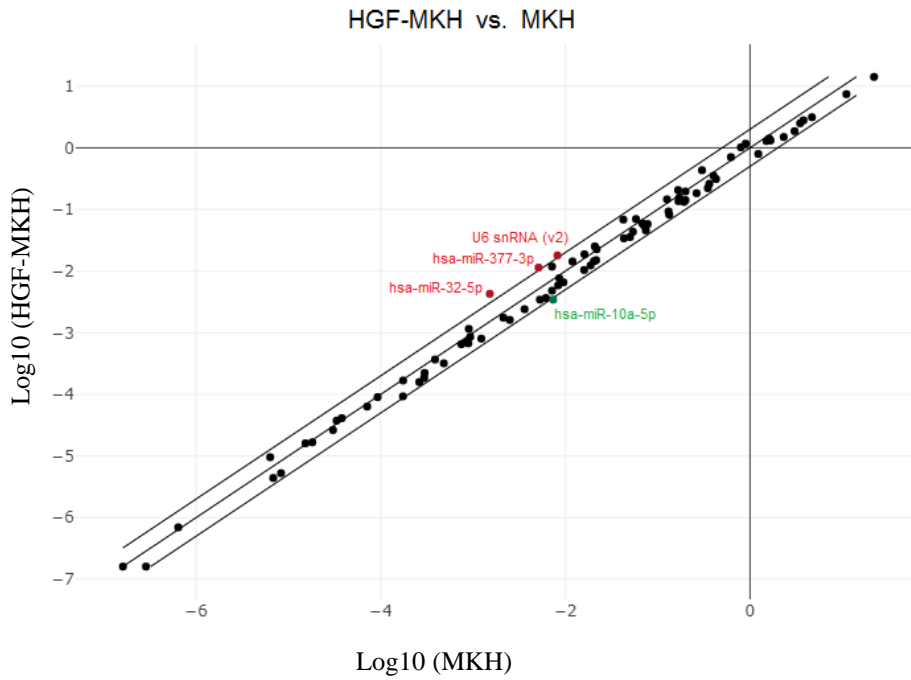
“m” terimi, ilgili çalışmadaki paneller-arası kalibratör (IPC) genlerin sayısını, “n” ise çalışılan veri setindeki paneller-arası kalibratör genlerin sayısını temsil etmektedir.

Tablo 4-6. 4000 ng total RNA’dan sentezlenen 1/40 dilüe cDNA ile gerçekleştirilen miRCURY LNA miRNA PCR Panelde ifadelenmesi 2’nin üzerinde değişen miRNA’lar.

miRNA İsmi	MKH	MKH	HGFMKH	HGFMKH	Kat Değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Kat Regülasyonu	miRNA ID
hsa-miR-32-5p	26.82	26.78	25.24	25.37	2.82	2.82	MIMAT0000090
hsa-miR-10a-5p	24.42	24.62	25.61	25.63	0.47	-2.14	MIMAT0000253
hsa-miR-377-3p	25.07	25.02	23.81	23.97	2.23	2.23	MIMAT0000730
U6 snRNA (v2)	24.35	24.38	23.09	23.38	2.19	2.19	X59362 (NCBI referans No.)

Analizlerde kat değişimi (*fold change*) eşiği > 2 (veya < 0.5) olarak belirlendi. Tablo 4.6’da bu şartları sağlayacak şekilde ifade değişimi gösteren miRNA’lar, Ct değerleri, kat değişimi, kat regülasyonu (*fold regulation*) ve erişim numaraları listelenmektedir.

Analiz sonuçlarına göre HGF ile lisanslanan MKH’lerin hsa-miR-32-5p ifadesinde 2.82 kat artış, hsa-miR-10a-5p’de 2.14 kat azalış (*fold change* = 0.47) ve hsa-miR-377-3p ifadesinde 2.23 kat artış görülmüştür. Bu sonuçlar, değişen miRNA ifadelerinin ışına verdiği Ct değerleri itibariyle ilk panel çalışmasına göre daha güvenilirdir.



Şekil 4.8. 4000 ng total RNA'dan sentezlenen 1/40 dilüe cDNA ile gerçekleştirilen miRCURY LNA miRNA PCR Panel ile gerçekleştirilen RT-qPCR sonucunda miRNA ifade değişimlerinin dağılım grafiği.

Teknik tekrarları birbirine yakın olan ve iki grup arasında en az 2 kat ifade değişimi gösteren miRNA'ların log10 tabanına göre ifade düzey değişimleri, geri kalan miRNA'larla beraber dağılım grafiğinde gösterilmiştir.

U6 SnRNA v2 (RNU6-2) ifadesinin, HGF ile ön-koşullandırma/lisanslama yapılan MKH'lerde tekrarlı olarak yaptığımız çalışmalarda yaklaşık 2-2,5 kat artıyor olması dikkat çekicidir. Oysaki, U6 snRNA miRNA PCR çalışmalarında, SNORD44, SNORD47 VE SNORD48 gibi diğer küçük çekirdek-içi RNA'lar ile birlikte yükleme kontrolü olarak (73) veya referans gen olarak (74) kullanılan bir kodlamayan küçük çekirdek-içi RNA'dır.

800 ng total RNA ile çalışılan ilk panelde hsa-miR-211-5p'nin MKH grubunda ifadesi saptanmayıp HGF-MKH grubunda 38.75 ve 40.00 Ct değerleri saptandı. 4000 ng total RNA ile çalışılan ikinci panelde ise MKH grubunda Ct değerleri 37.04 ile 40.00 iken HGF-MKH grubunda Ct değerleri 40.00 ve 36.87 idi. Ayrıca hsa-miR-325 ise ilk panelde MKH grubunda tek tekrarda 38.75 Ct değeri saptandı ve HGF-MKH grubunda ifadesi saptanamadı, ikinci panelde MKH grubunda ifadesine rastlanmayıp HGF-MKH grubunda 39.5 ve 37.73 Ct değerleri görüldü. Bu durum; özellikle hsa-miR-325 için 4000 ng total RNA kullanılan çalışmada MKH'lerde ifadesi olmayıp HGF lisanslaması ile ifadesinin ortaya çıktığını işaret ediyor olabilir. Bu miRNA'ların Ct değerlerinde teknik tekrarlar arasında yüksek varyasyonlar olması sebebiyle daha sağlıklı değerlendirme yapabilmek için hsa-miR-325 ifadesinin incelenmesi ihtiyacı doğmuştur.

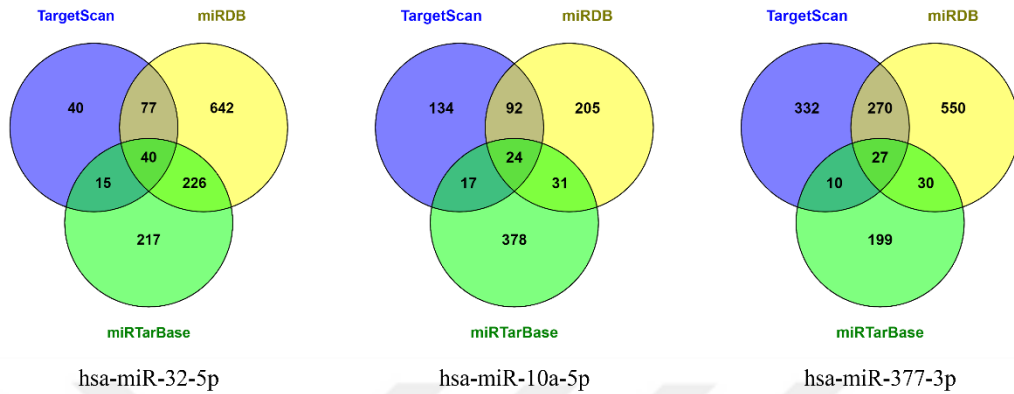
Tablo 4-7. Çalışma 1'de HGF-MKH'lerde MKH'lere göre kat regülasyonu değişimi görülüp, Çalışma 2'de bu değişimlerin azaldığı ya da kaybolduğu miRNA'ların kat regülasyon değerlerinin listesi.

Matür miRNA İsmi	Kat Regülasyonu - Çalışma 1	Kat Regülasyonu - Çalışma 2
hsa-miR-122-5p	-4.23	-1.58
hsa-miR-200a-3p	-2.39	1.05
hsa-miR-211-5p	2.74	1.09
hsa-miR-223-3p	11.81	1.09
hsa-miR-375-3p	2.11	-1.56
hsa-miR-661	2.06	-1.04

4.8. Biyolojik ve Fonksiyonel Zenginleştirme Analizlerinin Sonuçları

4000 ng total RNA'dan sentezlenen 1/40 dilüe cDNA ile gerçekleştirilen miRCURY LNA miRNA PCR Panel çalışmasının ardından, HGF uygulaması ile ifadelenmeleri 2 katın üzerinde değişen hsa-miR-32-5p, hsa-miR-10a-5p ve hsa-miR-377-3p için TargetScan, miRDB ve miRTarBase veritabanlarındaki hedef genlerinin kesişim küme analizleri sonucunda hsa-miR-32-5p için 40 ortak hedef, hsa-miR-10a-5p için 24 ortak hedef, hsa-miR-377-3p için 27 ortak hedef saptandı (Şekil 4.9). miR-

10a-5p, hsa-miR-1110a-5p, hsa-miR-377-3p ortak hedefleri ile DAVID fonksiyonel zenginleştirme aracı kullanılarak yapılan KEGG, REACTOME ve WIKI yolak analizleri sonuçlarında çıkan yollardan $p < 0.05$ olanlar Tablo 4.8’de listelendi.

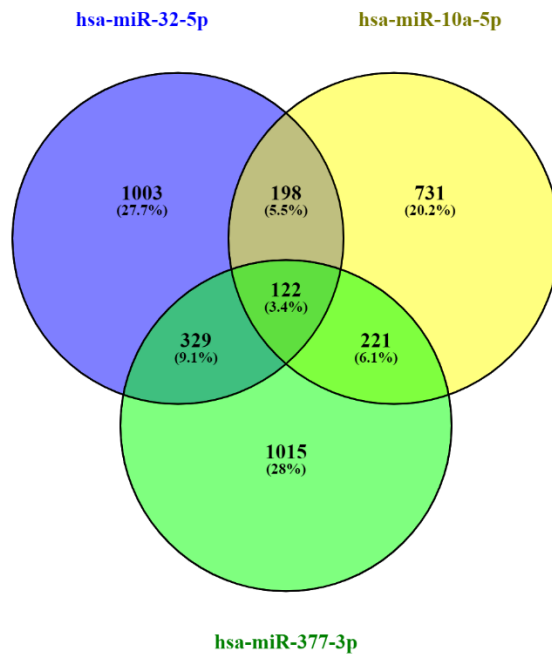


Şekil 4.9. 4000 ng total RNA’dan sentezlenen 1/40 dilüe cDNA ile gerçekleştirilen miRCURY LNA miRNA PCR Panelde ifadeleri değişen miRNA’ların Targetscan, miRDB ve miRTarBase veritabanlarındaki hedeflerinin Venny şemaları. a) hsa-miR-32-5p için 40 ortak hedef, b) hsa-miR-10a-5p için 24 ortak hedef ve c) hsa-miR-377-3p için 27 ortak hedef saptandı.

Tablo 4-8. DAVID fonksiyonel zenginleştirme aracına göre hsa-miR-32-5p, hsa-miR-10a-5p ve hsa-miR-377-3p’nin farklı veritabanlarından elde edilen ortak hedeflerinin rol aldıkları yollar.

miRNA İsmi	KEGG Pathways	REACTOME Pathways	WIKI Pathways
hsa-miR-32-5p	Alzheimer’s Disease	Metabolism of proteins Signal Transduction	Ectoderm differentiation
hsa-miR-10a-5p	Proteoglycans in cancer Rap1 signaling pathway Regulation of actin cytoskeleton	SONUÇ YOK	SONUÇ YOK
hsa-miR-377-3p	SONUÇ YOK	RNA Polymerase II Transcription Gene expression (Transcription) Generic Transcription Pathway Synthesis of active ubiquitin: roles of E1 and E2 enzymes Transcriptional activity of SMAD2/SMAD3:SMAD4 heterotrimer	SONUÇ YOK

Yolak analizleri yapılan miRNA'lar için Targetscan, miRDB ve miRTarBase veritabanlarından elde edilen hedeflerde üç miRNA için de ortak düzenlenen transkriptlere veya yolaqlara rastlanmaması üzerine, binlerce RNA-RNA interaksyonunun, CLIP-seq verilerinin ve degradome seq verilerinin analizi ve entegrasyonu ile oluşturulmuş RNA interaksyon ansiklopedisi ENCORI/starBase (75) aracı ile tahminlenmiş hedef transkriptler ile yolak analizleri tekrarlandı.



Şekil 4.10. ENCORI/STARBASE veritabanından ulaşılan, hsa-miR-32-5p için 1652, hsa-miR-10a-5p için 1272 ve hsa-miR-377-3p için 1687 hedef genin kesişim şeması.

Üç miRNA için ortak çıkan 122 genin fonksiyonel zenginleştirme analizleri sonucunda ulaşılan 31 adet KEGG yolağından 8 tanesinin düzeltilmiş p değeri 0.05'ten küçüktü. Bu yolaqlar aşağıdaki tabloda sıralanmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4-9. Üç miRNA'nın da hedefliyor olduğu 122 genin fonksiyonel zenginleştirme analizi sonucunda çıkan yollar.

KEGG Pathways İsmi	P değeri	Benjamini Düzeltilmiş P Değeri
Chronic myeloid leukemia	3,7E-5	7,3E-3
PI3K-Akt signaling pathway	1,7E-4	1,6E-2
FoxO signaling pathway	7,4E-4	4,0E-2
Longevity regulating pathway	8,3E-4	4,0E-2
MicroRNAs in cancer	1,0E-3	4,0E-2
Pathways in cancer	1,3E-3	4,3E-2
Cushing syndrome	1,8E-3	4,5E-2
Cellular senescence	1,8E-3	4,5E-2

Üç miRNA'nın ortak hedefi olan genlerin rol aldığı yollar arasında PI3K-Akt yolağı dikkat çekmektedir. Özellikle sağkalım için önemli olan bu yolağın, HGF ile ifadesi değişen miRNA'lar tarafından düzenleniyor olması fibrotik süreçler için de önemli olabilir.

ENCORI/StarBase veritabanında hsa-miR-32-5p için 1652, hsa-miR-10a-5p için 1272 ve hsa-miR-377-3p için 1687 adet hedef transkript rastlandı ve bu adımdan sonra iki farklı seçenekle çalışma yürütüldü:

İlki starBase veritabanında saptanan hedef transkriptlerin üç miRNA için ortak kesişim kümesinden elde edilen 122 gen (Şekil 4.10) ile DAVID fonksiyonel zenginleştirme aracı kullanılarak yürütülen yolağ analizleri olup, diğeri ise fibrozis ana mekanizmalarından olan TGF- β , WNT ve Hippo yolları üzerinde bulunan genler ile bu miRNA'ların hedef genlerinin kesiştirilmesidir.

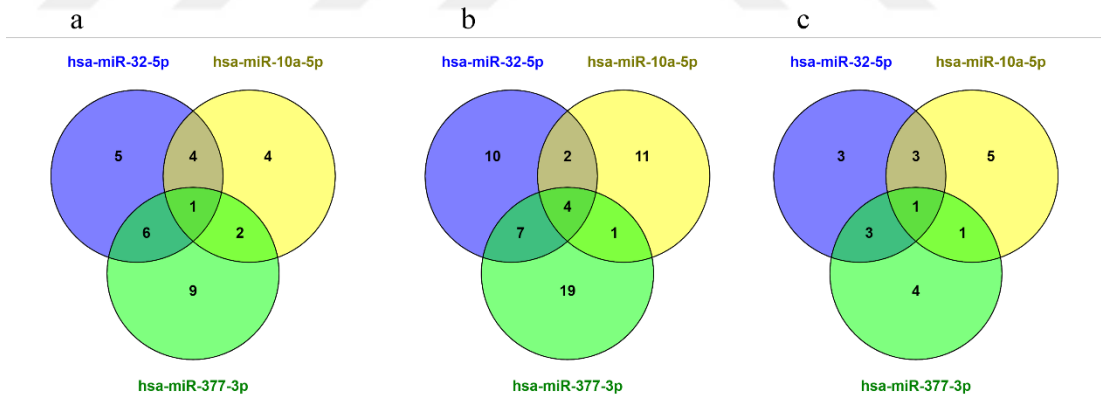
TGF- β yolağı (sistemik adı: M2642), *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) (76, 77) verilerine göre 86 adet gen tarafından düzenlenmektedir. Bu 86 gen ile hsa-miR-32-5p'nin hedeflerinin kesişiminden 16, hsa-miR-10a-5p'nin hedeflerinin kesişiminden 11 ve hsa-miR-377-3p'nin hedeflerinin kesişiminden 18 ortak gen

saptandı. Ortak hedeflerden sadece SMURF1 geni üç miRNA tarafından da hedeflenmektedir. (Şekil 4.11.a).

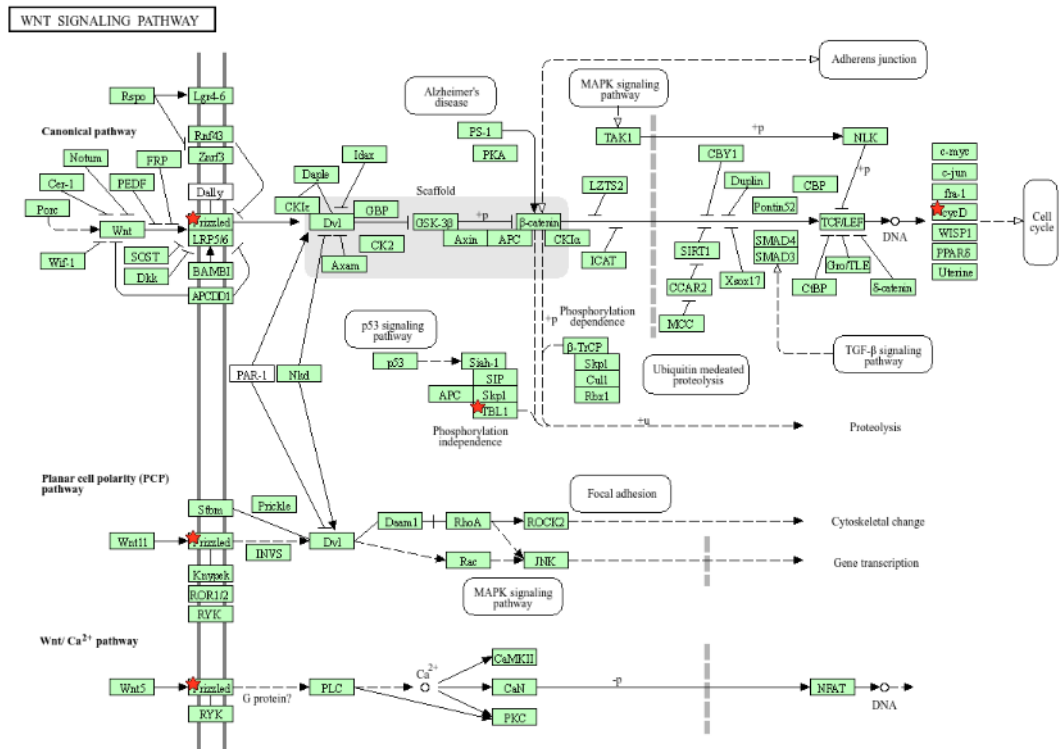
WNT yolağı (sistemik adı: M19428), GSEA verilerine göre 151 gen tarafından düzenlenmektedir. Bu 151 gen ile hsa-miR-32-5p'nin hedeflerinin kesişiminden 23, hsa-miR-10a-5p'nin hedeflerinin kesişiminden 18 ve hsa-miR-377-3p'nin hedeflerinin kesişiminden 31 ortak gen saptandı. Ortak hedeflerden CCND1, FZD4, TBL1XR1 ve CCND2 genleri üç miRNA tarafından da hedeflenmektedir. (Şekil 4.11.b).

Hippo yolağı (sistemik adı: M11445) ise GSEA verilerine göre 44 gen tarafından düzenlenmektedir. Bu 44 gen ile hsa-miR-32-5p'nin hedeflerinin kesişiminden 10, hsa-miR-10a-5p'nin hedeflerinin kesişiminden 10, hsa-miR-377-3p'nin hedeflerinin kesişiminden ise 9 gen saptandı. Ortak hedeflerden sadece NF2 geni üç miRNA tarafından da hedeflenmektedir (Şekil 4.11.c).

TGF- β yolağı üzerinde rol oynayan ve üç miRNA tarafından da ortak olarak hedeflenen SMURF1 geni (*SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 1*) bulunmaktadır.



Şekil 4.11. hsa-miR-32-5p, hsa-miR-10a-5p ve hsa-miR-377-3p'nin hedef genleri ile TGF- β (a), WNT (b) ve Hippo (c) yolaklarında rol oynayan genlerin kesişim kümeleri.



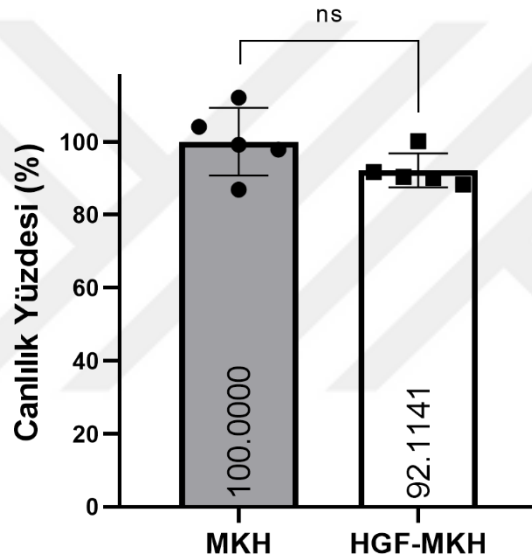
Şekil 4.12. WNT Yolağı üzerinde üç miRNA tarafından da hedeflenen genlerin şematik gösterimi. Kırmızı işaret bulunan genler üç miRNA tarafından da hedeflenmektedir.

WNT yolağı (KEGG ID: hsa04310) üzerinde rol oynayan ve 3 miRNA için de ortak hedef olan FZD4 (Frizzled), TBL1XR1 (TBL1), CCND1 ve CCND2 (CycD) (Şekil 4.12) genleri saptanmıştır.

Bu üç miRNA'nın diğer bir ortak hedefi, Hippo yolağında rol oynayan NF2 genidir.

4.9. WST-1 Metabolik Aktivite Testi: HGF Uyarımı MKH'lerin Canlılığını Etkilememektedir.

10 ng/mL HGF ile 6 saat uyarılmış olan KI-MKH'lerin metabolik aktivite düzeyleri, kontrol grubundaki MKH'lerin metabolik aktivitelerinin %100 olduğu kabul edilerek hesaplanmıştır ve alınan absorbans değerlerine göre HGF-MKH'lerin metabolik aktiviteleri %92.11 olarak saptanmıştır. Canlılık yüzdesi karşılaştırması Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. WST-1 solüsyonu ile inkübasyon inkübasyonun ardından mikropilaka okuyucuda ölçülen absorbans değerlerinin HGF uygulanmış olan MKH'lerde kontrol grubuna göre yüzde değişimi.

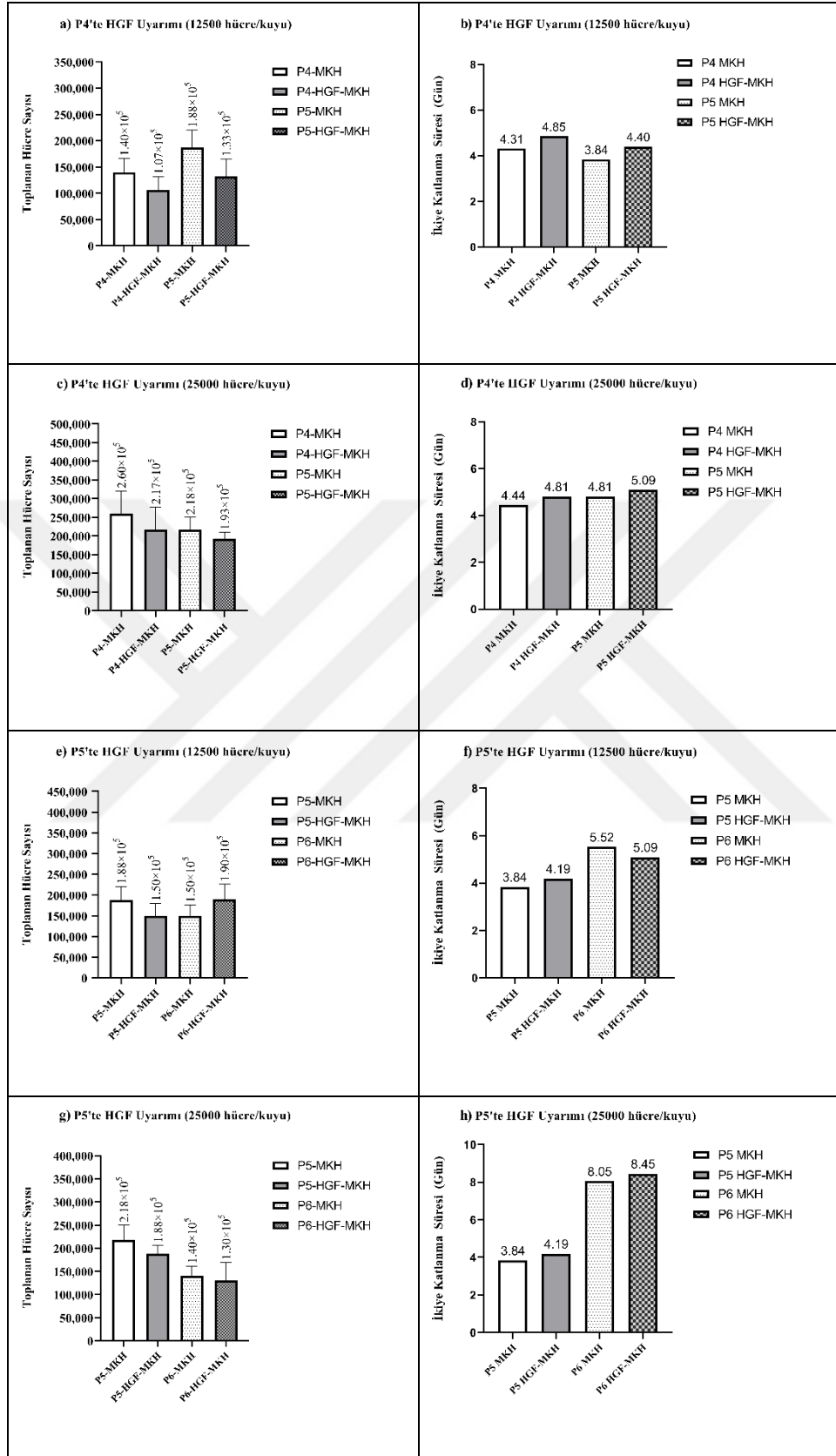
İnsan KI-MKH'lerine 10 ng/mL konsantrasyonda 6 saat boyunca HGF uygulaması, hücrelerin canlılığına istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sebep olmadı.

4.10. Profilerasyon ve Popülasyon İkiye Katlanma Sürelerinin Tayini

Standard kültür ortamındaki MKH ile 6 saatlik 10 ng/mL HGF indüksiyonu ile MKH'nın popülasyon ikiye katlanma sürelerinin değişimi p4 ve p5 hücrelerinin farklı iki dozda 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekimi (12500 hücre /kuyu 25000 hücre/kuyu)

yapılarak ile değerlendirilmiştir (şekil 4.14). P4 ve P5 sonunda toplanan hücresinin sayısı başlangıçta ekilen miktarla karşılaştırıldığında HGF uygulamasının MKH'ler üzerinde proliferasyonu azaltıcı, popülasyon ikiye katlanma süresini artırıcı etkisi olduğunu göstermektedir. Fakat P6'da toplanan hücre sayıları arasındaki yüksek varyasyon (Örneğin P6 HGF-MKH sayımlarında Ort= 190.000 iken SD= 36.515'ti), P6'da HGF'nin etkisi hakkında bir sonuca varmayı sınırlamaktadır.





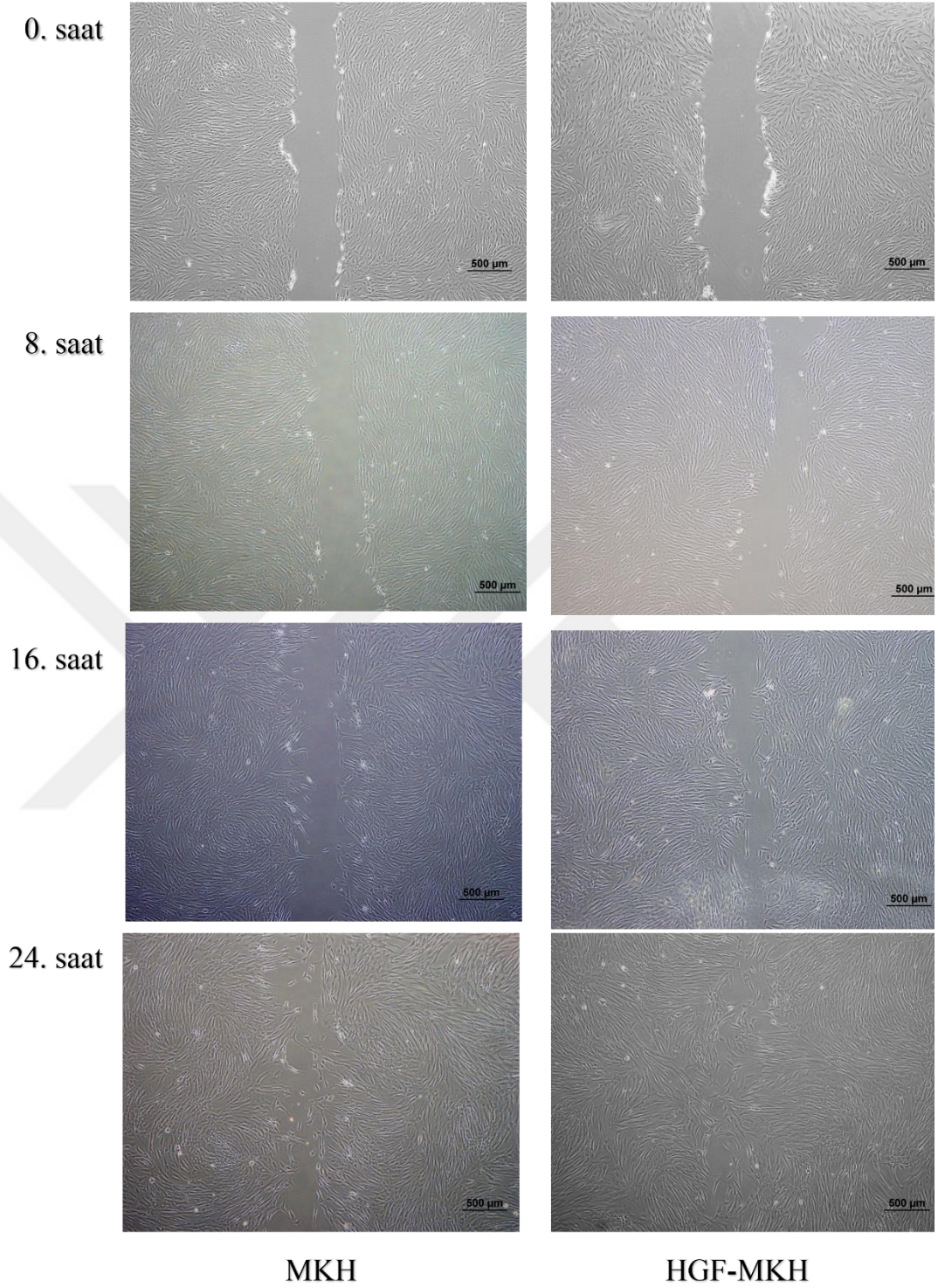
Şekil 4.14.: İki farklı yoğunlukta ekilen ve HGF uygulamasına maruz kalan/kalmayan MKH'lerin hücre sayıları ve toplandığı pasajdaki popülasyon ikiye katlanma süreleri verilmiştir.

4.11. Lateral Motilite (Yara İyileşmesi) Deneyi

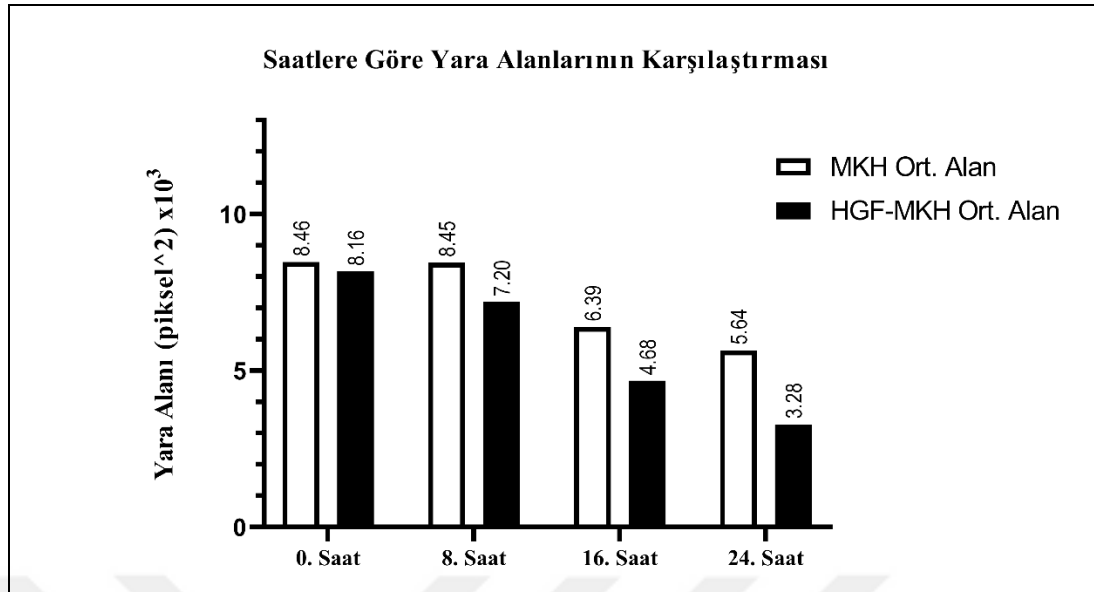
6 kuyucuklu kültür kaplarındaki hücreler üzerinde pipet uçları ile oluşturulan yaralar her 8 saatte bir fotoğraflanarak takip edildi. Her hücre grubu için deneyde analiz edilen her saatte en az üçer fotoğraf çekildi. HGF-MKH'lerin MKH'lere göre yara iyileşmesindeki davranışlarını analiz etmek üzere fotoğraflardaki alanlardan her grup için en az üçü ImageJ programında hesaplanarak piksel² cinsinden değerler alındı. Grafiklerde ise direkt olarak bu alanlar verildi (Şekil 4.16.).

HGF ile uyarılan insan Kİ-MKH'lerin standart koşullarda üretilen MKH'lere göre çok daha avantajlı olup yara iyileşmesi süreci için lateral motiliteyi artırmaktadır.





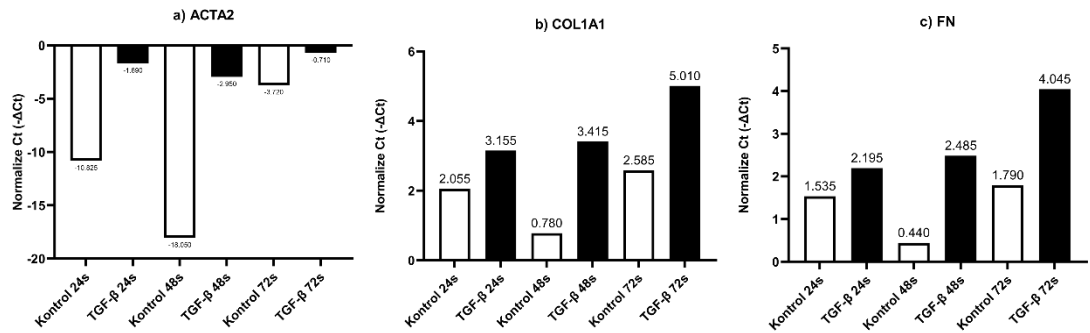
Şekil 4.15.: MKH ve HGF-MKH grubunun 0, 8, 16 ve 24. saatte yarası kapatma durumlarının ışık mikroskobu fotoğrafları.



Şekil 4.16. HGF ile indüklenmiş MKH'lerin normal MKH'lere göre 0,8,16 ve 24. saatteki yara alanlarının karşılaştırmalı grafiği.

4.12. Fibrozis Modeli Oluşturulması ve Kokültür Deneyleri Sonuçları

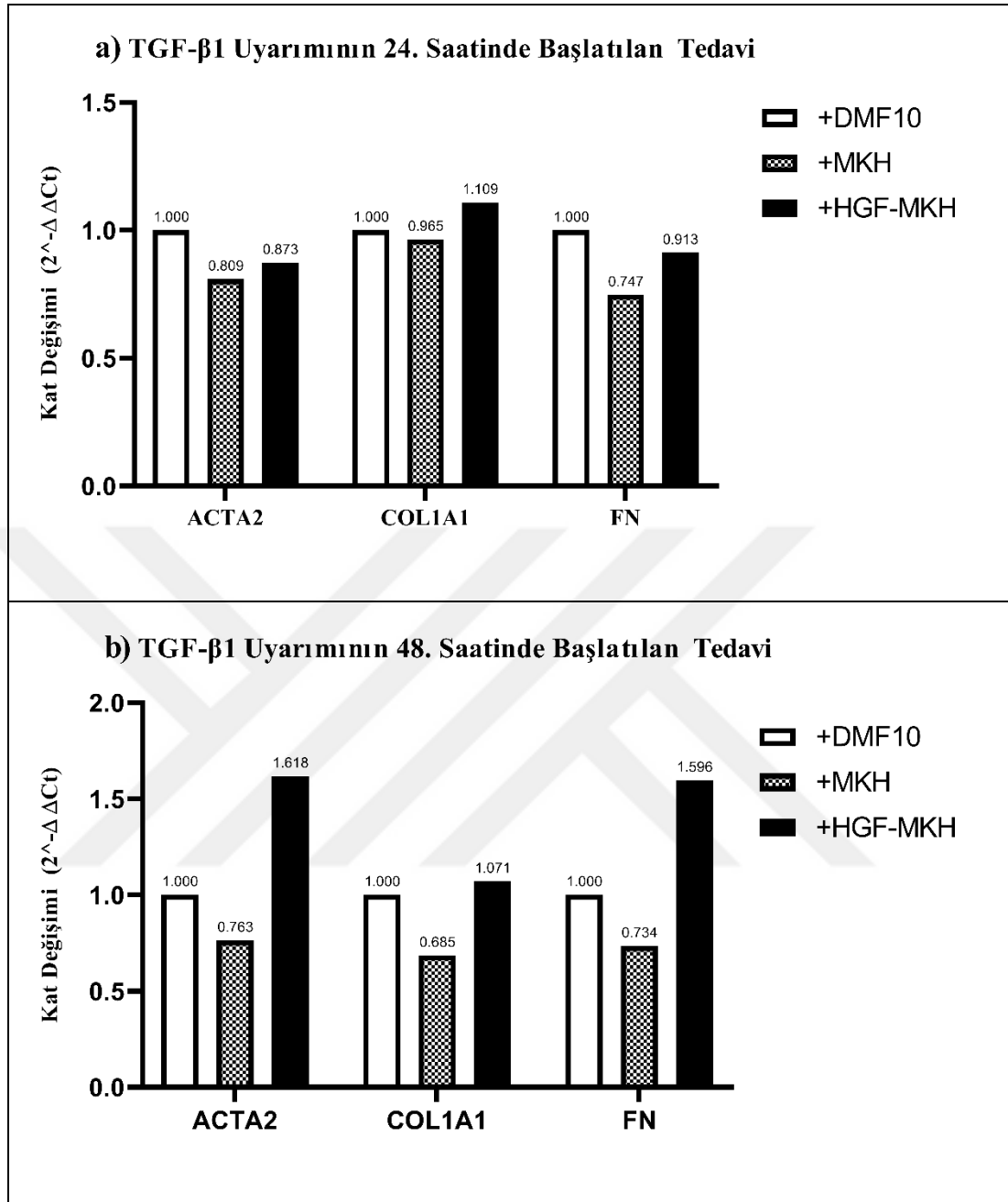
Farklı saatlerde TGF- β 1 uyarımı sonucunda toplanan RNA'larla yürütülen RT-qPCR sonuçlarına göre fibrozis modelinin oluşması için en uygun sürenin 48 saat olduğu saptandı (Şekil 4.17). RT-qPCR sonucu elde edilen Ct değerleri Tablo 4.10'da verildi.



Şekil 4.17. TGF- β 1 ile farklı saatler boyunca uyarılmış KI-MKH'lerde ACTA2, COL1A1 ve FN genleri için $-\Delta$ Ct değerleri.

TGF-beta uyarımının 48 saatlik kültürlerinden total RNA izolasyonu 500 ng ile cDNA sentezini olanaklı kılmış olduğundan 48 saat için sağlıklı bir değerlendirme yapılamamıştır. Ancak diğer uyarım sürelerindeki 1000 ng'lık total RNA'dan sentezlenen cDNA ile yapılan referans genlerin Ct değerlerinin benzer olması nedeniyle normalize deltaCt değerleri ile yapılan değerlendirme fibrozis

belirteçlerindeki artışın en fazla 48.saatte olduğunu düşündürmüştür. Sonrasında oluşturulmuş olan bu *in-vitro* fibrozis modeli üzerinde yürütülen kokültür deneylerinde ise bu gen ifadelerinin azalışına sebep olup olmayacağını ve HGF-MKH'lerin MKH'lere göre daha etkin bir iyileşmeye sebep olup olmayacağı sorusunu cevaplamak için *transwell* sistemler ile üç grupta deneyler gerçekleştirdik: TGF- β 1 ile uyarılmış MKH üzerine konulan transwell üzerine 1) standart kültür ortamında çoğaltılan MKH'nın ekildiği MKH tedavi grubu (TGF- β 1+MKH), 2) HGF ile lisanlanmış MKH'lerin ekildiği HGF-MKH tedavi grubu (TGF- β 1+HGF-MKH) ve 3) DMF10 eklenen tedavi kontrol grubu (TGF- β 1 +DMF10). TGF-b uyarımı sonrası iki farklı zaman diliminde başlatılan 24 saatlik ko-kültür sonrasında transwell altındaki hücrelerden total RNA izole edilerek RT-qPCR ile *ACTA2*, *COL1A1* ve *FN* gen ifadeleri kat değişim analizleri ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre HGF ile lisanlanmış MKH'lerin, normal MKH'lere göre fibrozis belirtici olan *ACTA2*, *COL1A1* ve *FN* ifadelenme düzeylerini değiştirme açısından avantajlı olmadığı görülmektedir (Şekil 4.18). Ve hatta TGF- β 1 uyarımının 48 saatinde lisanlanmamış MKH tedavi grubunda *ACTA2*, *COL1A1* ve *FN* ifadeleri kontrol grubuna göre düşerken HGF-MKH tedavi grubunda ise *ACTA2* ve *FN* düzeyleri belirgin artış göstermekteydi.



Şekil 4.18. 10 ng/mL TGF- β 1 uyarımının 24. saatinde (a) ve 48. saatinde (b) başlatılan kokültür deneylerinde ACTA2, COL1A1 ve FN ifade düzeyleri. Bütün kokültürler 24 saat boyunca sürdürüldü.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında MKH'ler HGF ile lisanslanarak değişen miRNA ifadeleri ile lisanslamanın MKH'lerin antifibrotik özelliğine etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca, MKH'ler ile TGF- β indüksiyonu ile *in-vitro* fibrozis modeli oluşturularak HGF ile lisanslamanın fibrozis üzerindeki etkisi ko-kültür ortamında değerlendirilmiştir. Lisanslama değerlendirmeleri; fibrozis odaklı miRNA paneli ile RT-qPCR düzeyleri, hücrelerde popülasyon ikiye katlanma ve yara iyileşme potansiyelinin incelenmesi ile standart kültür ortamında çoğaltılan MKH'ler ile karşılaştırmalı gerçekleştirilmiştir.

Görece düşük RNA konsantrasyonu ile sentezlenen cDNA ile yapılan RT-qPCR profillemesinde (Çalışma 1) ifadesi HGF indüksiyonu ile 11.81 kat artmış olan hsa-mir-223-3p'nin, daha yüksek RNA konsantrasyonu ile sentezlenen cDNA ile yapılan RT-qPCR profillemesinde (Çalışma 2) aynı miRNA'nın ifadesinde değişiklik saptanamamıştır (birinci çalışmada MKH'de Ort. Ct 36,25 iken HGF-MKH'de 32,69 olup ikinci çalışmada sırası ile Ort. Ct 32,13 ve 32,00'dir). Benzer şekilde, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-211-5p, hsa-miR-375-3p ve hsa-miR-661'de birinci çalışmadaki saptanan kat değişimleri ikinci çalışmada azalmış veya kaybolmuştur (Tablo 4.7). Bu durum düşük miktarda RNA ile çalışıldığında Roche LightCycler 480-II cihazının ve RT-qPCR yönteminin bir limitasyonu olarak değerlendirilmiştir. 33. siklattan sonra ışığa vermiş olan miRNA'ların Ct değerleri yanıltıcı olabilmektedir (71). Bununla beraber, miRNA'ların total RNA içerisinde 1/10000 oranında bulunuyor olması da (78) bazı miRNA ifadelerinin görece düşük RNA konsantrasyonlarında saptanamamasının sebebi olabilir. Her iki çalışmada da U6SnRNA kat değişimi benzer bulunmuştur (Çalışma 1'de 2,69 kat ifade artışı, Çalışma 2'de 2,19 kat ifade artışı). İfade düzeylerinin yüksek olması nedeniyle çoğu çalışmada normalizasyon için referans gen olarak kullanılan U6SnRNA, HGF indüksiyonu ile değişmekte olduğundan bizim çalışmamızda referans gen olarak kullanılmamıştır. Yüksek ifade olan miRNA'ların (Örn: hsa-miR-21-5p için MKH Ort. Ct birinci çalışmada 16.54'ten 12.98'e ve HGF-MKH için Ort. Ct birinci çalışmada 16.24'ten 13.61'e, hsa-miR-125-5p için MKH Ort. Ct birinci çalışmada 17.31'den 13.97'ye ve HGF-MKH için Ort. Ct birinci çalışmada 17.14'ten 14.54'e

gerilemiştir) gerçek zamanlı PCR reaksiyonunun başlangıç RNA konsantrasyonunun 4 µg'a çıkması ile inhibe olmadığını göstermesi açısından bu bulgumuz da dikkate değerdir.

Tüm bu gerekçeler ve sonuçlar, 4000 ng total RNA'dan sentezlenen ve 1/40 oranında dilüe edilen cDNA ile yapılan çalışmadaki (çalışma 2) sonuçların daha güvenilir olduğunu işaret etmektedir. Bu nedenle ilk çalışmada 11,81 kat ifade artışı görülen hsa-miR-223-3p, 2.36 kat ifade artışı görülen hsa-miR-5011-5p ve 2.06 kat ifade artışı görülen hsa-miR-661'deki değişimlerin, cihaz veya yöntem limitasyonu sebebiyle yanıltıcı olabileceği değerlendirilmiştir.

4000 ng total RNA'dan sentezlenen ve 1/40 oranında dilüe edilen cDNA ile gerçekleştirilen RT-qPCR'da HGF lisanslaması ile Kİ-MKH'lerde artış gösteren hsa-miR-32-5p'nin bazı hasar modellerinde arttığı raporlanmıştır. Farelerde streptozodisin ile oluşturulan diabetik nefropati (DN) böbrek hasar modelinde ve *in-vitro* olarak yüksek dozda glikoz ile muamele edilmiş insan böbrek proksimal epitelyal (HK-2) hücrelerinde miR-32-5p ifadesinin yüksek olduğu gösterilmiştir. miR-32-5p-5p ifadesinin baskılanması, hedefi olan SMAD7'nin ifadesini artırmış ve HK-2 hücrelerinde yüksek glikozun sebep olduğu otofaji baskılanmasını, fibrozisi, EMT'yi ve inflamasyonu hafifletmiştir. Bu bulgular DN hastalığında hsa-miR-32-5p'nin EMT ve fibrosis sürecinde önemli rol oynadığına işaret etmektedir (79).

4000 ng total RNA'dan sentezlenen ve 1/40 oranında dilüe edilen cDNA ile gerçekleştirilen RT-qPCR'da değişim gösteren diğer miRNA ise hsa-miR-10a-5p'dir ve HGF lisanslaması ile MKH'lerde ifadenmesi 2.14 kat azalmıştır. hsa-miR-10a-5p, SMAD7'yi hedefleyerek TGF-β yolağının çalışmasına yardımcı olmaktadır (80). 40 adet 8 haftalık dişi C57BL6/J faresinde oluşturulan karaciğer fibrosis modeli üzerinde incelenen örneklerde, hepatik fibrosis gelişen farelerde miR-10a-5p ifadenmesinin daha yüksek olduğu, ayrıca hepatik fibrosis oluşturulan grup için yapılan *in-vitro* çalışmalarda miR-10a-5p *mimic* transfekte edilen hücrelerde TGF-β1 ifadesinin arttığı ve SMAD7 ifadesinin azaldığı RT-qPCR metodu ile gösterilmiştir. Çalışmamızda ise insan Kİ-MKH'lerde HGF uyarımı, hsa-miR-10a-5p ifadesini yarı yarıya azaltmıştır. Bu sonuç HGF lisanslamasının MKH'leri anti-fibrotik kimliğe doğru yönlendirdiğine dair bir işaret olabilir. miR-10a-5p ifadesindeki artış;

eklemlerde zaman içinde meydana gelen kireçlenme, hasar ve yıpranma olarak tanımlanan ve eklemlerde meydana gelen fibrozisin de katkı sağladığı osteoartrit (OA) gelişimini de hızlandırmaktadır (81). Hedeflediği genlerden olan HOXA3'ü baskılayarak osteoartrit gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada OA örneklerinden elde edilen örneklerin transkriptom verileri ile insan kıkırdak hücrelerinde zorlanmış hsa-miR-10a-5p ifadelenmesi ile ifadesi değişen genler karşılaştırıldığında hsa-miR-10a-5p'deki ifade artışından etkilenen genlerin PPAR yolağı, PI3K-Akt yolağı ve p53 yolağında rol oynadığı saptanmıştır. HGF uyarımında ise yarı yarıya ifadesi azalan miR-10a-5p için bu sonuçlar ışığında, OA tedavisi için de HGF'nin veya HGF ile lisanslanmış MKH'ların kullanıldığı yeni yaklaşımlar geliştirilebilir.

HGF uyarımı ile MKH'lerde ifadesi 2'nin üzerinde değişen bir diğer miRNA ise 2,23 kat ifade artışı ile hsa-miR-377-3p'dir. Birçok gen ve miRNA ile etkileşimi olan hsa-miR-377-3p'nin enflamasyon, hipoksi ve anjiyogenez ile ilişkili genleri hedefleyerek miyokardiyal rejenerasyona katkı sağladığını gösterildiği çalışmalar mevcuttur (82-84). Over kanserinde hsa-miR-377-3p'nin Wnt/ β catenin yolağını ve EMT sürecini inhibe ediyor olduğunun gösterilmesi, hastalığın tedavisinde kullanılacak terapötik bir ajan olarak hsa-miR-377-3p'nin önerilmesine yol açmıştır.

8 haftalık erkek C57BL/6 farelerinde lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan akut akciğer hasarında (ALI) modeli üzerinde insan göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinin eksozomlarının enflamasyonu baskılayarak hastalığı iyileştirdiği gösterilmiştir (85). İleri çalışmalarda eksozomlardaki miR-377-3p'nin, mTOR kompleksinin düzenleyici proteini olan RPTOR'u hedefleyerek otofajiyi tetiklediği, ve böylece miR-377-3p ifade eden eksozomların verilmesinin ya da RPTOR'un susturulmasının ALI tedavisi için önemli bir tedavi olduğu öne sürülmüştür. Bu bulgular HGF ile lisanslanmış insan Kİ-MKH'lerinin ALI modelinde iyileştirici etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

SMURF1 proteini, SMAD7 ile iş birliği içerisinde çalışarak TGFBR1'i übikütinler ve yıkmak üzere hedefler. Böylece TGF- β yolağına antagonist çalışmaktadır (86). Ayrıca BMP yolağı için de önemli SMAD'lar olan SMAD1 ve

SMAD5'in übikütinlenmesi ve degradasyonundan da sorumludur. Çalışmamızda bu geni baskılayan hsa-miR-32-5p ve hsa-miR-377-3p ifadesi artarken hsa-miR-10a-5p ifadesindeki düşüş; bize SMURF1'in regülasyonunda kurulu bir denge olduğunu düşündürdü. Daha kesin yargılarla beyanda bulunabilmek için; HGF uygulaması ardından SMURF1 ifadesindeki değişime bakılmalı veya söz konusu miRNA'ların mimic ve inhibitörleriyle ayrı ayrı yapılacak uygulamalar sonucunda SMURF1 ifadelenmesi incelenmelidir. Eğer MKH'lerde HGF uygulaması ile SMURF1 ifadelenmesi artıyor ise bu da HGF'nin anti-fibrotik çalıştığına bir işaret olabilir. Fakat SMURF1 geni hem TGF- β yolağı için, hem de TGF- β yolağına antagonist çalışan BMP yolağı için negatif regülatör olduğundan dolayı, bu tez çalışmasında yapılan deneyler ışığında SMURF1 hakkında net çıkarımlar yapmak kolay değildir.

Bu 3 miRNA'nın WNT yolağı üzerindeki ortak hedeflerinden FZD4 (*Frizzled Class Reseptor 4*), WNT sinyalleme için önemli bir reseptördür (87). FZD4'ün hedeflenerek inhibe edilmesi kanonik WNT yolağını, *planar cell polarity (PCP)* yolağını ve Ca^{+2} üzerinden ilerleyen yolağın aktivitesinin düşmesi anlamına gelmektedir. Yolağın daha aşağı kısımlarında ise CCND1'in inhibisyonu hücre döngüsünün sekteye uğraması anlamına gelebilir. Aynı genleri hedefleyen bu üç farklı miRNA'dan hsa-miR-32-5p ve hsa-miR-377-3p'nin ifadesi HGF ile artarken, hsa-miR-10a-5p'nin ifadesi yarı yarıya azalmaktadır. Dolayısıyla aynı genleri hedefleyen miRNA'lardan bazılarının ifadesi artarken bazılarının azalış yönünde değişimi, hücre homeostazın korunması için önemli bir faktör olabilir.

NF2 geni, *Moesin-Ezrin-Radixin Like (MERLIN) Tumor Suppressor* olarak da bilinmektedir ve önemli tümör baskılayıcı yolaklardan olan Hippo yolağının düzenleyicilerinden biridir ve iyi bilinen bir tümör baskılayıcıdır (88, 89). NF2 mutasyonu durumunda sinir sisteminde birçok tümör oluşmasına sebebiyet veren Tip-2 nörofibromatozis hastalığı kendini gösterir. NF2, PI3K-AKT-mTOR yolağını baskılayarak hücre büyümesini ve proliferasyonu zayıflatır (90). Bu yolaklar da fibrozis oluşumu ve gelişiminde rol oynayan mekanizmalardandır. HGF uygulanmış MKH'lerin proliferasyonunun azalması ve popülasyon ikiye katlanma sürelerinin artması, HGF lisanslamasının bu yolaklar için negatif düzenleyici olduğuna bir işaret olabilir.

Gelecek çalışmalarımızda bu miRNA'ların etkilerini *in-vitro* fibrozis modelinde test etmek için literatür bilgisine dayanarak (91-93) MKH TGF- β 1 uyarımı ile fibrozis belirteçlerini RT-qPCR ile değerlendirdik. TGF- β 1 indüksiyonu ile ifade değişimlerini incelediğimiz α -SMA, COL1A1 ve FN genlerinde en uygun fibrozis modelinin 10 ng/mL TGF- β 1 ile 48. saatte oluştuğunu gördük (bkz. Şekil 4.17). Literatürde incelenen çalışmalarda meydana gelen kat değişimlerine göre α -SMA'da dramatik bir ifade artışı saptadık. HGF'nin anti-fibrotik davrandığına dair literatürde çeşitli modellerle gösterilmiş çalışmaların (94-96) aksine kokültür deneylerimizde HGF ile lisanslanan MKH'ler; TGF- β 1 indüksiyonunun oluşturduğu fibrotik manzarayı geriye çevirmemiş, aksine desteklemiş görünmektedir. Fibrotik mikroçevre altında HGF ile lisanslanan MKH'lerin antifibrotik özelliğinin bozulabileceğini düşündüren bu bulgumuzun aydınlatılması için, transwell üzerinde kalan lisanslanmış MKH'ler üzerinde miRNA ve hedef genlerimizin incelenmesine yönelik çalışmaların gerekliliği doğmuştur. Ayrıca *in-vitro* fibrozis modelinin ve ko-kültürler sonrası fibrozisin geri dönüşüp dönüşmediğine dair daha ileri hüresel ve moleküler fonksiyonel testler ile karakterizasyonların yapılması da gereklidir ve bu yönde çalışmalarımız devam etmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında HGF ile lisanslamanın MKH'lerin anti-fibrotik özellikleri üzerine etkisi tek boyutta miRNA profillemeye ile ve oluşturulan *in-vitro* fibrozis modeli ile ko-kültür deneylerinde iki boyutta değerlendirilmiştir.

Fibrozisin oluşumu ve ilerleyişi süreçlerinde miRNA'ların etkisi yadsınamaz. Bazı miRNA'lar fibrozise katkı sağlarken (fibrotik) bazılarının ise fibrozisi düzenleyici mekanizmalar üzerinde inhibe edici etkileri mevcuttur (anti-fibrotik). Son yıllarda birçok kanser türü dahil çok çeşitli hastalıklarda miRNA ifade profilleri incelenmekte olup, hastalıkların ön tanısında etkin bir biçimde kullanılmaktadır. Hücre dışı veziküller ile taşınıyor olmalarının yanı sıra aşırı-ifadelerinin ya da susturulmalarının hücrede direkt transkripleri hedefliyor olması, miRNA'ların terapötik kullanım için önemli oyuncuların olmalarını sağlamaktadır. HGF'nin fibrozis üzerinde hafifletici bir etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışma ise HGF ile lisanslanan MKH'lerin fibrozis ile ilişkili miRNA ifadelerini nasıl değiştirdiği sorusunu cevaplamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. HGF uyarımı ile ifadenin 2 katın üzerinde değişen 3 miRNA saptandı. Bunlardan ikisinde ifade artışı gözlenirken (miR-32-5p ve miR-377-3p) bir tanesinde ifade azalışı (miR-10a-5p) saptandı. Değişen bu üç miRNA'nın hedefinin NF2 olması nedeniyle HGF ile lisanslanan MKH'lerin nörofibromatozis etkilerinin incelenmesinin önemli bilgiler verebileceğini düşünmekteyiz. Fonksiyonel zenginleştirme analizleri sonucunda HGF uyarımının anti-fibrotik yöne yatkın olduğu görülmektedir ve gelecek çalışmalar için tasarlanacak deneylerle bu bulguların doğruluğu değerlendirilebilir. HGF ile ifadesi yükselen anti-fibrotik miRNA'lar ya da ifadesi düşen fibrotik miRNA'lar, fibrozis tedavisinde HGF'nin ve HGF ile uyarılmış MKH'lerin bir aday olabileceğini işaret etmektedir.

HGF lisanslaması, MKH'lerin canlılığına anlamlı bir etki göstermedi. Yara iyileşmesi deneyinde ise HGF-MKH grubu MKH grubuna göre yara alanını daha hızlı kapattı. TGF- β 1 ile uyarılmış MKH'ler üzerine tedavi uygulanan ko-kültür deneylerinde α -SMA, COL1A1 ve FN ifadelerine bakıldığında HGF-MKH grubu etkin görünmese de fibrozis modeli optimize edildikten sonra deney tekrarları yapılacaktır. Bu çalışma HGF-fibrozis aksisinin miRNA'lar üzerinden yürüyen

mekanizmalarının aydınlatılması için bir giriş niteliğinde olup gelecekte tasarlanacak modeller ve deneyler için ön bulgular elde etmemizi sağlamıştır.

Ayrıca, RT-qPCR için total RNA optimizasyon çalışmaları, miRNA'ların tüm RNA popülasyonunda çok düşük düzeyde bulunması ve PCR cihazının limitasyonu nedeniyle, özellikle induksiyon etkisine bağlı miRNA ifade düzeylerindeki değişimin değerlendirilmesi amaçlanan çalışmalarda 4000 ng gibi yüksek düzeyde total RNA konsantrasyonlarının daha güvenilir sonuçlar verdiğini göstermektedir. hsa-miR-211-5p ve hsa-miR-325 için 800 ng ve 4000 ng total RNA ile cDNA sentezi yapılan çalışmalar arasında görülen farklı sonuçlar da buna örnektir. MKH'lerde ifadesi saptanmayıp HGF uyarımı ile saptanabilir seviyelere gelen ya da MKH grubunda ifadesi olup HGF uyarımı ile kaybolan miRNA'lar dikkate değer olup ileri çalışmalarda bu miRNA'ların ifade düzeylerinin detaylı incelenmesi gereklidir. RT-qPCR ile miRNA gen ifade düzeyi araştırma çalışmalarında mümkün olabildiğince yüksek düzeyde total RNA kullanılması önerilir.

HGF ile lisanslanan MKH'lerde ve ko-kültürlerde, yolak analizlerinde ifadesi değişen miRNA'ların hedefi olarak saptanan genlerin ifade düzeylerinin incelenmesi gelecek çalışmalarda önerilir. miRNA hedef genlerinin kesişim kümeleri yerine birleşim kümeleri ile zenginleştirme analiz çalışmaları da önemli olabilecek ek bilgiler sağlayabilir. Ayrıca miRNA kat değişim eşliğini 2'den 1.5'e indirerek analizlerin tekrarlanması daha fazla fonksiyonel bilgi verebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells Int.* 2012;2012:461718.
2. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research.* 1991;9(5):641-50.
3. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
4. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4):393-403.
5. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.
6. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2009;66(2):236-53.
7. Ranera B, Remacha AR, Álvarez-Arguedas S, Castiella T, Vázquez FJ, Romero A, et al. Expansion under hypoxic conditions enhances the chondrogenic potential of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *The Veterinary Journal.* 2013;195(2):248-51.
8. El Agha E, Kramann R, Schneider RK, Li X, Seeger W, Humphreys BD, et al. Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. *Cell Stem Cell.* 2017;21(2):166-77.
9. Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S. Therapy for Fibrotic Diseases: Nearing the Starting Line. *Science Translational Medicine.* 2013;5(167):167sr1-sr1.
10. Gibb AA, Lazaropoulos MP, Elrod JW. Myofibroblasts and Fibrosis: Mitochondrial and Metabolic Control of Cellular Differentiation. *Circ Res.* 2020;127(3):427-47.
11. Henderson NC, Rieder F, Wynn TA. Fibrosis: from mechanisms to medicines. *Nature.* 2020;587(7835):555-66.
12. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G. The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins. *The American Journal of Pathology.* 2007;170(6):1807-16.
13. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, et al. Recent Developments in Myofibroblast Biology: Paradigms for Connective Tissue Remodeling. *The American Journal of Pathology.* 2012;180(4):1340-55.
14. Grupp C, Troche I, Klass C, Köhler M, Müller GA. A novel model to study renal myofibroblast formation in vitro. *Kidney Int.* 2001;59(2):543-53.

15. Hoyles RK, Derrett-Smith EC, Khan K, Shiwen X, Howat SL, Wells AU, et al. An essential role for resident fibroblasts in experimental lung fibrosis is defined by lineage-specific deletion of high-affinity type II transforming growth factor β receptor. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(2):249-61.
16. Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, et al. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol*. 1999;276(4):G1059-68.
17. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab*. 2000;71(1-2):418-35.
18. Moustakas A, Heldin CH. Mechanisms of TGF β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Clin Med*. 2016;5(7).
19. Levy O, Kuai R, Siren EMJ, Bhere D, Milton Y, Nissar N, et al. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. *Science Advances*. 2020;6(30):eaba6884.
20. Ullah I, Subbarao Raghavendra B, Rho Gyu J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*. 2015;35(2).
21. Zhou T, Yuan Z, Weng J, Pei D, Du X, He C, et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *Journal of Hematology & Oncology*. 2021;14(1):24.
22. Noronha NdC, Mizukami A, Caliári-Oliveira C, Cominal JG, Rocha JLM, Covas DT, et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10(1):131.
23. te Boome LCJ, Mansilla C, van der Wagen LE, Lindemans CA, Petersen EJ, Spierings E, et al. Biomarker profiling of steroid-resistant acute GVHD in patients after infusion of mesenchymal stromal cells. *Leukemia*. 2015;29(9):1839-46.
24. Petrou P, Gothelf Y, Argov Z, Gotkine M, Levy YS, Kassis I, et al. Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials. *JAMA Neurology*. 2016;73(3):337-44.
25. Menasché P, Hagege AA, Vilquin J-T, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41(7):1078-83.
26. Samarelli AV, Tonelli R, Heijink I, Martin Medina A, Marchioni A, Bruzzi G, et al. Dissecting the Role of Mesenchymal Stem Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Cause or Solution. *Front Pharmacol*. 2021;12:692551.
27. Javed A, Karki S, Sami Z, Khan Z, Shree A, Sah BK, et al. Association between Mesenchymal Stem Cells and COVID-19 Therapy: Systematic Review and Current Trends. *Biomed Res Int*. 2022;2022:9346939.
28. Matthay MA. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells for acute respiratory distress syndrome. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12 Suppl 1(Suppl 1):S54-7.

29. SAHAN OB. OA. Empowered Mesenchymal Stem Cells with Enhanced Regenerative Capacity. *Türkiye Klinikleri*. 2021;Özel Sayı(Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp):26-33.
30. Li D, Liu Q, Qi L, Dai X, Liu H, Wang Y. Low levels of TGF- β 1 enhance human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell fibronectin production and extend survival time in a rat model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Mol Med Rep*. 2016;14(2):1681-92.
31. Lopatina T, Favaro E, Grange C, Cedrino M, Ranghino A, Occhipinti S, et al. PDGF enhances the protective effect of adipose stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute hindlimb ischemia. *Scientific Reports*. 2018;8(1):17458.
32. El Agha E, Moiseenko A, Kheirollahi V, De Langhe S, Crnkovic S, Kwapiszewska G, et al. Two-Way Conversion between Lipogenic and Myogenic Fibroblastic Phenotypes Marks the Progression and Resolution of Lung Fibrosis. *Cell Stem Cell*. 2017;20(2):261-73.e3.
33. Plikus MV, Guerrero-Juarez CF, Ito M, Li YR, Dedhia PH, Zheng Y, et al. Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science*. 2017;355(6326):748-52.
34. Crestani B, Marchand-Adam S, Quesnel C, Plantier L, Borensztajn K, Marchal J, et al. Hepatocyte growth factor and lung fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2012;9(3):158-63.
35. Dohi M, Hasegawa T, Yamamoto K, Marshall BC. Hepatocyte growth factor attenuates collagen accumulation in a murine model of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(6):2302-7.
36. Yaekashiwa M, Nakayama S, Ohnuma K, Sakai T, Abe T, Satoh K, et al. Simultaneous or delayed administration of hepatocyte growth factor equally represses the fibrotic changes in murine lung injury induced by bleomycin. A morphologic study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(6):1937-44.
37. Xu J, Yu TT, Zhang K, Li M, Shi HJ, Meng XJ, et al. HGF alleviates renal interstitial fibrosis via inhibiting the TGF- β 1/SMAD pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(22):7621-7.
38. Nie WB, Zhang D, Wang LS. Growth Factor Gene-Modified Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:1241-56.
39. Saeedi P, Halabian R, Imani Fooladi AA. A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies. *Stem Cell Investig*. 2019;6:34.
40. Lai L, Chen J, Wei X, Huang M, Hu X, Yang R, et al. Transplantation of MSCs Overexpressing HGF into a Rat Model of Liver Fibrosis. *Mol Imaging Biol*. 2016;18(1):43-51.
41. Chen S, Chen X, Wu X, Wei S, Han W, Lin J, et al. Hepatocyte growth factor-modified mesenchymal stem cells improve ischemia/reperfusion-induced acute lung injury in rats. *Gene Ther*. 2017;24(1):3-11.
42. Patel V, Nouredine L. MicroRNAs and fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21(4):410-6.

43. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231-5.
44. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, et al. A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery. *Science*. 2009;326(5957):1275-9.
45. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402.
46. Broughton James P, Lovci Michael T, Huang Jessica L, Yeo Gene W, Pasquinelli Amy E. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Molecular Cell*. 2016;64(2):320-33.
47. Vasudevan S. Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. *WIREs RNA*. 2012;3(3):311-30.
48. Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, Lange T, Samatov TR, Turchinovich AA, et al. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 2016;51(3):33-49.
49. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine*. 2014;20(8):460-9.
50. Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, et al. Interplay between miRNAs and human diseases. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(3):2007-18.
51. Tüfekci KU, Öner MG, Meuwissen RLJ, Genç Ş. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. In: Yousef M, Allmer J, editors. *miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis*. Totowa, NJ: Humana Press; 2014. p. 33-50.
52. Hade MD, Suire CN, Suo Z. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Applications in Regenerative Medicine. *Cells*. 2021;10(8):1959.
53. Ghafouri-Fard S, Abak A, Talebi SF, Shoorei H, Branicki W, Taheri M, et al. Role of miRNA and lncRNAs in organ fibrosis and aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;143:112132.
54. Yuan X, Pan J, Wen L, Gong B, Li J, Gao H, et al. MiR-144-3p Enhances Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction by Targeting PTEN. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019;7.
55. O'Reilly S. MicroRNAs in fibrosis: opportunities and challenges. *Arthritis Research & Therapy*. 2016;18(1):11.
56. Cagnan I, Keles M, Keskus AG, Tombaz M, Sahan OB, Aerts-Kaya F, et al. Global miRNA expression of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells derived from Fanconi anemia patients. *Hum Cell*. 2022;35(1):111-24.
57. Oliveros JC. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. 2007-2015 [Available from: <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>].
58. Inc LR. MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit - Mycoplasma Detection Assay

59. Valente S, Ciavarella C, Pasanisi E, Ricci F, Stella A, Pasquinelli G. Hepatocyte Growth Factor Effects on Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Arteries: A Novel Strategy to Accelerate Vascular Ulcer Wound Healing. *Stem Cells Int.* 2016;2016:3232859.
60. Koetsier G. CE. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers 2019. Available from: https://www.neb.com/en/-/media/nebus/files/application-notes/technote_mvns_analysis_of_nucleic_acid_concentration_and_purity.pdf?rev=c24cea043416420d84fb6bf7b554dbbb.
61. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
62. Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife.* 2015;4:e05005.
63. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D127-d31.
64. Hsu SD, Lin FM, Wu WY, Liang C, Huang WC, Chan WL, et al. miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D163-9.
65. Chem C. WST-1 Cell Proliferation Assay Kit. In: Chem C, editor. 2016.
66. Lotfy A, Salama M, Zahran F, Jones E, Badawy A, Sobh M. Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Int J Stem Cells.* 2014;7(2):135-42.
67. Suarez-Arnedo A, Torres Figueroa F, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS One.* 2020;15(7):e0232565.
68. Midgley AC, Duggal L, Jenkins R, Hascall V, Steadman R, Phillips AO, et al. Hyaluronan regulates bone morphogenetic protein-7-dependent prevention and reversal of myofibroblast phenotype. *J Biol Chem.* 2015;290(18):11218-34.
69. Nakayama T, Okada N, Yoshikawa M, Asaka D, Kuboki A, Kojima H, et al. Assessment of suitable reference genes for RT-qPCR studies in chronic rhinosinusitis. *Sci Rep.* 2018;8(1):1568.
70. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
71. Ana María García Marín GAGS. Evaluating qPCR cycle threshold (Ct) as a predictive value of sequencing quality 2020 [Available from: <https://seqcovid.csic.es/evaluating-qpcr-cycle-threshold-ct-as-a-predictive-value-of-sequencing-quality/>].
72. Qiagen. RT2 qPCR Assay Data Analysis 1808 2018 [Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=e08404c0-31e5-4e2f-8daf-c5c651bebf38&lang=en>].

73. Yavropoulou MP, Vaios V, Makras P, Georgianos P, Batas A, Tsalikakis D, et al. Expression of Circulating MicroRNAs Linked to Bone Metabolism in Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder. *Biomedicines*. 2020;8(12):601.
74. Terzuoli E, Donnini S, Finetti F, Nesi G, Villari D, Hanaka H, et al. Linking microsomal prostaglandin E Synthase-1/PGE-2 pathway with miR-15a and -186 expression: Novel mechanism of VEGF modulation in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;7(28):44350-64.
75. Li JH, Liu S, Zhou H, Qu LH, Yang JH. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D92-7.
76. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*. 2003;34(3):267-73.
77. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(43):15545-50.
78. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics*. 2012;13(5):358-69.
79. Wang HJ, Liu H, Lin YH, Zhang SJ. MiR-32-5p knockdown inhibits epithelial to mesenchymal transition and renal fibrosis by targeting SMAD7 in diabetic nephropathy. *Hum Exp Toxicol*. 2021;40(4):587-95.
80. Zhou G, Lin W, Fang P, Lin X, Zhuge L, Hu Z, et al. MiR-10a improves hepatic fibrosis by regulating the TGF β 1/Smads signal transduction pathway. *Exp Ther Med*. 2016;12(3):1719-22.
81. Li HZ, Xu XH, Lin N, Wang DW, Lin YM, Su ZZ, et al. Overexpression of miR-10a-5p facilitates the progression of osteoarthritis. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(7):5948-76.
82. Wen Z, Huang W, Feng Y, Cai W, Wang Y, Wang X, et al. MicroRNA-377 regulates mesenchymal stem cell-induced angiogenesis in ischemic hearts by targeting VEGF. *PLoS One*. 2014;9(9):e104666.
83. Xie M, Hu C, Li D, Li S. MicroRNA-377 Alleviates Myocardial Injury Induced by Hypoxia/Reoxygenation via Downregulating LILRB2 Expression. *Dose Response*. 2020;18(2):1559325820936124.
84. Yu R, Cai L, Chi Y, Ding X, Wu X. miR-377 targets CUL4A and regulates metastatic capability in ovarian cancer. *Int J Mol Med*. 2018;41(6):3147-56.
85. Wei X, Yi X, Lv H, Sui X, Lu P, Li L, et al. MicroRNA-377-3p released by mesenchymal stem cell exosomes ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting RPTOR to induce autophagy. *Cell Death & Disease*. 2020;11(8):657.

86. Yan X, Zhang J, Pan L, Wang P, Xue H, Zhang L, et al. TSC-22 Promotes Transforming Growth Factor β -Mediated Cardiac Myofibroblast Differentiation by Antagonizing Smad7 Activity. *Molecular and Cellular Biology*. 2011;31(18):3700-9.
87. Yang S, Wu Y, Xu TH, de Waal PW, He Y, Pu M, et al. Crystal structure of the Frizzled 4 receptor in a ligand-free state. *Nature*. 2018;560(7720):666-70.
88. McClatchey AI, Giovannini M. Membrane organization and tumorigenesis--the NF2 tumor suppressor, Merlin. *Genes Dev*. 2005;19(19):2265-77.
89. Okada T, You L, Giancotti FG. Shedding light on Merlin's wizardry. *Trends in Cell Biology*. 2007;17(5):222-9.
90. Tamura R. Current Understanding of Neurofibromatosis Type 1, 2, and Schwannomatosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(11):5850.
91. Li D, Qu J, Yuan X, Zhuang S, Wu H, Chen R, et al. Mesenchymal Stem Cells Alleviate Renal Fibrosis and Inhibit Autophagy via Exosome Transfer of miRNA-122a. *Stem Cells Int*. 2022;2022:1981798.
92. Min SK, Jung SY, Kang HK, Jo SB, Kim MJ, Min BM. MicroRNA-146a-5p Limits Elevated TGF- β Signal during Cell Senescence. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017;7:335-8.
93. Wei P, Xie Y, Abel PW, Huang Y, Ma Q, Li L, et al. Transforming growth factor (TGF)- β 1-induced miR-133a inhibits myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis. *Cell Death & Disease*. 2019;10(9):670.
94. Yang F, Deng L, Li J, Chen M, Liu Y, Hu Y, et al. Emodin Retarded Renal Fibrosis Through Regulating HGF and TGF β -Smad Signaling Pathway. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:3567-75.
95. Gharbia S, Nazarie SR, Dinescu S, Balta C, Herman H, Petcu VE, et al. Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) Supplemented with Hepatocyte Growth Factor (HGF) Attenuate Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis by Inhibiting the TGF- β /Smad Signaling Pathway in Chemical-Induced Liver Fibrosis Associated with Diabetes. *Cells*. 2022;11(21).
96. Yunus J, Salman M, Lintin GBR, Muchtar M, Sari DCR, Arfian N, et al. Chlorogenic acid attenuates kidney fibrosis via antifibrotic action of BMP-7 and HGF. *Med J Malaysia*. 2020;75(Suppl 1):5-9.

8. EKLER

EK 1. Orijinallik Raporu

HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (HGF) İLE LİSANSLANMIŞ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE ANTI-FİBROTİK miRNA İFADE DÜZEYLERİ			
ORIGINALITY REPORT			
7 %	5 %	5 %	3 %
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
1	Submitted to Manchester Metropolitan University Student Paper		3 %
2	ccb-compute2.cs.uni-saarland.de Internet Source		1 %
3	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source		1 %
4	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source		<1 %
5	avesis.hacettepe.edu.tr Internet Source		<1 %
6	S�everine Lamon, Joane Le Carr�e, Giuseppe Petito, Hong Phuoc Duong, Fran�ois Luthi,		<1 %

EK 2. Dijital Makbuz



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author:	All Berk Alişan
Assignment title:	HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (HGF) İLE LİSANSLANMIŞ MEZ...
Submission title:	HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (HGF) İLE LİSANSLANMIŞ MEZ...
File name:	HEPATOSİT_BÜYÜME_FAKTÖRÜ_HGF_İLE_LİSANSLANMIŞ_MEZ...
File size:	6M
Page count:	63
Word count:	10,762
Character count:	73,154
Submission date:	26-Jun-2024 03:52PM (UTC+0300)
Submission ID:	2408941549



9. ÖZGEÇMİŞ

