



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**DİYABETİK VE DİYABETİK OLMAYAN SIÇAN DERİ YARA
MODELİNDE PULSLU MANYETİK ALAN UYGULAMASININ
MOLEKÜLER ETKİLERİNİN DENEYSEL VE İN SİLİCO
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

YILMAZ DEMİR

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**MERSİN
TEMMUZ - 2025**

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**DİYABETİK VE DİYABETİK OLMAYAN SIÇAN DERİ YARA
MODELİNDE PULSLU MANYETİK ALAN UYGULAMASININ
MOLEKÜLER ETKİLERİNİN DENEYSEL VE İN SİLİCO
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

YILMAZ DEMİR

ORCID ID: 0000-0002-2473-0556

DANIŞMAN
PROF. DR. NURTEN ERDAL

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

MERSİN
TEMMUZ - 2025

ÖZET

DİYABETİK VE DİYABETİK OLMAYAN SIÇAN DERİ YARA MODELİNDE PULSLU MANYETİK ALAN UYGULAMASININ MOLEKÜLER ETKİLERİNİN DENEYSEL VE İN SİLİCO YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Yara, canlı dokunun bütünlüğünün bozulmasıdır. Diyabet, hiperglisemiye bağlı gelişen nöropati ve anjiyopati nedeniyle yara iyileşmesini olumsuz etkileyen sistemik bir hastalıktır. Bu durum, diyabetik bireylerde yaraların zor iyileşmesine ve yaşam kalitesinin düşmesine yol açar. Mevcut tedavi yöntemleri sınırlı başarı göstermektedir. Bu nedenle, alternatif ve tamamlayıcı tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, pulslu manyetik alanın (PMA) sağlıklı ve diyabetik sıçanlarda deri yara iyileşmesinde görev alan genler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 35 erkek Wistar-albino sıçan, her biri 7 hayvandan oluşan beş gruba ayrılmıştır: Kontrol, Non-diyabetik Sham, Diyabetik Sham, Non-diyabetik Deney ve Diyabetik Deney. Deney sonunda yara bölgesini içeren deri izole edilerek $tg\alpha$, $tnf\alpha$, $vegfa$, $nfe2$, $nf-\kappa b1$, $nf-\kappa b2$ ve $ctnnb1$ genlerinin ekspresyon düzeyleri qRT-PCR ile analiz edilmiştir. PMA uygulaması, bazı genlerin ifadesini düzenleyerek yara iyileşmesini etkileyebileceğini göstermiştir. Deneysel bulgulara ek olarak, bu genler üzerinde çok katmanlı in silico biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) veritabanı kullanılarak yapılan protein-protein etkileşim (PPI) analizinde tnf merkezli bir ağ yapısı gözlenmiş; özellikle $tnf\alpha$ ve $nf-\kappa b1$ 'in inflamasyondaki merkezi rolleri öne çıkmıştır. $ctnnb1$, $tg\alpha$ ve $nfe2$ sınırlı bağlantılar göstermiş, $vegfa$ ise ağda yer almamıştır. Ayrıca genleri hedefleyen mikroRNA'lara yönelik biyoinformatik analizlerde, literatürde tanımlanmamış yeni miRNA adayları belirlenmiştir. Bu bulgular, PMA'nın gen ekspresyonunu epigenetik düzeyde modüle etme potansiyeline işaret etmektedir. Sonuç olarak, PMA'nın diyabetik yara iyileşmesini destekleyici biyolojik etkiler sunabileceği ve tedaviye tamamlayıcı bir yöntem olarak entegre edilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus; manyetik alan; gen ekspresyonu; yara iyileşmesi; in silico analiz.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE MOLECULAR EFFECTS OF PULSED MAGNETIC FIELD APPLICATION ON DIABETIC AND NON-DIABETIC RAT SKIN WOUND MODELS BY EXPERIMENTAL AND IN SILICO METHODS

A wound is defined as the disruption of the integrity of living tissue. Diabetes is a systemic condition that negatively affects wound healing due to hyperglycemia-induced neuropathy and angiopathy. This results in delayed healing and decreased quality of life in diabetic individuals. Current treatment methods offer limited effectiveness, highlighting the need for alternative and complementary therapeutic approaches. In this study, the effects of pulsed magnetic field (PMF) on the expression of genes involved in skin wound healing were investigated in healthy and diabetic rats. Thirty-five male Wistar-albino rats were divided into five groups of seven animals each: Control, Non-diabetic Sham, Diabetic Sham, Non-diabetic Experimental, and Diabetic Experimental. At the end of the experiment, skin tissue including the wound area was isolated, and the expression levels of *tgfa*, *tnfa*, *vegfa*, *nfe2*, *nf-kb1*, *nf-kb2*, and *ctnnb1* genes were analyzed using qRT-PCR. PMF application was found to regulate the expression of certain genes involved in wound healing. In addition to the experimental findings, multi-layered in silico bioinformatics analyses were performed on these genes. Using the STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) database, the protein-protein interaction (PPI) analysis revealed a *tnf*-centered network, with *tnfa* and *nf-kb1* playing key roles in inflammatory processes. *ctnnb1*, *tgfa*, and *nfe2* showed limited connections within the network, while *vegfa* was absent—possibly due to database limitations. Additionally, bioinformatic analysis of microRNAs predicted to target these genes identified novel miRNA candidates not previously associated with diabetic wounds. These findings suggest that PMF may modulate gene expression at the epigenetic level. In conclusion, the combined evaluation of gene expression, PPI, and miRNA analyses suggests that PMF may exert multifaceted biological effects on diabetic wound healing through growth factor and inflammatory signaling pathways. Therefore, PMF has the potential to be integrated as a complementary biophysical approach in treatment protocols.

Keywords: Diabetes mellitus; magnetic field; gene expression; wound healing; in silico analysis.

TEŞEKKÜR

Lisans üstü eğitimim boyunca ve tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleriyle bana destek olan ve yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Nurten ERDAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimleriyle lisans üstü eğitimime katkıda bulunan değerli hocalarım Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Belgin BÜYÜKAKILLI ve Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na teşekkür ederim.

Moleküler çalışmalarımın planlanması ve yürütülmesinde katkılarından dolayı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarına yardımcı olan Dr. Coşar UZUN ve Dr. Kenan ÇELİK'e teşekkür ederim.

Tezin istatistiksel analizlerini yapan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı Arş. Gör. Damla Hazal SUCU'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmasına In silico analizlerle katkıda bulunan Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Tuba EDGÜNLÜ ve Biyoenformatik doktora öğrencisi Çilem ÖZDEMİR'e, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Şenay Görücü YILMAZ'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca küçük yaşına rağmen gösterdiği üstün sabır ve anlayıştan ötürü biricik kızım Defne Havin DEMİR'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2023-2-TP3-4951

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Diabetes Mellitus	3
2.2. Yara	5
2.2.1. Yaranın Sınıflandırılması	5
2.2.2. Yara İyileşmesi	6
2.2.2.1. Hemostaz Evresi	6
2.2.2.2. İnflamasyon Evresi	6
2.2.2.3. Proliferasyon Evresi	7
2.2.2.4. Maturasyon (Anjiyogenez, Remodelling) Evresi	7
2.2.3. Yara İyileşmesinde Görev Alan Bazı Genler	8
2.2.3.1. Nfe2 Geni ve Yara İyileşmesindeki Rolü	8
2.2.3.2. Tnf α Geni ve Yara İyileşmesindeki Rolü	9
2.2.3.3. Vegfa Geni ve Yara İyileşmesindeki Rolü	11
2.2.3.4. Nf- κ b1 ve Nf- κ b2 Genleri ve Yara İyileşmesindeki Roller	13
2.2.3.5. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Alfa (Tgf α) Geni ve Yara İyileşmesindeki Rolü	15
2.2.3.6. β -Katenin (Ctnnb1) Geni ve Yara İyileşmesindeki Rolü	16
2.2.4. Yara İyileşmesini Olumsuz Etkileyen Faktörler	17
2.3. Diyabette Yara İyileşmesi	17
2.3.1. Diyabette Nfe2	18
2.3.2. Diyabette Tnf α	18
2.3.3. Diyabette Vegfa	19
2.3.4. Diyabette Nf- κ b1 ve Nf- κ b2	20
2.3.5. Diyabette Tgf α	20

	Sayfa
2.3.6. Diyabette Wnt/ β -katenin	20
2.4. Diyabetik ve Non-Diyabetik Koşullarda Sinyal Yolları Arasındaki Etkileşim	21
2.4.1. Yollar Arasındaki Çapraz Etkileşimler	22
2.4.1.1. Nf- κ b $\leftrightarrow$ Tgf β Etkileşimi	22
2.4.1.2. Wnt/ β -Katenin $\leftrightarrow$ Tgf β Etkileşimi	23
2.4.1.3. Tgf β $\leftrightarrow$ MAPK Etkileşimi	23
2.4.1.4. MAPK $\leftrightarrow$ Nf- κ b Etkileşimi	23
2.5. Manyetik Alan	23
2.6. İn Silico Analizlerin Tanımı ve Kapsamı	24
2.7. İn Silico Sistem Biyolojisi Yaklaşımları	25
2.7.1. Proteomik Analizler	25
2.7.2. Protein-Protein Etkileşim (PPI) Analizleri	25
2.7.3. İşlevsel Zenginleştirme Analizleri	25
2.7.4. Biyolojik Yolakların Modellenmesi	25
2.7.5. miRNA-Hedef Gen İlişkilerinin İncelenmesi	26
2.8. İn Silico Analizlerin Kullanım Alanları	27
2.8.1. Biyobelirteç ve İlaç Hedefi Keşfi	27
2.8.2. Deneysel Verilerin Desteklenmesi ve Hipotez Geliştirme	27
2.8.3. Hastalık Mekanizmalarının Modellenmesi	27
2.8.4. İlaç Keşfi ve Toksisite Analizleri	27
2.9. İn Silico Analizlerin Güvenilirliği ve Sınırlılıkları	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM	29
3.1. Pulsu Manyetik Alan (PMA) Uygulama Prosedürü	29
3.2. Doku İzolasyonu	29
3.3. RNA İzolasyonu	30
3.4. cDNA Sentezi	30
3.5. Primer ve Prob Dizilerinin Sentezlenmesi	31
3.6. Real-Time PCR ile Ekspresyon Analizi Yöntemi (qPCR)	32
3.7. Genlere Ait Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	33
3.8. İstatistiksel Yöntemler	33
3.9. İn Silico Analiz Yöntemi	33
3.9.1. Protein-Protein Etkileşim (PPI) Analizi	34
3.9.1.1. Güve Skoru ve Yanlış Keşif Oranı Belirlenmesi	34
3.9.2. miRNA-Hedef Gen Analizi	35
3.9.2.1. Hedef Skoru Belirlenmesi	35

	Sayfa
4. BULGULAR	37
4.1. Tgfa Ekspresyon Düzeyleri	39
4.2. Vegfa Ekspresyon Düzeyleri	39
4.3. Tnfα Ekspresyon Düzeyleri	40
4.4. Nfe2 Ekspresyon Düzeyleri	40
4.5. Nf-κb1 Ekspresyon Düzeyleri	41
4.6. Nf-κb2 Ekspresyon Düzeyleri	41
4.7. Ctnnb1 Ekspresyon Düzeyleri	42
4.8. In Silico Analiz Sonuçları	42
4.8.1. Protein-Protein Etkileşim Ağı (PPI) Analizi:	42
4.8.2. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi	43
4.8.2.1. Biyolojik Süreçlerde (GO Biological Process)	43
4.8.2.2. Sinyal Yolakları (Reactome Pathways)	44
4.8.2.3. Hastalık-Gen İlişkilendirme (DISEASES Database)	45
4.9. In silico miRNA Hedefler Analiz Sonuçları	46
4.9.1. İstatistiksel Olarak Anlamlı Tespit Edilen Genlerin İfade Farklılıkları	46
4.9.2. Genler ve miRNA Hedefleri (miRDB)	48
4.9.3. Diabetes Mellitus'ta miRNA-Hedef Ağı (HMDD v4.0)	54
4.9.4. Spesifik, korunmuş miRNA Hedeflerinin Analizi (TargetScan)	55
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	72
EKLER	87
ÖZGEÇMİŞ	88

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. İn silico analizlerde yaygın olarak kullanılan veri tabanları, analiz türleri ve kullanım amaçları.	26
Tablo 3.1. cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri ve miktarları.	30
Tablo 3.2. Real-Time PCR ile ekspresyon analizlerinde kullanılan primer-prob dizileri.	31
Tablo 3.3. Real-time-PCR gen ekspresyonu için kullanılan solüsyon ve miktarları.	32
Tablo 3.4. Ekspresyon analizi yapılan genlerin her birinde kullanılan ve reaksiyonların yerini gösteren “plate” dizilimi.	33
Tablo 4.1. Grupların gen ekspresyon düzeyleri.	38
Tablo 4.2. Gen ekspresyon $2^{-\Delta\Delta ct}$ değerlerinin ortalama $\pm$ standart sapma değerleri.	47
Tablo 4.3. Genler ve miRNA hedefleri (miRDB).	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin evreleri.	6
Şekil 2.2. Yara iyileşmesinde nrf2 yolağı.	9
Şekil 2.3. Tümör nekroz faktörü-alfa (tnf α)/tnf reseptörü 1 (tnfr1) araçlı inflamatuvar yanıt ve hücre ölüm yolları.	11
Şekil 2.4. Vegfa sinyal yolları.	13
Şekil 2.5. Yara iyileşmesinde kanonik nf- κ b.	14
Şekil 2.6. Tgf α 'nın başlattığı hücre içi sinyal iletim yolları.	16
Şekil 2.7. Kanonik Wnt (Wnt/ β -katenin) sinyal yolağı.	17
Şekil 2.8. Diyabet ve yara iyileşmesinde moleküler yolak ağı.	22
Şekil 4.1. Tgf α ekspresyon düzeyleri.	39
Şekil 4.2. Vegfa ekspresyon düzeyleri.	39
Şekil 4.3. Tnf α ekspresyon düzeyleri.	40
Şekil 4.4. Nfe2l2 ekspresyon düzeyleri.	40
Şekil 4.5. Nf- κ b1 ekspresyon düzeyleri.	41
Şekil 4.6. Nf- κ b2 ekspresyon düzeyleri.	41
Şekil 4.7. Ctnnb1 ekspresyon düzeyleri.	42
Şekil 4.8. STRING veritabanı kullanılarak oluşturulan protein-protein etkileşim (PPI) ağı.	43
Şekil 4.9. Biological Process (Gene Ontology) zenginleştirme analizi sonuçlarının baloncuk grafiği.	44
Şekil 4.10. Reactome sinyal yolları zenginleştirme analizi sonuçlarının baloncuk grafiği.	45
Şekil 4.11. DISEASES veritabanına dayalı zenginleştirme analizi sonuçlarının baloncuk grafiği.	46
Şekil 4.12. Gruplara göre gen ekspresyon düzeylerinin ortalama kat değişimleri.	47
Şekil 4.13. Diyabet ile ilişkili olduğu deneysel olarak doğrulanmış miRNA'lar ve hedef genlerini gösteren ağ diyagramı.	54
Şekil 4.14. Spesifik, korunmuş miRNA hedeflerinin analizi.	55

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
AC	Alternatif Akım
ACTB	Beta Aktin
AGER	İleri Glikasyon Son Ürünleri
AKT	Protein Kinaz B
ARE	Antioksidan Yanıt Elementi
cm	santimetre
COX-2	Siklooksijenaz-2
Ctnnb1	Beta-Katenin
DAG	Diaçilgliserol
DC	Doğru Akım
DD	Diyabetik Deney
DE	Diyabetik Experiment
DM	Diabetes Mellitus
Egf	Epidermal Büyüme Faktörü
ERK	Ekstraselüler Sinyal Düzenlemeli Kinaz
FADD	Fas Associated Death Domain
G	Gauss
GATA2	Globin Transkripsiyon Faktörü Bağlayıcı Protein 2
GO	Gen Ontoloji
GTP	Guanozin Trifosfat
H	Henry
HIF-1 α	Hipoksi İle İndüklenen Faktör-1 α
HIF-1 β	Hipoksi İle İndüklenen Faktör-1 β
HIF PHD	HIF Prolin-4-Hidroksilazlar
HO-1	Hem Oksijenaz 1
Hz	Hertz
ICAM-1	Hücreler Arası Yapışma Molekülü 1
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu
IKK1	I κ B Kinaz
IL	İnterlökin
K	Kontrol
Keap1	Kelch-benzeri ECH ilişkili Protein
MAPK	Mitojenle Etkileşen Protein Kinaz
MEK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz Kinaz

Kısaltma/Simgesi	Tanım
MLKL	Miksed Soy Domeine Benzer
MMP	Matriks Metalloproteinazlar
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
mT	miliTesla
mTORC2	Mekanistik Hedef Rapamisin Kompleksi 2
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NDD	Non-diyabetik Deney
NDE	Non-Diyabetik Experiment
NDS	Non-Diyabetik Sham
Nec-1	Nekrostatin-1
NEG	Non-Enzimatik Glikolizasyon
Nfe2l2	Nükleer Faktör Eritroid 2 – İlişkili faktör 2
Nf-kb1	Nükleer Faktör NF-kappa-B 1
Nf-kb2	Nükleer Faktör NF-kappa-B 2
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
PDK1	Fosfoinozid-Bağımlı Kinaz-1
PIP2	Fosfotidilinozitol 4,5 Bifosfat
PIP3	Fosfotidilinozitol 3,4,5 Bifosfat
PKC	Protein Kinaz C
PEMA	Pulslu Elektromanyetik Alan
PMA	Pulslu Manyetik Alan
PMF	Pulsed Magnetic Field
PPI	Protein-Protein Etkileşimi
R	Direnç
RIPK1	Reseptör Etkileşimli Serin/Treonin Protein Kinaz 1
RIPK3	Reseptör Etkileşimli Protein Kinaz 3
RNA	Ribonükleik Asit
RNF43	Yüzük Parmağı 43
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RSPO	R-Spondin
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
STRING	Etkileşimli Genlerin/Proteinlerin Bilgileri için Arama Aracı
STZ	Streptozotocin
T	Tesla

Kısaltma/Simgesi	Tanım
TDF	Türk Diyabet Cemiyeti
Tgf α	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Alfa
Tgf β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
Tnf α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
Tnfr1	Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü 1
TRADD	TNFR1 ile ilişkili Ölüm Alanı Proteini
TRAF2	TNFR ilişkili Faktör 2
vb	ve benzeri
VCAM-1	Damar Hücresi Yapışma Molekülü 1
Vegfa	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-A
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
Wnt	Wingless-İlişkili Entegrasyon Bölgesi
ZNRF3	Çinko ve Yüzük Parmağı 3
°C	Celsius
ρ	Özdirenç
Ω	ohm

1. GİRİŞ

Yara, canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulmasıdır. Travma sonrası başlayan; düzenli ve sıralı, hücrel ve biyokimyasal olayların sonucunda yeni doku oluşması da yara iyileşmesi olarak tanımlanmaktadır [1]. Tam kat deri defekti, dermis ve epidermisi kapsayan defektler olup bu tür yaralar; anjiogenez ve kontraksiyon ile iyileşmektedir. İyileşme olayı, inflamasyon, kollajen birikmesi ve kollajen matürasyonu aşamalarından meydana gelmektedir [2].

Diabetes Mellitus, pankreasta üretilen insülin hormonunun yetersiz kaldığı veya vücudun insülini kullanamadığı durumlarda ortaya çıkan kronik bir hastalıktır. Hiperglisemiye neden olarak başta kan damarları ve sinirler olmak üzere görme bozuklukları, böbrek fonksiyon bozuklukları ve cilt yaraları gibi birçok soruna yol açar. Sinir hasarı ve tıkalı damar hastalıklarının en çok etkilendiği bölgelerin alt ekstremiteler olmasından dolayı ayak yaraları diğer komplikasyonlara göre çok daha çabuk oluşur, ilerler ve yaşam kalitesini düşürür ve hatta hayatı tehlikeye sokacak boyutlara ulaşır [3]. Diyabetli hastalarda yara iyileşmesi sağlıklı bireylere göre daha komplike ve yavaş meydana gelirken bu yaraların enfekte olma ihtimali oldukça fazladır [4]. Derideki diyabetik yaraların başlıca nedeni periferik nöropatidir. Duyu sinir dejenerasyonu hissizliğe yol açarak çarpma, yanma vb. durumlarda daha kolay yaralanmaya ve yine hissizlik nedeniyle iyileşmede uzamaya sebep olmaktadır. Motor sinir dejenerasyonu ise kaslarda zayıflığa ve atrofiye neden olarak denge kaybına bunun sonucunda da yaralanmalara neden olmaktadır. Otonom sinir dejenerasyonu da terlemenin azalmasına ve derinin kurummasına, incelmesine neden olarak derinin daha kolay yaralanmasına sebebiyet vermektedir. Ayrıca otonom sinir dejenerasyonu damarlarda kan akımını olumsuz bir şekilde etkileyerek dokuların, özellikle de yaralı dokuların, yeterli besin ve oksijeni alamamasına neden olarak iyileşme sürecini oldukça yavaşlatmaktadır [3].

Diyabetik yara tedavisinde; nekroza uğramış bütün dokuların temizlenmesi, ayağa uygulanan basıncın düşürülmesi, yaradaki enfeksiyonun çeşitli antibiyotiklerle ortadan kaldırılması gibi birçok yöntem kullanılmaktadır [5]. Çabuk yaralanıp geç iyileşen diyabetli bireylerin yaralarının çabuk iyileşmesi; enfeksiyon riskini azaltması ve hastanın yaşam kalitesini arttırması açısından önemlidir. Diyabetik yaraların iyileşmesini hızlandırmak amacıyla alternatif bir yöntem olarak pulslu manyetik alanın (PMA) kullanıldığı birçok çalışmaya rastlanmıştır [6-9].

PMA'nın kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğunu gösteren birçok deneysel ve klinik bulgular olmasına rağmen, deri ve tendon gibi yumuşak dokular üzerine yapılan çalışmalar ise çelişkili sonuçlar vermiştir [10]. PMA'nın diyabetik sıçanlarda yara iyileşmesine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada tedavinin 7., 10., 14. ve 21. günlerinde yapılan ölçümler kontrol grubuna göre iyileşmenin 7. Gün hariç diğer günlerde daha hızlı olduğunu göstermiştir [6]. Goudarzi ve arkadaşları, PMA'nın yara iyileşmesini hızlandığını ve yaranın gerim gücünü

arttırdığını bildirmişlerdir [7]. Strauch ve arkadaşları ise PMA'nın deri yaralarının iyileşme sürecinin sonunda yaralı bölgeyi daha güçlü hale getirmediği ancak iyileşme sürecini kısalttığını gözlemlemişlerdir [8]. Bir başka çalışmada da PMA'nın hızlı iyileşme sağladığını ancak bu iyileşmenin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir [9]. Yapılan literatür taramasında pulslu manyetik alanın yara iyileşmesinde görevli genler üzerine etkileri ile ilişkili çalışmalar az sayıda olup çelişkili çalışmalara rastlanmıştır.

Bu nedenle, bu çalışmada PMA'nın derideki yaraların iyileşmesi üzerine etkilerinin $tgfa$, $vegfa$, $tnf\alpha$, $nfe2l2$, $nf-kb1$, $nf-kb2$ ve $ctnnb1$ genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerinden değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, diyabetik ve non-diyabetik hayvan modelinde, PMA'nın yara iyileşmesi süreci üzerindeki etkisi moleküler düzeyde analiz edilmiştir.

DeneySEL gen ekspresyon verilerini biyolojik bağlamda desteklemek amacıyla, ilgili genlerin kodladığı proteinlerin olası etkileşimlerini ortaya koymak üzere protein-protein etkileşim (PPI) ağı, STRING veritabanı kullanılarak *in silico* olarak analiz edilmiştir. Ayrıca, bu genlerin post-transkripsiyonel düzeyde hangi mikroRNA'lar tarafından hedeflenebileceğini belirlemek üzere miRDB, miRTargetLink ve TargetScan veritabanları kullanılarak miRNA hedef tahmin analizleri gerçekleştirilmiştir. Böylece PMA'nın yalnızca gen ekspresyonu düzeyinde değil, aynı zamanda gen ürünlerinin fonksiyonel ilişkileri ve bu genlerin epigenetik düzeydeki potansiyel düzenleyicileri ile olan bağlantıları da çok yönlü olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışma, diyabetik ve non-diyabetik hayvanlarda PMA'nın deri gibi yumuşak doku yaralarına etkisinin gen ekspresyon düzeyleri ile birlikte, protein etkileşim ağları ve miRNA temelli *in silico* verilerle açıklanması; PMA'nın yara tedavisinde potansiyel bir biyofiziksel ajan olarak kullanılabilirliğine dair çok yönlü bilimsel kanıtlar sunması açısından önemlidir. Elde edilen bulgular, PMA'nın, gen ekspresyonu düzeyinde yara iyileşmesini etkileyebileceği ve *in silico* analizlerle desteklenen miRNA etkileşimleri aracılığıyla da epigenetik düzenleme potansiyeli taşıdığını işaret etmektedir. Bu nedenle bu çalışma gelecekte yapılacak prekliniK ve kliniK çalışmalara yön verecek transkripsiyonel bir temel oluşturması açısından önemli olacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) insülin eksikliğinden (Tip 1) veya vücudun insülini yeterince ya da hiç kullanamaması (Tip 2) sebebiyle kandaki glikoz düzeylerinin yükselmesiyle karakterize edilen kronik, metabolik bir hastalıktır [11, 12].

Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun (IDF) verilerine göre, 2024 yılında tüm dünyada yaklaşık 588,7 milyon yetişkinin (20-79 yaş) DM hastası olduğu, 2025 yılında ise popülasyonun %11,1'ine (20-79 yaş) ulaşacağı öngörülmektedir. DM tedavisine yönelik küresel sağlık harcamalarının 2024 yılında 727 milyar dolara ulaştığı ve diyabetin, dünya genelinde ölüme neden olan ilk 10 hastalık arasında yer aldığı bildirilmektedir. IDF'nin 2025 yılı raporuna göre dünyada yaklaşık dört milyon kişi DM nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Tüm dünyada DM prevalansının 2050 yılında 853 milyonu bulacağı ön görülmektedir. Türk Diyabet Cemiyeti'nin (TDF) raporuna göre Türkiye'de DM prevalansı yirmi yaş üzeri için 2000 yılında %7,8, 2010 yılında ise %16'dır. Ülkenin sağlık bütçesinin neredeyse dörtte biri DM ve DM ile ilişkili hastalıkların tedavisine harcanmıştır [12, 13].

DM, hem akut (hiperosmolar nonketotik koma, diyabetik ketoasidoz, laktik asidoz) hem de kronik (diyabetik nöropati, anjiyopati, nefropati, ayak ülseri) komplikasyonlara yol açabilir [14, 15]. Bu komplikasyonların temelinde hiperglisemiye bağlı olarak gelişen çeşitli hücre içi metabolik bozukluklar yer almaktadır [16].

Hipergliseminin sebep olduğu olaylardan biri non-enzimatik glikozilasyondur (NEG). Kan glikoz seviyesindeki artış, katalizörler olmadan da proteinlerle glikozun bağlanmasına neden olur. Bir NEG sonucu glikoz schiff bazı ve ardından amadori ürünlerine dönüşerek çeşitli kimyasal tepkimelerle ileri glikozilasyon son ürünlerini oluşturur. Bu son ürünler mikroanjiyopatiye ve bazı reseptörlere bağlanarak hücrelerin yapısal olarak bozulmasına, sonuçta retinopatiye de neden olur. DM'de yara iyileşmesindeki yavaşlamanın nedeni bu reseptörlerin endotel hücrelerde, makrofaj hücrelerinde ve fibroblastlardaki varlığıdır [17].

Glikoz metabolizmasının ikincil yolağı olan poliöl yolağı hücre içi glikoz düzeyinin artmasıyla aktifleşir. Aldoz redüktaz, glikozu sorbitole NADPH'yi kofaktör olarak kullanarak indirger. NAD⁺'nın kofaktör olarak görev yapmasıyla da sorbitol dehidrogenaz sorbitolu fruktoza dönüştürür. Sorbitol bir polihidroksil alkoldür ve güçlü hidrofilik özellik gösterir. Bu nedenle membrandan geçemeyerek ozmotik basıncı artırır. Sonuçta kofaktör NADPH ve NAD⁺ bozulmasıyla oksidatif strese artış olur [17, 18].

Hiperglisemi nedeniyle doku hasarına sebep olan bir diğer hücre içi mekanizma protein kinaz C (PKC) aktifleşmesidir. Hiperglisemi, diaçilgliserol (DAG) seviyesinde artışa sebep olur. DAG'da oluşan artış PKC'yi aktive eder. Hiperglisemi, hücreler arası reaktif oksijen türlerinin de

artmasına neden olur. Artan reaktif oksijen türleri daha sonra vasküler endotelde DAG oluşumuna ve ardından PKC'nin aktifleşmesine neden olur. Aktifleşen PKC, sitokinlerin, fibrinolitik inhibitör plazminojen aktivatör inhibitörünün ve vasokonstriktör endotelin-1'in üretiminin artmasını sağlar. PKC, vasküler endotelial büyüme faktörünün de araçlarından biridir. Meydana gelen bu değişimler, vasküler oklüzyon, bazal membran kalınlaşması, anjiyogenezin aktifleşmesi, permeabilitede artış gibi olaylara sebep olur [16].

DM'de bu mekanizmaların neden olduğu hasarlar sistemik komplikasyonlara dönüşür. Reolojik ve vasküler bozukluklar DM komplikasyonlarından sistemik olanlarıdır. DM'li bireylerde, kapiller membran kalınlaşması ve endotel disfonksiyonu vasküler sistemde mikro ve makrovasküler sorunlara neden olur. Diyabetik mikrovasküler problemler nefropatiye ve retinopatiye yol açarken, makrovasküler sorunlar çoğunlukla serebral damarlarda, koroner arterlerde ve alt ekstremitelerde büyük periferik damar sisteminde meydana gelir. Bazal membranın bozulması viskozitenin artmasına, endotel disfonksiyonu ise trombosit agregasyonun artmasına sebep olur. Oksidatif stresteki artış ve non-enzimatik glikozilasyon eritrositlerin deformasyon yeteneğinin azalma sebep olur. DM'deki reolojik ve vasküler bozukluklar da sonuç olarak yabancı organizmalara karşı savunmayı, hemostazı/fibrinolizi, oksijen ve besin iletimini, yaraların iyileşmesini etkiler. DM ayrıca hipertansiyonun ve ateroskleroz oluşumunun da sebeplerindendir [17, 19, 20].

DM'nin sebep olduğu başka bir metabolik sorun ise nöropatidir. Diyabetik nöropatinin distal simetrik polinöropati, sinir sıkışması sendromları, trunkal radikülopati, proksimal asimetrik mononöropati (diyabetik amiyotropi), otonomik nöropati, kraniyal mononöropati ve kronik inflamatuvar demiyelinize edici poliradikülopati olmak üzere yedi tipi bulunur [21]. Motor, duysal ve otonomik nöropatiler diyabet yaralarının oluşumunda ve iyileşmesinin gecikmesinde etkilidir [22].

Motor nöropati, dinamik anatomide yapısal değişikliklere sebep olur. Güçsüz kaslara ve dengesiz kasılmalara sebebiyet verir. Fleksör ve ekstensör tendonlar arasında dengesizliğe neden olur. Motor nöropati çoğunlukla diyabetik ayak yaralarının ana sebeplerindendir [23]. Ayaktaki intrinsik kasların güçsüzleşmesine neden olarak uzun fleksör ve ekstensör tendonlarda dengesizlik yaratır. Bunun sonucunda ayakta pes cavus ve ayak parmaklarında pençeleşme oluşur. Bu pençeleşme normalde metatarsal uçlardaki yağlı tabakayı öne çeker ve yastıklama etkisini düşürür. Normal ayakta, parmaklar ayağa gelen ağırlığın %30 ile %50 kadarını alırlar. İleri derecedeki pençeleşmede parmaklar ağırlık kaldırmaz, metatarsal uçlara yüklenen ağırlık artar. Ek olarak DM'li bireylerin ayaklarının metatarsal uçlarındaki ve topuk bölgesindeki yağ tabakasının da atrofiye uğraması sonucu yastıklama azalır [22]. DM ayak ülserinin %90'ı, ayağın ağırlığı taşıyan ve dikey yükün en çok bindiği bölgelerinde meydana gelir [24].

DM'lilerin yaklaşık %30-50'sinde periferik duyuşal nöropati bulunur. Duyuşal nöropati kişinin acıyı hissetmesini önler. Bu yüzden, herhangi bir şekilde yaralanmak DM'liler için daha olasıdır. Ayaklar basıya ve yaralanmalara daha açıktır ve gözlerden de uzaktadırlar. Bu nedenle duyuşal nöropati sebebiyle acı hissinin olmaması ayaktaki yaranın fark edilmesini ve korunmasını önler. Sonuçta yavaşlayan yara iyileşmesi ya da ülser meydana gelir [22, 23].

Kronik DM'de otonomik nöropati yaygındır. Ter bezlerinin uyarılmasını sağlayan otonomik sinirlerin azalmasına sebep olur. Bu da deride kuruluğa ve esneklik kaybına yol açar. Kurumuş ve gerginleşmiş deri çok kolay çatlar ve yaralanır. Otonomik nöropati sonucu arteriovenöz şant oluşur. Küçük arterlerde dilatasyon ve distansiyon meydana gelir. Sonuçta nöropatik ödem gelişir. Deride meydana gelen küçük çatlaklar enfekte olup ülserleşirler [22, 23].

DM'de görülen başka bir komplikasyon da immünolojik bozukluktur. İmmün sistem yaranın oluştuktan sonra devreye girer ve yaranın iyileşme sürecinde, inflamasyon evresinde önemli rolü vardır. Bu evrede, savunma hücreleri, ölü dokuyu ve yabancı cisim ve mikroorganizmaları temizlerler. Bu aşamada salgıladıkları çok sayıda biyokimyasal ajan sayesinde yaralı dokunun yeniden yapılandırılmasını da sağlarlar. Bu evrede meydana gelen bozukluklar yaranın iyileşme sürecini sekteye uğratır. DM'de kemotaksis bozukluklar immün sistemi aksatır. DM'li bireylerde yara yavaş iyileşir. İnflamasyon evresinde bozukluklar, iyileşmenin proliferasyon evresine geçmesini önlerse yara kronikleşir, ülserleşir [17, 25, 26].

2.2. Yara

Derinin bütünlüğünde ortaya çıkan herhangi bir çatlama, kopukluk yara olarak adlandırılır. Yara, normal anatomik yapının bozulmasıdır. Erken ve/veya geç komplikasyonlarının morbiditeye ve/veya mortaliteye sebep olması sebebiyle büyük bir klinik problem olarak kabul görür [27, 28].

2.2.1 Yaranın Sınıflandırılması

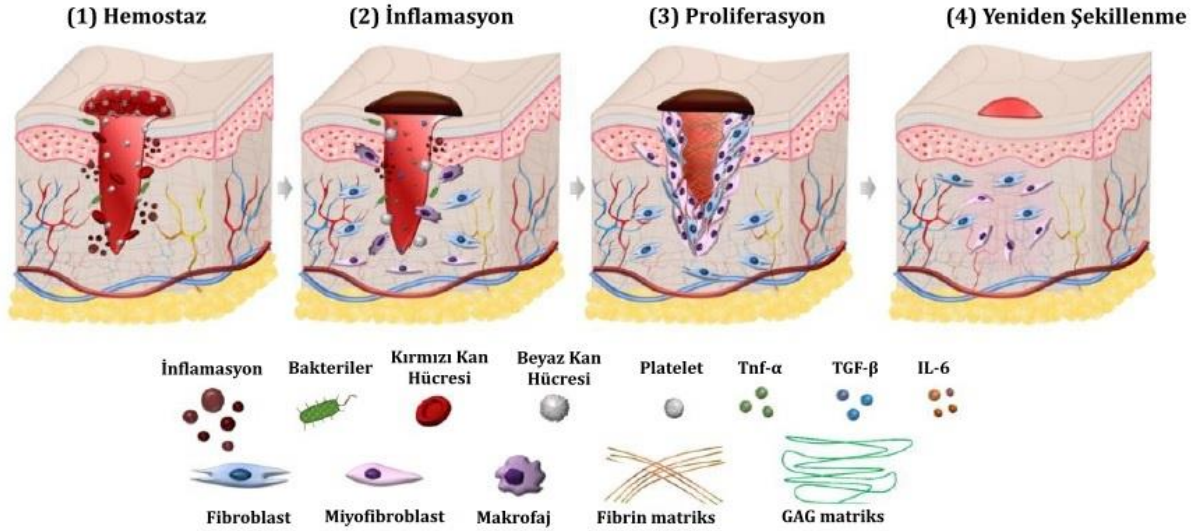
Yaralanmanın biçimi, açık yara mı yoksa kapalı yara mı olduğu, ne kadar derin olduğu, ne kadar sürede iyileştiği ve enfeksiyon riski dikkate alınarak sınıflandırılırlar. Yaralar, biçimine göre, kesik, ezik, yırtık vb. olarak isimlendirilir [27].

Kapalı yaralar, derinin altındaki dokunun travmaya uğraması fakat derinin hasarlanmadığı yaraları, açık yaralar ise hem alttaki dokunun hem de derinin zarar gördüğü yaraları kapsar [27].

Yaralar derinliğine göre; yüzeysel (dermisin altına inemeyen), deri altı dokunun da hasarlandığı derin yaralar, ne kadar sürede iyileştiğine göre; akut ve kronik yaralar, enfeksiyon riskinin büyüklüğüne göre; temiz, temiz kontamine, kontamine ve kirli-enfekte yaralar şeklinde sınıflandırılırlar [27].

2.2.2. Yara İyileşmesi

Bütünlüğünü yitirmiş dokuların normal histolojik, anatomik, fizyolojik yapısını tekrar kazanmasına yara iyileşmesi denir [29]. Yaralanma sonrası, dokunun bütünlüğünü ve fonksiyonunu yeniden düzeltmek için karmaşık biyokimyasal ve hücrel olaylardır. Dört farklı evrede gerçekleşir ve bu evreler iç içe girmiş şekildedir (Şekil 2.1.) [30].



Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin evreleri [31].

2.2.2.1. Hemostaz Evresi

Hemostaz, yara meydana geldikten hemen sonra başlar. Trombositler trombojenik subendotelyuma ulaşırlar. Trombositler, hemostazı başlatır ve birçok sitokin ve hormonun salınmasını tetiklerler. Bu nedenle iyileşmenin diğer evrelerinde de görevlidirler. Kan kaybının azaltılması trombositlerin saldırdığı sitokinlerin vazokonstrüksiyonu başlatmasıyla sağlanır. Trombositlerden, birçok protein, bir takım büyüme faktörleri ve pıhtılaşmada görevli serotonin, kalsiyum, adenosin trifosfat vb. salınır. Daha küçük damarlar, vazodilasyona uğrar. Bu sayede lökositler, kırmızı kan hücreleri, plazma proteinleri yaraya ulaşır. Hasarlı dokudaki subendotel tabaka kollajenleriyle etkileşime girer ve ilk pıhtı oluşur. Bu aşamada trombositler granüllerini salarlar ve koagülasyon başlatılır. Protrombin, trombine dönüşür ve fibrinojeni fibrine dönüştürür. Fibrin polimerizasyonu, yaraya gelen ve yara iyileşmesinin sonraki evrelerinde önemli rolleri olan hücrelere iskele işlevi görür [17, 25].

2.2.2.2. İnflamasyon Evresi

Nötrofillerin, makrofajların ve lenfositlerin yaraya doğru harekete geçmesiyle inflamasyon evresi başlar. Hemostaz evresindeki vazokonstrüksiyon 10-15 dakika sonra son bulur. Prostaglandinler, histamin ve lökotrienler sayesinde vazodilasyon başlar. Savunma hücreleri böylece daha kolay yaranın olduğu bölgeye ulaşabilirler. Çok sayıda nötrofil, ilk yirmi dört saatte yaraya ulaşır. Yabancı cisimleri bakterileri ortamdan temizlerler. Oksijen radikalleri

ve granüllerinden salınan proteazlarla nekroza uğrayan dokunun temizlenmesini sağlarlar. Elastin ve kollajenin yıkılmasını sağlarlar. Nötrofillerin apoptoz ürünleri, makrofajların yaraya gelmesini sağlar. Makrofajlar ve diğer lenfositler, bakterileri ve ölü dokuyu fagositik özellikleriyle yaradan uzaklaştırırlar. Makrofajlar bir yandan birçok büyüme faktörünü de salarak yaranın iyileşme sürecinin düzenlenmesinde önemli görev yaparlar. Makrofajlar yaralanmayı takiben ilk 48 saati içinde yaraya varır, inflamasyon evresi bitinceye kadar da yaralı bölgede kalırlar. Bu evre de enfeksiyonla savaşmak elzemdir. İnflamasyon evresi tamamlanamazsa daha fazla yaralanmalar ve/veya yaranın kronikleşmesi yüksek ihtimaldir [17, 25, 32].

2.2.2.3. Proliferasyon Evresi

Proliferasyon evresinde, yara kapatılır ve re-epitelizasyon süreci başlar. Makrofajların saldırdığı sitokin ve büyüme faktörleri, fibroblastları aktive eder ve çoğalmalarını başlatır. Yaranın kapanması sırasında büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin etkisi kapiller damarların filizlenmesi ve ekstrasellüler matriks sentezlenmesi başlar. Endotel hücreleri vasküler endotel büyüme faktörü sayesinde yaraya gelirler. Burada çoğalarak yeni damarları meydana getirirler. Kök hücreler ise keratinositlere farklılaşarak ve yara kenarına doğru giderler. Ekstrasellüler matriksin mezenşimlerine ulaştıklarında yaranın kenarına yapışır ve bazal membranı onarmaya başlarlar. Bu işlem yaranın iki ucu karşılaşıncaya kadar devam eder. Re-epitelizasyon işlemi sayesinde yara kurumaktan ve enfeksiyonlardan korunur. Yaranın civarındaki damarlardan yaraya doğru yeni damarlar filizlenir. İmmatür kollajenler (tip-3) dokuyu doldurur. Sağlam deride tip-3 kollajenin tip-1 kollajene oranı $\frac{1}{4}$ iken bu evrede bu oran $\frac{1}{2}$ 'dir. Bazı fibroblastlar, miyofibroblastlara farklılaşırlar. Bu farklılaşma sonrası miyofibroblastlar kasılarak yaranın kapanmasını sağlar [17, 32, 33].

2.2.2.4. Maturasyon (Anjiyogenez, Remodelling) Evresi

Bu evrede, damarlar sitokin sinyalleri ile filizlenme, döngü ve budama yolunu takip ederler. Filizlenen küçük damarlar dermisi doldurur. Filizlenen damarlar sayesinde birincil iyileşmede anjiyogenez hızlanır. İkincil iyileşme de ise granülasyon olur. Bu, birçok büyüme faktörü ve artan laktatlar yoluyla meydana gelir. Anjiyogenez evresi ise iyileşme sürecinde üretilen ekstrasellüler matriksin değiştirilmesi, tip 3 kollajenin tip 1 kollajenle değiştirilerek $\frac{1}{4}$ oranına dönmesi ve önceki iyileşme evrelerinde görev alan hücrelerin apoptozuyla başlar. Bu evrede kollajen epitele paralel ve daha düzenli dizilir. Tip 1 kollajen sayesinde yaradaki gerim kuvveti büyük bir artış oluşur. İyileşmenin normal bir şekilde devam edebilmesi için hücre, kapiller damar ve kollajen üretim ve yıkım dengeli olmalıdır [17, 32].

2.2.3. Yara İyileşmesinde Görev Alan Bazı Genler

2.2.3.1. Nfe2 Geni ve Yara İyileşmesindeki Rolü

WW domain bağlanma aktivitesini; özdeş protein bağlanma aktivitesini ve diziye özgü çift sarmallı DNA bağlanma aktivitesini etkinleştirir. cis-düzenleyici bölge diziye özgü DNA bağlanma aktivitesine katkıda bulunur. RNA polimeraz II tarafından transkripsiyonun düzenlenmesinde yer aldığı tahmin edilmektedir. Labirent tabaka kan damarı gelişimi, kemik mineralizasyonunun negatif düzenlenmesi ve peptidil-lizin asetilasyonunun pozitif düzenlenmesi dahil olmak üzere birkaç sürecin yokuş yukarı ve/veya içinde hareket ettiği tahmin edilmektedir. RNA polimeraz II transkripsiyon düzenleyici kompleksi ve protein-DNA kompleksinin bir parçasıdır [34].

Nfe2 antioksidan tepkiler, otofaji, proteostaz ve metabolizma gibi önemli hücresel homeostatik süreçleri koordine eden bir ana transkripsiyon faktörüdür. Ortaya çıkan kanıtlar, inflammatuar ve bağışıklık süreçlerini düzenlemedeki önemli rolünü vurgulamaktadır. Nfe2'nin miyeloid hücre farklılaşması ve işlevinde rolü ve miyeloid hücre kaynaklı hastalıklarda etkisi bulunur. Makrofajlarda nfe2, sitokin üretimini, fagositozu, patojen temizliğini ve metabolik adaptasyonları düzenler. Dendritik hücrelerde olgunlaşmayı, sitokin üretimini ve antijen sunum yeteneklerini etkilerken, nötrofillerde nfe2 aktivasyon, göç ve sitokin üretiminde rol oynar. Nfe2'nin düzenleyici eylemleri sepsis, çeşitli bulaşıcı hastalıklar, kanser, yara iyileşmesi, ateroskleroz, hemolitik durumlar, pulmoner bozukluklar, hemorajik olaylar ve otoimmün hastalıklar gibi çok çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Nfe2'nin aktivasyonu tipik olarak iltihabı azaltır ve böylece hastalık sonuçlarını değiştirir [35].

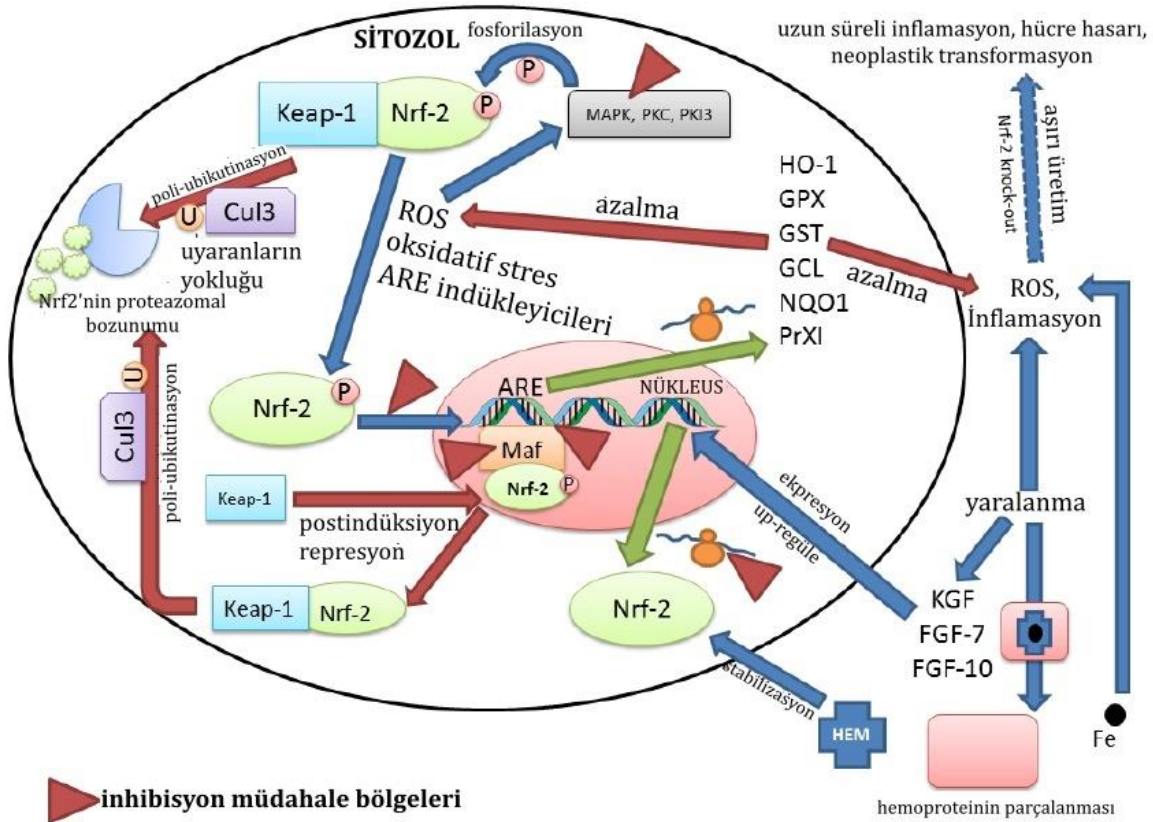
Nfe2'nin yara iyileşmesindeki temel rolü, yaralı ve iltihaplı dokulardaki ROS birikimini tespit etmek ve antioksidan savunma sistemini aktive etmektir. Bu nedenle, nfe2'nin farmakolojik indüksiyonu, doku hasarından sonra iyileşmeyi teşvik etmede ve onarımla ilişkili iltihabı kontrol etmede önemli bir terapötik hedeftir. Nfe2 yolu, yara iyileşmesi sırasında antioksidan enzimlerin ekspresyonu yoluyla oksidatif strese karşı koruyucu bir rol oynar [36].

Vasküler endotelial büyüme faktörü (vegf), yaralanma bölgesinde artan oksijenasyonu teşvik eder ve neovaskülarizasyonu başlatır. Kweider ve arkadaşları, vegf'nin BeWo hücre hattında nfe2'yi aktive ettiğini ve bazı antioksidan enzimlerin (tiyoredoksin, tiyoredoksin redüktaz ve HO-1) seviyelerini artırdığını göstermiştir [37]. Bu durum, nfe2'nin, ROS'un neden olduğu hasardan hücreleri korumak için antioksidan tepkileri indükleyerek iyileşmeyi desteklediğini göstermektedir. Nfe2 yolunun yaraların iyileşmesi üzerinde dikkate değer bir etkisi vardır ve kronik yaraların tedavisinde faydalı olabileceği ileri sürülmüştür [37, 38].

Stres olmayan normal koşullarda, nrf2, Kelch-benzeri ECH ilişkili protein (Keap1) tarafından tutulur ve proteazomal yıkım için işaretlenir. Zararlı stres altındaki hücrelerde, MAPK ve PKC inhibe olur ve nrf2 bu inhibitör proteinden ayrılarak nükleusa geçer. Nükleus içinde nrf2,

antioksidan yanıt elementlerine (ARE) bağlanır; bu bağlanma, küçük Maf proteinleri ile heterodimerleşme gerektirir. ARE'ler, birçok antioksidan ve faz II detoksifikasyon enzimini kodlayan genlerin promotör bölgelerinde bulunur. Bu enzimler, sitotoksik elektrofil ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) uzaklaştırılmasını artırarak hücresel savunmada önemli rol oynar [39].

Nrf2 ifadesinde artış (Şekil 2.2), cilt yaralanmalarından sonra gözlemlenir. Nrf2'nin yara iyileşmesindeki temel görevi, yaralı ve iltihaplı dokularda yüksek miktarda üretilen endojen ROS'un aşırı birikimine karşı koruma sağlamaktır. Aşırı hücre çoğalması gösteren yara epitelinde, makrofajlar ve keratinositlerde nrf2'nin belirgin şekilde ifade edildiği bulunmuştur [39].



Şekil 2.2. Yara iyileşmesinde nrf2 yolu [39].

Nrf2'nin özellikle iltihabın çözülme aşamasında önemli bir rol oynadığı, fakat cilt yaralarının reepitelizasyonda etkili olmadığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, fizyolojik koşullar altında, onarımla ilişkili iltihabın kontrolünde nrf2'nin görev aldığı belirlenmiştir [39].

2.2.3.2. Tnfα Geni ve Yara İyileşmesindeki Rolü

Tümör Nekroz Faktörü-alfa (tnfα), sepsis ve çoklu organ yetmezliği gibi ciddi durumların gelişiminde kilit rol oynayan başlıca sitokinlerden biridir. Bu molekül, başta makrofajlar ve endotel hücreleri olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından üretilmektedir. Tnfα'nın temel işlevlerinden biri, diğer sitokinlerin üretimini düzenlemek ve bağışıklık hücrelerinden monositler ile lökositlerin degranülasyonunu artırarak endotel yüzeylerine yapışmalarını kolaylaştırmaktır.

Travma ve benzeri durumlarda, dolaşımdaki $\text{tnf}\alpha$ düzeylerinde geçici bir artış gözlemlenebilir; bu artış genellikle olumsuz klinik gidişatın bir göstergesi olarak kabul edilir. Ayrıca, skar dokusunun oluşum sürecinde ve düzgün iyileşmeyen yara bölgelerinde $\text{tnf}\alpha$ 'nın anormal düzeyde aktif olmasının etkili olabileceği öne sürülmektedir [40, 41].

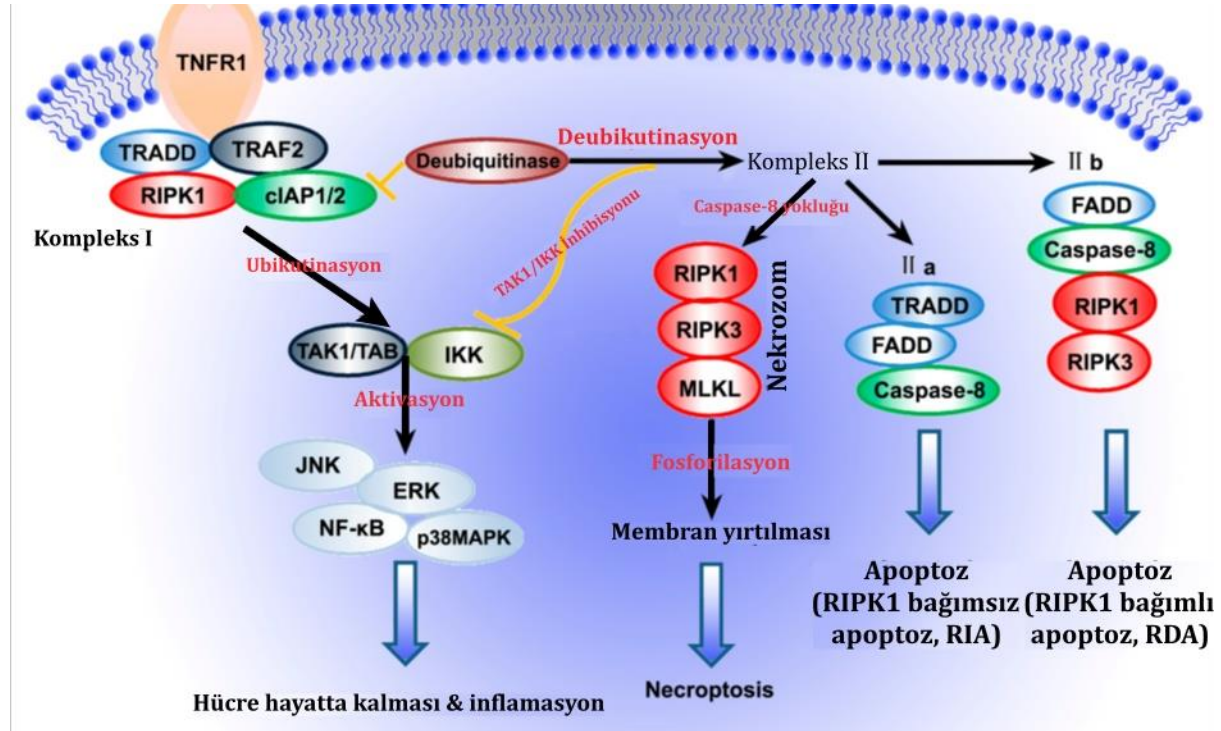
İnflamasyon sürecinde ilk devreye giren hücreler nötrofillerdir. Yaralanmanın ardından ilk 24 saat içinde mikroorganizmaların ve yabancı maddelerin ortamdan uzaklaştırılması hedeflenir. Eğer enfeksiyon gelişmezse, nötrofillerin sayısı 2 ila 3 gün içinde azalır. Bu süreçte, nötrofillerin granüllerinden salgılanan jelatinaz, kollajenaz ve elastaz gibi proteolitik enzimler nekrotik dokunun temizlenmesini sağlar. $\text{Tnf}\alpha$, monositleri bölgeye çeken en güçlü kemotaktik ajanlardan biridir. Makrofajların salgıladığı sitokinler; yeni damar oluşumu, fibroblastların göçü ve çoğalması, kollajen sentezi ve yaranın büzülmesi gibi iyileşme süreçlerini düzenler. Endotelial hücreler ile fibroblastların çoğalması ise, trombositler ve aktive makrofajlardan salınan büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığıyla kontrol edilir. $\text{Tnf}\alpha$ başta olmak üzere inflamatuvar hücrelerden ve ekstrasellüler yapısal parçacıklardan salınan çeşitli sitokinler, fibroblastların yara bölgesine hareketini, çoğalmasını ve kollajen üretimini destekler [42].

$\text{Tnf}\alpha$, hücre zarındaki tnfr1 'e bağlandığında tnfr1 'in konformasyonu değişir ve çeşitli proteinlerin (TRADD, RIPK1, tnf reseptör ilişkili faktör 2 (TRAF2) ve hücrel apoptoz inhibitör proteini 1 ve 2 (cIAP1/2)) katılımıyla tnfr1 kompleks I hızla oluşur. TRADD, TRAF2'nin işe alınması ve RIPK1'in kompleks I içinde ubiquitinlenmesi açısından çok önemlidir. TGF-aktivasyonlu kinaz 1 (TAK1) bağlayıcı protein (TAB) kompleksi ve IKK1 içeren I κ B kinaz (IKK) kompleksi hücre ölümünü engelleyebilirken, cIAP1/2 ise tnfr1 aracılı nekroptozu engelleyebilir ve RIPK1'in ubiquitinlenmesini destekleyebilir. RIPK1'in ubiquitinlenmesi, TAK ve IKK kompleksleri aracılığıyla $\text{nf-}\kappa\text{b}$ sinyal yolunu aktive eder, hücre hayatta kalımını teşvik eder ve inflamatuvar yanıtı başlatır [43].

RIPK1'in deubiquitinasyonu, ya kompleks IIa ya da kompleks IIb'nin oluşumuyla sonuçlanır. Eğer hücrelerde kaspaz-8 mevcutsa, tnfr1 kompleks I, TRADD ve kaspaz-8'le birleşerek kompleks IIa'yı (TRADD, FADD ve kaspaz-8'den oluşur) oluşturur; bu da bir kaspaz kaskadını aktive eder ve RIPK1'den bağımsız apoptoza (RIA) yol açar. Eğer reseptör etkileşimli protein kinaz 3 (RIPK3) ve mixed soy kinaz domenine benzer (MLKL) protein tam olarak ifade ediliyorsa ve kaspaz-8 mevcutsa, RIPK1'in ubiquitinlenmesi engellenir ve RIPK3 ile etkileşime girerek kompleks IIb'yi oluşturur (esas olarak FADD, kaspaz-8, RIPK1 ve RIPK3'ten oluşur). Bu kompleks, kaspaz-8'i aktive eder ve RIPK1'e bağlı apoptozu (RDA) tetikler [43].

FAS/TNFR ailesinin uyarılması, yalnızca kanonik 'ekstrinsik' apoptoz yolunu tetiklemekle kalmaz, aynı zamanda hücre içi apoptoz sinyalleme olmadığında, spesifik ve güçlü bir küçük molekül olan nekrostatin-1 (Nec-1) tarafından inhibe edilen nekroptoz da yol açabilir. Kaspaz-8 inaktif olduğunda veya inhibe edildiğinde, nekroptoz kompleks IIb aracılığıyla başlatılır. RIPK1,

RIPK3'le birleşir ve otofosforilasyonu ve transfosforilasyonu tetikler; ardından RIPK1 ve RIPK3, MLKL ile birlikte nekrozom adı verilen (amiloid benzeri çoklu protein kompleksi) bir yapı oluşturur. RIPK3, MLKL'yle birleşir ve onu fosforile eder. Sonrasında MLKL oligomerleşir ve sitoplazmadan hücre zarına göç eder; burada MLKL'nin fosfatidilinozitol lipidleri ve kardiyolipin ile bağlanması sonucu zar geçirgenliği artar ve bu durum hücre ölümüne yol açar [43].



Şekil 2.3. Tümronekroz faktörü-alfa (tnfα)/tnf reseptörü 1 (tnfr1) aracılı inflamatuvar yanıt ve hücre ölüm yolları [43].

2.2.3.3. Vegfa Geni ve Yara İyileşmesindeki Rolü

Vegf, yara iyileşmesine katılan birçok hücre tipi tarafından üretilir: endotel hücreleri, fibroblastlar, düz kas hücreleri, trombositler, nötrofiller ve makrofajlar. Vegf'nin yara iyileşmesindeki rollerinden biri anjiyogenezi uyarmaktır. Yara iyileşmesinde anjiyogenez; vazodilatasyon, bazal membran degradasyonu, endotelial hücre göçü ve endotel hücre proliferasyonu dahil olmak üzere birden fazla adımı içerir. Daha sonra, kapiller tüp oluşumu meydana gelir, ardından paralel kapillerin filizlerin anastomozu (loop oluşumu) ve son olarak yeni bazal membran oluşumu gerçekleşir. Vegf, vasküler geçirgenliği artırır. KDR reseptörüne bağlanarak nitrik oksit sentaz (NOS) ve siklooksijenaz aktivitelerini uyarır. NO ve prostasiklin eş zamanlı vazodilatasyon ve vasküler geçirgenliği teşvik eder. Vazodilatasyon ve eşlik eden gerilme ayrıca endotelial büyüme faktörlerine duyarlılığı artırabilir ve ayrıca pozitif bir geri bildirim döngüsünde daha fazla vegf ekspresyonu indükleyebilir. Vegf, endotel hücrelerinde prokoagulan faktörleri indükler. Trombositler kendileri vegf sentezler ve salgılar, böylece lokal protein

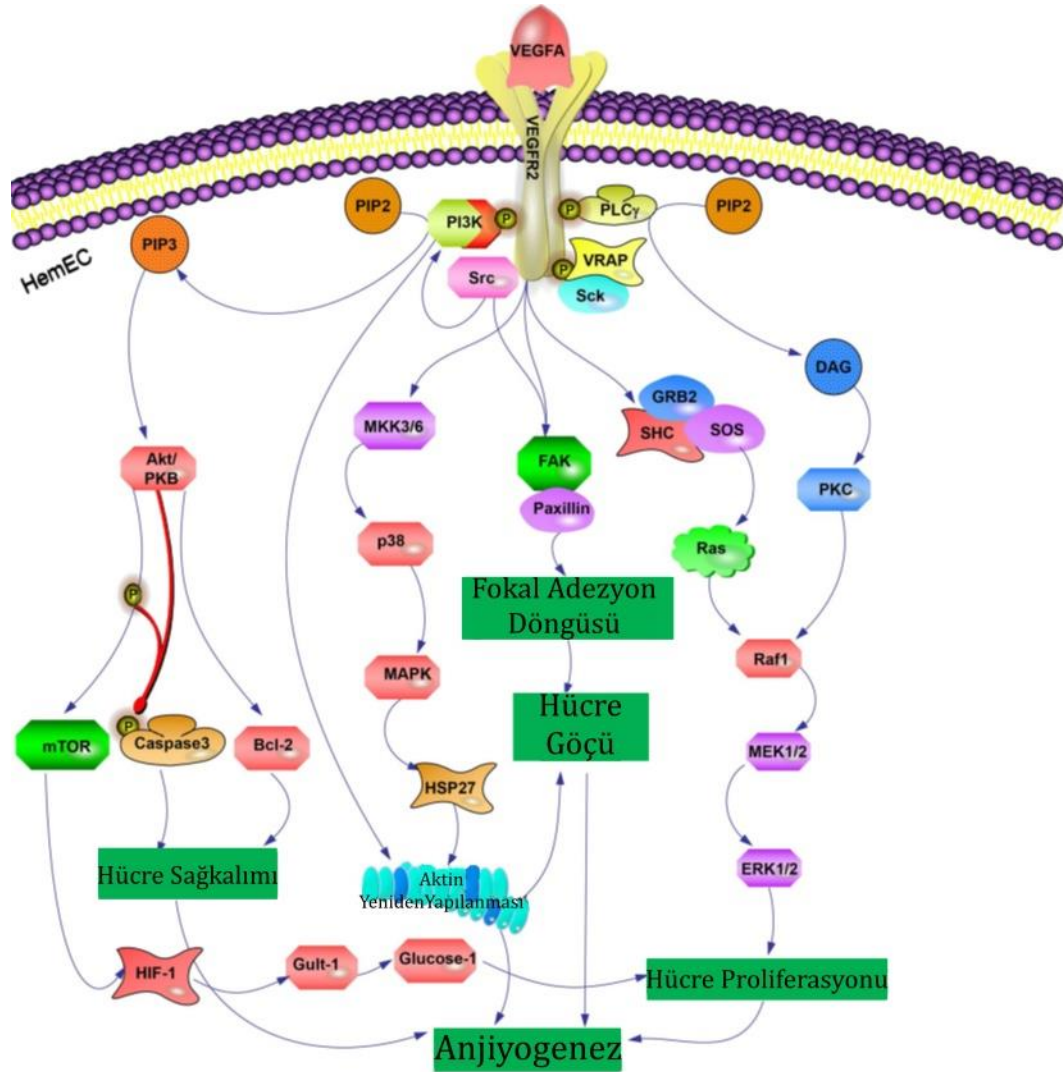
konsantrasyonunu artırır, pıhtılaşma kaskadını aktive eder ve trombin ve fibrin nihai üretimini sağlar. Ek olarak, vegf vasküler düz kas hücrelerini MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'u eksprese etmeye teşvik eder. Vegf tarafından indüklenen lokal vasküler ortam, enzimatik promotörler ve inhibitörlerin bir dengesini temsil eder ve endotel göçü için ortamı hazırlar. MMP-2, vasküler bazal membranların bir bileşeni olan Tip IV kollajeni parçalayabilir. MMP-1, kolajen tip I-III'ü parçalar. Sonuç olarak, enzimatik aktivite daha fazla vegf salınımını teşvik edebilir. Ortaya çıkan proteolitik ortam, bazal membran ve hücre dışı matrisin yapısal elemanlarını yok ederek, endotelin ekstrasvasküler boşluğa hareketini kolaylaştırır [44].

Vegf, iki temel mekanizma olan kemotaksis ve vazodilatasyon yoluyla yara iyileşmesinde endotel hücre göçünü başlatır. Anjiyogenezin başlangıç aşamasında, endotel hücreleri mitotik bölünmeden önce göç eder. Kılcal tomurcuklanma, proliferasyon olmadan endotel uzaması ve göçüyle 4 veya 5 güne kadar sürdürülebilir. Vegf'nin endotel hücre göçünü 2 mekanizma ile uyarır [44].

Mekanizma I: Kemotaksis—Kemotaksis, hücre yapışma moleküllerinin hücre dışı matrisle etkileşimini içeren oldukça düzenlenmiş bir süreçtir [44].

Mekanizma II: Artan vasküler geçirgenlik—vegf'nin yara iyileşmesinde endotel hücre göçünü başlattığı bir diğer mekanizma, NO ve prostasiklin aracılığıyla vasküler geçirgenlikteki artışla ilişkilidir. Plazma proteini fibrinojenin sızması ve sonradan hücre dışı alanda fibrin jeline dönüşmesi endotel göçünü uyarır [44].

Vegfa/VEGFR-2 sinyal yolu, infantil hemanjiyomda (IH) anjiyogenezi teşvik eder. Vegfa, HemEC'lerde (hemanjiyom endotel hücreleri) VEGFR-2 reseptörünü aktive ederek mikrovasküler geçirgenliği, HemEC proliferasyonu, göçü ve hayatta kalımı gibi birçok yokuş aşağı sinyal yolunu tetikleyerek anjiyogenezi teşvik eder. HemEC'lerde VEGFR-2'nin aktivasyonu, anjiyogenezi destekleyen çeşitli yokuş aşağı sinyalleri tetikler. VEGFR-2, HemEC proliferasyonunu ve böylece anjiyogenezi teşvik eden mitojenle aktive olan protein/Ras/Raf1/ERK/MEK sinyal yollarını aktive eder. VEGFR-2 tarafından aktive edilen PI3K/serin-treonin protein kinaz/Akt sinyal yolu, hücre hayatta kalımını destekler. Ayrıca VEGFR-2, Akt/mTOR/HIF-1/GluT-1/Glukoz-1 sinyal yolunu aktive ederek glikolizi artırır, HemEC proliferasyonunu teşvik eder ve bu sayede anjiyogenezi artırır. PI3K/Akt aktivasyonu, Bcl-2 ekspresyonunu teşvik edebilir ve anti-apoptotik bir rol oynayarak hücre hayatta kalımını destekler. VEGFR-2, hücre içi aktin yeniden yapılanmasını etkileyerek MKK/p38/MAPK/HSP27 sinyal yolunu aktive eder ve böylece doğrudan anjiyogenezi teşvik eder. VEGFR-2 reseptörü, FAK/Paxillin'i doğrudan aktive ederek hücre göçünü teşvik eder ve bu sayede yeni damar oluşumunu sağlar. Bu sinyal yolları farklı hücresel biyolojik işlevler gerçekleştirir, ancak aynı zamanda birbirleriyle sinerjik etkiler göstererek yeni damar oluşumunu (neovaskülarizasyon) desteklerler [45].



Şekil 2.4. Vegfa sinyal yolları [45].

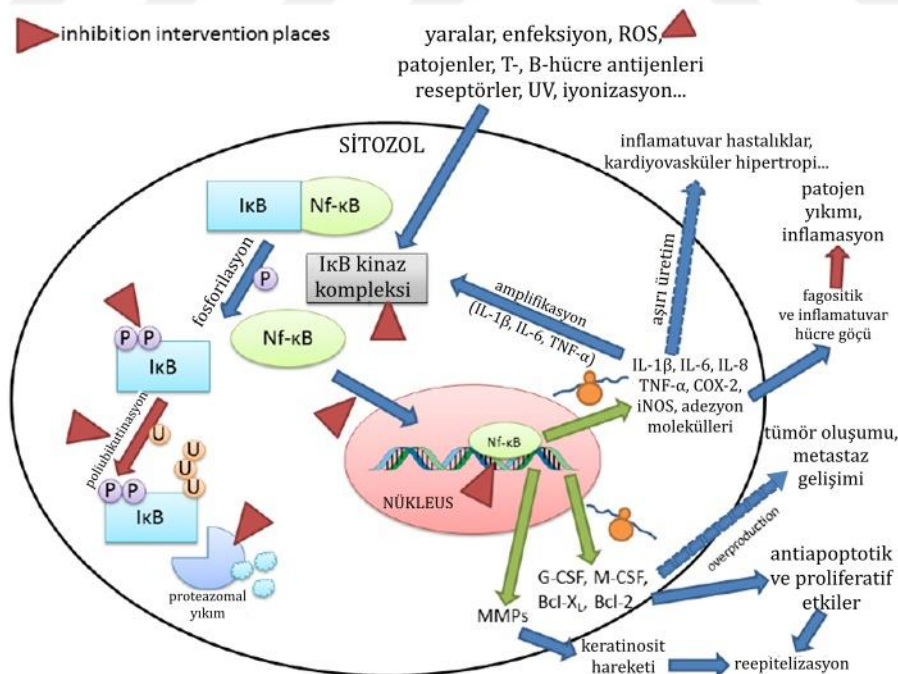
2.2.3.4. Nf- κ b1 ve Nf- κ b2 Genleri ve Yara İyileşmesindeki Roller

Sağlıklı ciltte, fibroblastlar bağ dokusunun yenilenmesinden ve dokunun yeniden şekillenmesinden sorumludur. Nf-kb, inflamatuvar ve oksidatif stres yanıtı, farklılaşma, çoğalma, apoptoz ve hücre yapışmasıyla ilgili genlerin ifadesini düzenler. Yara iyileşmesi sırasında, Wnt ve Notch sinyali, AKT/mTOR sinyali, transforme edici büyüme faktörü beta (tgf β) sinyali ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyali gibi çeşitli karmaşık biyokimyasal/hücreyel sinyaller, hasarı iyileştirmek için sıkı bir şekilde koordine edilmiş bir basamakta yer alır. Yara iyileşme süreci ve nükleer faktör kappa güçlendirici bağlayıcı protein (nf-kb) sinyal yolu, moleküler düzeyde yakın bir bağlantıyı paylaşır. nf-kb, hücre proliferasyonu, adezyonu, enflamasyonu ve reaktif oksijen türlerinin eliminasyonu ile ilişkilidir. Nf-kb ailesi, çeşitli homove heterodimerler oluşturmak için birbirleriyle birleşebilen nf-kb1 (p50 ve öncüsü p105), nf-kb2 (p52 ve öncüsü p100), RelA (p65), RelB ve Rel'i (c-Rel) içerir. Nf-kb sinyalleri, kornea epitelyal yara iyileşmesinde, insizyon yaralanmasında ve kutanöz yara iyileşmesinde yer alır [46].

Nf- κ b, bağışıklıkta önemli rol oynar. Hemen hemen her hücre tipinde bulunur. Uyarıcı yokluğunda, I κ B ailesinin inhibitör proteinleri ile etkileşime girerek etkisiz hale gelir. Aktivasyon üzerine nükleusa geçen nf- κ b, yalnızca bağışıklık yanıtlarını değil aynı zamanda hücre çoğalmasını, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını da etkileyen genlerin düzenlenmesinde rol oynar. LT α/β , CD40L ve BAFF gibi ligandlar tarafından etkinleştirilir ve p100'ün işlenmesini ve p52-RelB dimerlerinin nükleer translokasyonunu indüklemek için NIK ve IKK α homodimerlerine bağlıdır. Kanonik olmayan nf- κ b sinyal yolağı üzerinden etkisini gösterir. Bu sinyal yolağı, ikincil lenfoid organ gelişimi, B hücrelerinin olgunlaşması ve adaptif humoral bağışıklık için çok önemlidir, ancak aynı zamanda proliferatif ve antiapoptotik etkilere de sahip olabilir [47].

Yarayıleşmesi sırasında, klasik nf-kb yolu, bağışıklık tepkisi olarak aktive olur (Şekil 2.5.) ve bunun sonucunda çok sayıda sitokin, kemokin, adezyon molekülleeri, ikincil inflamatuvar mediatörleeri üreten enzimleer, MHC sınıf II antijenleeri ve apoptoz inhibitörleeri üretilir. Bu faktörleer arasında IL-1 β , IL-6, IL-8, damar hücresi yapışma molekülü 1 (VCAM-1), hücreleer arası yapışma molekülü 1 (ICAM-1), uyarılabilir NO sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) bulunur ve bunlar patojenleere karşı erken koruyucu yanıtta gereklidir [39].

Bu nedenle enfeksiyon veya yaralanma durumunda, özellikle makrofajlar ve epitelial hücrelerde, neredeyse tüm hücrelerde nf- κ b aktivasyonu gözlemlenir. Bu faktör, fagositik ve iltihap hücrelerinin dokuya göç etmesi için de gereklidir [39].



Şekil 2.5. Yara iyileşmesinde kanonik nf-κb yolu [39].

Öte yandan, nf- κ b düzenlenmesindeki hatalar, özellikle aşırı aktivasyonu diyabet, romatoid artrit, psoriasis, vasküler komplikasyonlar, iltihabi bağırsak hastalıkları, damar iltihabı

ve kardiyovasküler hipertrofi vb. birçok kronik hastalığa yol açabilir. Uyarıcı çevresel koşulları nf-kb'nin kişi için koruyucu mu yoksa zararlı mı olacağını belirlenmesinde rol oynar [39].

Yara iyileşmesi sırasında, nf-kb'nin proliferatif etkisi, keratinositlerin çoğalması ve göçünü düzenlediği için, reepitelizasyonda rol oynar. Bu transkripsiyon faktörü aynı zamanda, keratinosit hareketliliğini kolaylaştıran, sitokinler ve büyüme faktörlerinin salgılanması ve stabilitesini düzenleyen matriks metalloproteinazların ifadesini de kontrol eder [39].

2.2.3.5. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Alfa (Tgfa) Geni ve Yara İyileşmesindeki Rolü

Epidermal büyüme faktörü (egf) ailesinin bir üyesidir. Mitojenik bir polipeptittir. Protein kinaz reseptörlerine bağlanır. Tgfa, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve gelişimi için bir sinyal yolunu aktive eden egf-reseptörü için bir ligandır. Tirozin kinaz reseptörüne bağlandığında Akt sinyal yolağını aktive eder. Tgfa, Akt sinyal yolağını aktifleştirerek; epitel gelişimini indükler, hücre çoğalmasını başlatabilir, hücre göçünü başlatır, yara iyileşmesini ve embriyogenezi indükler, aynı zamanda tümöröjenizde de görev alır [48].

Tgfa, apoptozu, EGFR'nin aşağı akımında yer alabilen ve genellikle proliferatif bir sinyal yolunun parçası olan GTP bağlayıcı protein ras'ın aktivasyonu yoluyla etkiler [49]. Tgfa bağlanması, reseptörün dimerizasyonunu ve otofosforilasyonunu tetikler. Fosforile olan reseptör tirozin kinazlar (RTK), adaptör proteinler aracılığıyla Ras proteinini aktive eder. Ras, GDP'yi GTP ile değiştirerek aktif hale gelir. Aktif Ras, Raf'ı (MAPKKK) aktive eder, Raf, MEK'i (MAPKK) fosforile eder ve MEK, ERK'i (MAPK) fosforile eder [50, 51, 52].

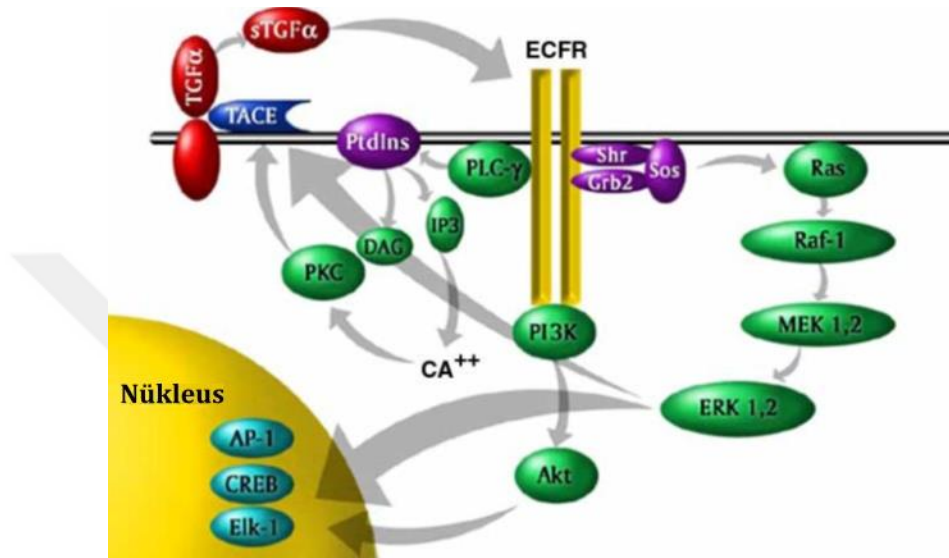
Aktif ERK, nükleusa girerek transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve gen ekspresyonunu düzenler. ERK/MAPK yolağı, hücre döngüsünü düzenleyerek hücre proliferasyonunu teşvik eder. ERK/MAPK yolağı, apoptozu engelleyerek hücre hayatta kalmasını sağlar. ERK/MAPK yolağı, hücre farklılaşmasını düzenler [50, 51, 52].

Mutant ras proteini, GTPaz aktivitesini kaybederek ras sinyal yolunun sürekli aktivasyonu yoluyla tümör teşvik edici etkisini gösterir. Eğer tgfa ortamda sürekli olarak mevcutsa ve EGFR'ye bağlanıyorsa, bu durum ras mutasyonuna benzer şekilde ras yolunu aktive edebilir ve böylece apoptozu düzenleyen sinyalleri etkileyebilir. Özellikle, bir mutasyon ya da TGFa tarafından sürekli uyarılma sonucu ras'ın aşırı ekspresyonu, başlıca apoptozu engelleyici proteinlerden biri olan bcl-2 düzeylerinin artmasına neden olur [53]. Bu gözlem, tgfa'nın bir hayatta kalma faktörü (survival factor) veya anti-apoptotik ajan olarak da değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Fosforile olan RTK'lar, PI3K (Fosfoinozid 3-Kinaz) enzimini aktive eder. PI3K, hücre zarındaki PIP2'yi (Fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat) PIP3'e (Fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat) dönüştürür. PIP3, AKT'yi (Protein Kinaz B) hücre zarına çeker. PDK1 (Fosfoinozid-Bağımlı

Kinaz-1) ve mTORC2 (Mekanistik Hedef Rapamisin Kompleksi 2), AKT'yi fosforile ederek aktif hale getirir [50, 51, 52].

Hücre Hayatta Kalması: AKT, apoptozu engelleyerek hücre hayatta kalmasını sağlar. AKT, mTOR yolunu aktive ederek hücre büyümesini ve proliferasyonunu teşvik eder. AKT, glikoz metabolizmasını ve protein sentezini düzenler. AKT, hücrelerin migrasyonunu ve invazyonunu düzenler [50, 51, 52].

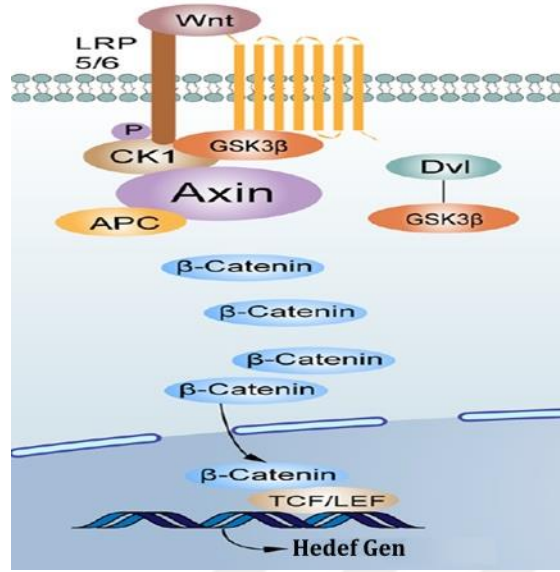


Şekil 2.6. Tgfα'nın başlattığı hücre içi sinyal iletim yolları [54].

2.2.3.6. β-Katenin (Ctnnb1) Geni ve Yara İyileşmesindeki Rolü

β-Katenin, hücre-hücre yapışmasının ve gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde ve koordinasyonunda rol oynayan çift fonksiyonlu bir proteindir. β-Katenin, kanonik Wnt sinyal yolunun aracısı olarak embriyonik gelişim ve neoplazi sırasında önemli bir rol oynayan çok işlevli bir proteindir. Wnt yolu hareketsiz olduğunda, β-katenin adherens bağlantılara katılır. β-katenin sitoplazmik hale geldiğinde fosforile olur ve ubiquinasyona ve degradasyona uğrar. Wnt sinyal yolağının aktivasyonu ile β-katenin fosforilasyonu inhibe edilir. Bu durum β-kateninin sitozolik stabilizasyonuna yol açar ve sonuç olarak çekirdeğe giderek ve Tcf-Lef transkripsiyon faktörlerini bağlamasına ve transkripsiyonu düzenlemesine neden olur. Wnt sinyal yolağı kök hücre biyolojisinde, doku ve organ rejenerasyonunda ve homeostatik devamlılığın sağlanmasında kritik bir öneme sahiptir. Bu yolağa ait mutasyonların ve çeşitli fonksiyon bozukluklarının belirlenmesi ile bu yolak, çeşitli hastalıklarla (Tip II diyabet, Parkinson, Alzheimer, hepatokarsinom, kolon kanseri, lösemi) ilişkilendirilmiştir [55].

Kononik Wnt yolağı



Şekil 2.7. Kanonik Wnt (Wnt/β-katenin) sinyal yolağı. [56]

Wnt/β-catenin yolu, hücre çoğalması ve doku yeniden şekillenmesi dahil olmak üzere birden fazla yara iyileşme sürecinde önemli roller oynar. Ayrıca kök hücre aktivasyonu ve büyüme faktörü ifadesine de katılır. Yetişkin memelilerin iyileşme süreci sırasında yaralı deri bölgesinde embriyonik deri benzeri bir ortama yol açan faktörler bulunur. Bu, yetişkin hücrelerin kök hücre benzeri bir duruma farklılaşmaması veya kök/progenitor hücrelerin yaralı bölgeye alınmasıyla meydana gelir. Wnt/β-catenin yolu, yetişkin kök hücrelerinin aktivasyonunu içeren bu kritik olaylarla yakından ilişkilidir. Wnt/β-catenin sinyalleme, embriyonik gelişim sırasında progenitor hücrelerin kaderinin ve çoğalma durumunun belirlenmesinde ve doğum sonrası dönemde doku homeostazının korunmasında önemli roller oynar [57].

2.2.4. Yara İyileşmesini Olumsuz Etkileyen Faktörler

Yara iyileşmesini olumsuz etkileyen etkenler iki başlıkta verilir, lokal ve sistemik. Lokal etkenler oksijenlenme, enfeksiyon, yabancı cisim, venöz yetmezlik, ödem miktarı ve yara bakımı olarak sayılabilir. Yaş, cinsiyet hormonları, stres, tiroid disfonksiyonu, obezite, DM, ilaç ve uyuşturucu kullanımı, kemoterapi, alkol, sigara ve beslenme sistemik faktörlere örnek olarak verilebilir [58].

2.3. Diyabette Yara İyileşmesi

DM yara iyileşmesini olumsuz etkileyen sistemik faktörlerdendir. DM; nöropati, mikrosirkülasyon bozuklukları, periferik arter hastalıkları, hücresel aktivite değişiklikleri, çeşitli sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin ekspresyon düzeyi değişikliklerine sebep olur ve yaranın iyileşmesini yavaşlatır ve hatta durdurabilir. Diyabetik ülserlerin ve sonuç olarak amputasyonun başlıca sebebi iyileşmenin tamamen durmasıdır [26].

DM'de kollajen sentezi de büyük oranda düşer. Hiperglisemi nedeni ile inflamasyon evresindeki hücresel etkinlik azalır. Makrofajlar morfolojik olarak normal işlevlerini bozacak şekilde değişime uğrar. İyileşmesinin önemli basamaklarından biri olan keratinosit proliferasyonunun inhibe olmasına neden olur. Yara iyileşmesinde elzem olan birçok büyüme faktörünün üretimi azalır. Bütün bu değişiklikler diyabetik yaraların, özellikle de diyabetik ayak yaralarının, normal koşullarda 2-3 gün süren ve yaranın temizlenerek kabuk bağlaması sağlanan inflamasyon evresini sekteye uğratır. İyileşme bu evrede takılı kalır. İnflamasyon evresinde takılıp proliferasyon evresine geçemeyen diyabetik ayak yaraları kronikleşir ve kronik ayak ülserine dönüşürler [26].

2.3.1. Diyabette Nfe2

Transkripsiyon faktörü nükleer faktör-E2 ile ilişkili faktör 2 (nrf2), ekzojen ve endojen oksidatif strese karşı adaptif yanıtı ve hücre göçünü, çoğalmasını, apoptozu ve farklılaşmayı düzenler [59].

Diyabetik yaralarda daha fazla inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve ödem gözlenirken aynı zamanda daha az granülasyon dokusu oluşumu gözlenir, bu da diyabet sırasında bozulmuş bir yara iyileşme sürecine işaret eder. Diyabetik yara dokusunda daha fazla oksidatif DNA hasarı görülür çünkü diyabet hastalarının dokuları halihazırda yüksek oksidatif strese sahiptir. Bu stres, yaralanma sonrasında daha da artar ve yapılan çalışmalarda, farmakolojik olarak artırılan nrf2 düzeylerinin, diyabet kaynaklı bozulmuş yara iyileşmesinde faydalı olduğu ortaya konmuştur. DM'de belirgin bir apoptozis indüksiyonu mevcuttur. Yüksek oksidatif stresin bir sonucu olarak, nfe2 diyabetik yara derisinin epidermal tabakasında büyük ölçüde aktive edilir. Diyabetli hastaların dokularının apoptozise ve telafi edici nrf2 yolağı aktivasyonuna neden olan ciddi oksidatif hasara uğradığı bildirilmektedir [36].

2.3.2. Diyabette Tnf α

Normal yara iyileşmesinde, en yüksek tnf α seviyeleri yaralanmadan 12 ila 24 saat sonra görülür. Yara iyileşmesinin proliferatif fazının tamamlanmasından sonra, tnf α bazal seviyelere döner. Yara onarımının erken fazında, ağırlıklı olarak polimorfonükleer lökositlerde ve daha sonra makrofajlarda ifade edilir. Ayrıca yara kenarındaki hiperproliferatif epitelde de ifade edilir. tnf α , fibroblastların ve keratinositlerin uyarılmasına, büyüme faktörlerinin ifadesine ve antimikrobiyal savunmaların upregülasyonuna katkıda bulunur. Tnf α seviyeleri, kısmen iltihabı teşvik eden artan oksidatif stres yoluyla diyabette yükselir. Tnf α , diyabetik fare yaralarında normal farelerdeki yaralardan üç kat daha yüksek bulunmuştur ve iyileşmeyen venöz bacak ülserlerinden elde edilen yara sıvısında iyileşen ülserlerden üç kat daha yüksek bulunmuştur. Kronik gastrik ülserler ayrıca artmış tnf α ile ilişkilidir [60].

Diyabetik yara iyileşmesinde bozulmuş fibroblast proliferasyonu, artmış $\text{tnf}\alpha$ seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir. $\text{Tnf}'\text{yi}$ in vivo inhibe etmek, çoğalan fibroblastların sayısını önemli ölçüde artırır ancak normal farelerde fibroblast proliferasyonu üzerinde çok az etkisi olduğu gösterilmiştir. Diyabetiklerde fibroblast apoptozu, çok daha yüksektir. Tnf , in vitro fibroblastların, keratinositlerin ve endotel hücrelerinin apoptozunu uyarır. Diyabet ayrıca fibroblastların ve keratinositlerin göçünü de bozar. Yüksek $\text{tnf}\alpha$ seviyeleri hücre göçünü engeller. Diyabetik yaralarda $\text{tnf}'\text{nin}$ nötralizasyonu yara anjiyogenezini ve kapanmasını iyileştirir. $\text{Tnf}'\text{yi}$ bloke etmek, diyabetik yaralarda miR-200b gibi küçük kodlamayan RNA'ların aşırı üretimini azaltır ve bu da globin transkripsiyon faktörü bağlayıcı protein 2 (GATA2) ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2'nin (VEGFR2) ifadesini iyileştirir; bunların her ikisi de anjiyogenezisi teşvik eder [60].

Diyabetik yaralarda, yara bölgesindeki hücrelerin insüline yanıt verme yeteneği azalır. Hücrelerin $\text{TNF}\alpha$ ile uzun süreli tedavisi, insülin duyarlılığının azalmasına katkıda bulunur. Bu nedenle, bozulmuş diyabetik yara iyileşmesinin önemli bir bileşeni, kısmen yüksek tnf düzeyleri tarafından aracılık edilen, yara iyileşme sürecine katılan hücrelerin insülin uyarımına karşı duyarlılığının azalmasından kaynaklanıyor olabilir [60].

2.3.3. Diyabette Vegfa

Diyabetik hastalarda gecikmiş yara iyileşmesinin birincil nedenlerinden biri, neovaskülarizasyonun bozulmasına neden olan vasküler endotel büyüme faktörü (vegf) ekseninin bozulmuş işlevidir [61]. Çalışmalar hipoksi ile indüklenen faktör-1 α / vasküler endotelial büyüme faktörü (HIF-1 α /vegf) ekseninin bozulmuş işlevinin, diyabetle ilişkili bozulmuş anjiyogenezisin altında yatan başlıca mekanizmalardan biri olduğunu göstermektedir. HIF-1, post-translasyonel olarak düzenlenen bir α -alt birim (HIF-1 α) ve sürekli olarak eksprese edilen bir β -alt birimden (HIF-1 β) oluşan bir heterodimerdir ve oksijen homeostazının başlıca düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir. Normal oksijen koşullarında, HIF-1 α , translasyon sonrası hızla hidroksillenir ve yıkılır; bu süreç, oksijene bağımlı bir enzim ailesi olan HIF prolin-4-hidroksilazlar (HIF PHD'ler) tarafından gerçekleştirilir. Hipoksik doku koşullarında, HIF-1 α 'nın PHD'ler tarafından hidroksillenmesi azalır. Bunun sonucunda HIF-1 α proteinleri stabilize olur ve başta vegf olmak üzere, anjiyogenez için kritik olan birçok genin ekspresyonunu başlatır. Diyabet durumunda, HIF-1 α 'nın fonksiyonel aktivitesi azalır. Bu değişiklik, yumuşak doku iskemisine yanıt olarak vegf'nin yeterince artırılamamasına ve buna bağlı olarak bozulmuş anjiyogenez ve yara iyileşmesine yol açar [45].

Diyabetik ratlarda kutanöz yara iyileşmesi üzerine yapılan bir çalışmada vegf sinyalinin yukarı regülasyonu ile endotel hücrelerin anjiyojenik aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [62]. Diyabetli hastalarda yara çevresindeki düşük kan basıncıyla ilişkili doku onarım oranları azalır.

Tam kalınlıkta eksizyonel yaralamada, vegf seviyeleri başlangıçta artar ancak sonunda 5. güne kadar tespit edilemeyen seviyelere düşer. Bu süre zarfında granülasyon dokusu birikir ve vegf diyabetli olmayan, normal dokuda zirve yapar. Yapılan çalışmalar, vegf dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörlerinin sentezinin azaldığını göstermektedir. Diyabetik yaralar, hücresel infiltrasyon, granülasyon dokusu birikimi ve yeniden epitelizeasyonla iyileşir. Deneysel veriler vegf'nin epitelizeasyonu ve kollajen üretimini uyardığını göstermektedir [44].

2.3.4. Diyabette Nf- κ b1 ve Nf- κ b2

Kronik inflamasyon ve oksidatif stres diyabetik anjiyopati ve polinöropati ile bağlantılıdır ve tnfa, interlökin 6 (IL-6) ve interlökin 1 alfa (IL-1 α) dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokin genlerinin artan ekspresyonunun bir sonucudur. DM'de oksidatif stres ile ilişkili ileri glikasyon son ürünleri (AGER) reseptörü genlerinin ve bunların ekspresyonunu düzenleyen nf- κ b1 geninin ekspresyonunda da artış meydana gelir [63].

Nf- κ b, inflamasyonu ve bağışıklık tepkilerini düzenlemede önemli bir rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. İyileşme sürecinde önemli bir transkripsiyonel faktör olan nf- κ b, anahtar sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salgılanması, hücre çoğalması, matris metalloproteinazların ekspresyonunun modülasyonu ve doğuştan gelen immün tepkisinin aktivasyonu gibi hayati işlevleri düzenler. Diyabetik yaralarda, kronik inflamasyon nf- κ b yolunun aktivasyonuna yol açar. Diyabetik yaralarda nf- κ b2 yolağı, hiperglisemi, oksidatif stres ve ileri glikasyon son ürünleri de dahil olmak üzere birden fazla faktör tarafından aktive edilir. Hiperglisemi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve protein Kinaz-C'nin (PKC) aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla nf- κ b'yi aktive eder. Bu da pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini daha da artırarak, endotel hücre fonksiyonunu bozar ve anjiyogenezi inhibe eder [39].

2.3.5. Diyabette Tgfa

Kronik diyabetik yaralarda büyüme faktörlerinin seviyesi oldukça düşüktür. Tgfa trombositler, keratinositler, makrofajlar, fibroblastlar ve lenfositler tarafından salgılanır. Keratinosit göçünü ve çoğalmasını artırdığı gösterilmiştir. İn vivo çalışmalarda, tgfa kısmi kalınlıktaki yaralarda yara epitelizeasyonunun erken uyarılmasında ve sürdürülmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. Kronik diyabetik yaralarda tgfa ekspresyonu düşer. Bu durum MAPK ve AKT yollarının aktivasyonunun azalmasına neden olur. Bu da hücrelerin yaralı bölgeye göçünü, proliferasyonunu ve farklılaşmasını sekteye uğratarak yara iyileşmesini olumsuz etkiler [48, 50].

2.3.6. Diyabette Wnt/ β -katenin

Wnt/ β -katenin sinyal yolu, DM'nin ve komplikasyonlarının görülmesi ve ilerlemesiyle ilgili çeşitli biyolojik sürecin değişmesine doğrudan katılır. Diyabetik yara restorasyonu sırasında Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu cilt kalınlığını ve pigmentasyonunu uyarır. Wnt/ β -katenin yolunun

artan düzenlemesinin yüksek glikoz baskılanmış hücrelerin etkisini artırdığı bildirilmiştir. Wnt/ β -katenin yolunun azalmış aktivitesinin DM tarafından başlatılan R-spondin (RSPO) azalmasından kaynaklandığı ve diyabetik yara iyileşmesindeki düzensizliğin ana nedenlerinden biri olduğu ileri sürülmektedir. RSPO protein ailesi, Wnt sinyal yolunun güçlendiricileri olan RSPO 1 ila 4 salgılanan proteinlerden oluşur. RSPO'lar, membrana bağlı ubiquitin ligazları ZNRF3 (çinko ve yüzük parmağı 3) ve RNF43'ün (yüzük parmağı 43) inaktivasyonu yoluyla Wnt reseptörlerinin ve bunların yardımcı reseptörlerinin stabilizasyonundan sorumludur. Bu ligazlar, ubiquitilasyon aracılı parçalanma için Wnt reseptörlerini hedef alarak Wnt yolunu antagonize eder. Wnt/ β -katenin yolunun ayarlanması veya değiştirilmesinin diyabetik yara restorasyonunu iyileştirdiği bilinmektedir ve Wnt sinyallemesiyle aktive edilen hücrelerin nakledilmesinin diyabetik yara restorasyonunu desteklediği öne sürülmektedir. Diyabetik yaralarda, GSK3 β , kaspaz 3, NF- κ B ve β -katenin yollarının aktivitesinde önemli bir azalma vardır. Bir serin/treonin kinaz olan GSK3 β , hücresel çoğalma ve hayatta kalma için çeşitli sinyal yollarının stratejik bir düzenleyicisi olup yaygın olarak ifade edilir ve LRP5/6 üzerindeki Wnt reseptörlerinin fosforilasyonu konusunda kritik bir rol oynar, bu şekilde Wnt/ β -katenin yolunun stabilizasyonuna neden olur. GSK3 β 'nin inhibisyonu, yara onarım süreci sırasında hücre çoğalması ve farklılaşmasında kritik öneme sahiptir ve GSK3 β aracılı Wnt/ β -katenin yolunun modülasyonu diyabetik yara iyileşmesini ilerletir [64-66].

2.4. Diyabetik ve Non-Diyabetik Koşullarda Sinyal Yolları Arasındaki Etkileşim

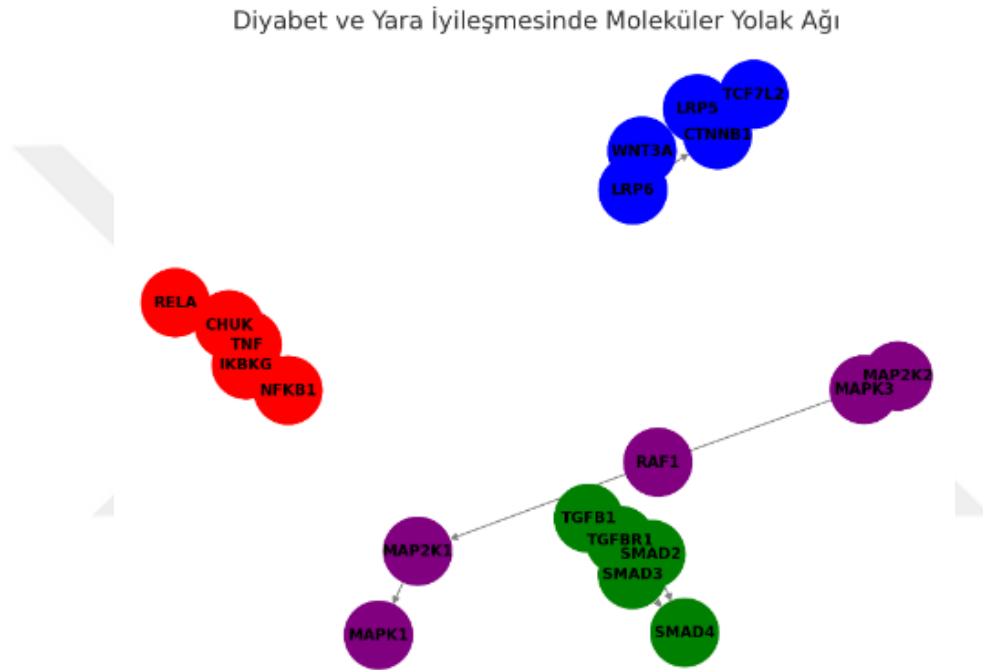
Wnt/ β -Katenin yolu, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve doku onarımında rol oynar. WNT3A, hücre dışı ortamda salgılanarak LRP5 ve LRP6 reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma, ctnnb1 seviyelerini arttırarak hücre çekirdeğine taşınmasını sağlar. Ctnnb1, TCF7L2 ile etkileşerek gen ekspresyonunu düzenler. Diyabetik koşullarda WNT3A ekspresyonu azalabilir, β -Katenin aktivitesi düşer, fibroblast proliferasyonu ve re-epitelizasyon yavaşlar. Hiperglisemi, Wnt sinyallerini baskılayarak epitel onarımını geciktirebilir [64-66].

Nf- κ B yolu, inflamasyonu düzenler ve immün yanıtta kritik rol oynar. Tnf, nf- κ B sinyalini başlatır. Nf- κ B1 ve RELA, IKBKG üzerinden aktivasyon sinyali alır. IKBKG (NEMO), CHUK (IKK α / β) tarafından fosforile edilir ve nf- κ B kompleksi çekirdeğe taşınır. Diyabetik koşullarda tnfa seviyeleri artar, nf- κ B aşırı aktivasyonuna sebep olur, kronik inflamasyon gelişir ve yara iyileşmesi yavaşlar. Kronik inflamasyon nedeniyle aşırı aktive olabilir ve iyileşmeyi geciktirebilir [67].

Tgf β Yolu, fibroblast aktivasyonu, kollajen üretimi ve doku rejenerasyonunda rol oynar. Tgf β 1, TGFBR1 reseptörüne bağlanır. Bu bağlanma, SMAD2 ve SMAD3 fosforilasyonunu tetikler. SMAD2/3, SMAD4 ile kompleks oluşturarak çekirdeğe gider ve hedef genlerin ekspresyonunu

düzenler. Diyabetik koşullarda $\text{tgf}\beta 1$ seviyeleri düşer, fibroblast migrasyonu ve ECM üretimi azalır, doku onarımı gecikir. $\text{Tgf}\beta$ aktivitesi azalırsa fibroblast fonksiyonları bozulur [68, 69].

MAPK Yolu, hücre proliferasyonu, stres yanıtı ve doku tamirinde önemli bir yoldur. RAF1, MAP2K1 (MEK1) ve MAP2K2 (MEK2)'yi fosforile eder. Bu fosforilasyon, MAPK1 (ERK2) ve MAPK3 (ERK1) aktivasyonunu sağlar. MAPK aktivasyonu, fibroblast ve keratinosit proliferasyonunu destekler. Diyabetik koşullarda, ERK1/2 aktivitesi azalır, fibroblast proliferasyonu ve yara kapanması gecikir. MAPK aktivitesindeki değişiklikler hücre proliferasyonunu ve apoptozu etkileyebilir [70].



Şekil 2.8. Diyabet ve yara iyileşmesinde moleküler yolak ağı.

2.4.1. Yollar Arasındaki Çapraz Etkileşimler

Wnt/ β -katenin yolu, $\text{nf-}\kappa\text{b}$ aktivitesini baskılar. $\text{Nf-}\kappa\text{b}$ aşırı aktivasyonu, Wnt/ β -katenin sinyallerini inhibe eder. Ctnnb1 , $\text{nf-}\kappa\text{b}$ ile rekabet ederek inflamasyonu baskılar. Diyabetik koşullarda $\text{nf-}\kappa\text{b}$ yolu kronik olarak aktive olduğu için Wnt sinyali baskılanır. Hiperglisemi $\text{nf-}\kappa\text{b}$ aktivasyonuna sebep olur, ctnnb1 ekspresyonu azalır, epitel hücre proliferasyonu zayıflar, iyileşme gecikir [71].

2.4.1.1. $\text{Nf-}\kappa\text{b} \leftrightarrow \text{Tgf}\beta$ Etkileşimi

$\text{Tnf}\alpha$ ($\text{nf-}\kappa\text{b}$ yolu), $\text{tgf}\beta 1$ geninin ekspresyonunu baskılar. $\text{Tgf}\beta$, anti-inflamatuar bir yol olarak $\text{nf-}\kappa\text{b}$ 'yi inhibe eder. Diyabetik koşullarda yüksek $\text{tnf}\alpha$ seviyeleri, $\text{tgf}\beta$ aktivitesini baskılayarak fibroblast aktivasyonunu azaltır. $\text{Tnf}\alpha$ artışı $\text{tgf}\beta$ sinyalinin zayıflamasına, bu da

fibroblastların yeterince aktive olamamasına neden olur. Sonuç olarak, kollajen sentezi azalır, skar dokusu zayıf olur [68, 69, 71].

2.4.1.2. Wnt/ β -Katenin $\leftrightarrow$ Tgf β Etkileşimi

Wnt ve tgf β yolları, fibroblastların aktivasyonu ve epitel hücre proliferasyonu için birlikte çalışır. β -katenin, SMAD3 ile etkileşerek tgf β hedef genlerini düzenler. Diyabetik koşullarda: Wnt baskılanırsa, tgf β sinyali de zayıflar ve yara onarımı yavaşlar. Wnt/ β -katenin sinyali zayıflar, SMAD3 aktivitesi azalır, tgf β aracılı fibroblast aktivasyonu düşer ve yara iyileşmesi gecikir [68, 69, 71].

2.4.1.3. Tgf β $\leftrightarrow$ MAPK Etkileşimi

Tgf β , MAPK sinyalleşmesini aktive eder. SMAD proteinleri, MAPK yoluyla fosforile eder ve aktivite değişikliği yaşanır. Diyabetik koşullarda hiperglisemi MAPK aktivitesini değiştirir ve tgf β aracılı fibroblast farklılaşmasını bozar. Düşük tgf β aktivitesi ERK1/2 (MAPK) sinyalinin azalmasına neden olur. Fibroblast proliferasyonu ve migrasyonu zayıflar ve yara iyileşmesi gecikir [70].

2.4.1.4. MAPK $\leftrightarrow$ Nf- κ b Etkileşimi

MAPK yolu, Nf- κ b sinyalleşmesini destekleyebilir veya baskılar. ERK1/2 aktivasyonu, nf- κ b'nin inflamatuvar yanıtını güçlendirir. Diyabetik koşullarda aşırı aktif nf- κ b, ERK1/2'yi baskılayarak proliferasyonu yavaşlatır. Diyabetik ortamda yüksek nf- κ b aktivitesiyle ERK1/2 baskılanır, fibroblastlar yeterince çoğalamaz ve yara iyileşmesi gecikir [70].

2.5. Manyetik Alan

Bütün yüklü parçacıklar; etraflarında elektrik alan oluştururlar. Elektrik alanlar, diğer parçacıklarca algılanır ve alanın etkisiyle oluşan kuvvet bu parçacıkların hareketlenmesini sağlar. Bu parçacıkların hareketi elektrik akım olarak tanımlanır. Elektrik akım ise manyetik alan (MA) oluşturur. Bu duruma bir örnek olarak bir telden geçen akımın bu telin civarında oluşturduğu manyetik alan verilebilir. Tam tersi olarak değişken bir manyetik alan ise telden akım geçmesine neden olur [72].

Manyetik alan doğru DC ve alternatif AC manyetik alan olarak ikiye ayrılır. Manyetik alan şiddeti Tesla (T) veya Gauss (G) ile verilir ve 1G=0,1 mT'dir. Manyetik alan dalgaları kesintisiz bir şekildeyse sürekli, belirli frekanslarla atımlar şeklinde yineleniyorsa pulslu manyetik alan (PMA) olarak isimlendirilir. Vücuttaki yüklü parçacıklar, bu parçacıkları biyokimyasal etkileşimleri manyetik alandan etkilenir. Manyetik alan ile dokulara enerji verilebilir, vücuttaki iyonlarda polarizasyona ve hatta titreşime sebep olunabilir. Hücre membranı, iyon bağlanması, iyon

taşınması, sinyal iletim yolları aracılığıyla MA'nın enerji aktardığı dokulardaki ana hedeftir [73, 74].

MA'nın ve PMA'nın insan bedenine etkileriyle ilgili çok sayıda çalışma vardır ve bunların bir kısmı iyileşmeyi olumlu etkilediğini ileri sürmektedir. MA üzerine yapılan çalışmalar, MA'nın kemik iyileşmesini ve sinir rejenarasyonunu artırdığını, venöz deri ülserlerinin tedavisinde olumlu etki yaptığını, analjeziyi inhibe ettiğini, kanserin erken evrelerinde yaşam süresini arttırdığı, venöz ülserlerde yara derinliğini ve acıyı düşürdüğünü, iskemik hasarı azalttığı vb. sonuçlar bildirmiştir [75-78].

Diyabetli ve diyabetsiz bireylerde düşük frekanslı PMA'nın yara iyileşmesine etkilerini araştıran çalışmalar vardır. Bu çalışmalar yarada PMA'nın hücre proliferasyonunu, çeşitli büyüme faktörlerinin ekspresyonunu arttırdığını, kollajen sentezini arttırdığını, yara iyileşmesini hızlandırdığını, yaradaki gerim gücünün yükseldiğini bildirmiştir. Literatürde yara iyileşmesinin erken safhalarında miyofibroblast sayısında ve kollajen sentezinde artış, daha düzenli kollajen yapılanması ve biyofiziksel parametrelerde olumlu yönde artış olduğu bildirilmiştir. Buna karşın iyileşmenin ileri safhalarında PMA'nın diyabetli sıçanlarda yara iyileşmesinin olumsuz etkilediğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır [6-9, 79].

2.6. İn Silico Analizlerin Tanımı ve Kapsamı

In silico analiz, biyolojik sistemlerin bilgisayar tabanlı yöntemlerle modellenmesi, simülasyonu ve analizi süreçlerini ifade eden bir yaklaşımdır. Latince “*silikon içinde*” anlamına gelen bu kavram, bilgisayar çipleri üzerinde yürütülen hesaplamalara atıfta bulunmaktadır. Biyolojik araştırmalarda in vivo ve in vitro yaklaşımlara ek olarak dijital modelleme ve analizler aracılığıyla deneysel çalışmalara destek sağlanarak elde edilen verilerin yorumlanmasına ve yeni hipotezlerin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır [80]. In silico analizler, özellikle yüksek boyutlu “omik” verilerin (genomik, transkriptomik, proteomik, epigenetik) bütüncül biçimde değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Bu yöntemlerle genetik varyasyonlar, gen/protein etkileşimleri, biyolojik yollar ve moleküler düzeydeki düzenleyici mekanizmalar kapsamlı olarak analiz edilebilmektedir [81, 82]. Son yıllarda bu tekniklerin önemi, biyobelirteç keşfi, ilaç hedeflerinin tanımlanması, hastalık mekanizmalarının modellenmesi ve bireyselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gibi alanlarda belirgin biçimde artmıştır [83]. In silico yöntemler, biyolojik verilerin hızlı, güvenilir ve düşük maliyetli biçimde işlenip yorumlanmasına olanak tanırken, geleneksel yöntemleri tamamlayıcı bir rol üstlenmektedir. İn silico analizlerin temel hedefleri arasında genetik etkileşimlerin ortaya konması, biyobelirteç adaylarının belirlenmesi ve sistem biyolojisine dayalı modellemelerin gerçekleştirilmesi yer almaktadır. Böylece moleküler düzeyde kapsamlı bir anlayış sağlanarak deneysel çalışmalara yön verecek yeni hipotezlerin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Bu tahmin araçlarında yalancı pozitif oranını

(FPR) düşük tutulsada, miRNA hedef tahminlerinde FPR genellikle yüksektir [84]. Bu nedenle in silico tahminler, biyolojik doğrulama olmadan kesin sonuç olarak kabul edilmemelidir.

2.7. İn Silico Sistem Biyolojisi Yaklaşımları

2.7.1. Proteomik Analizler

Hücrede sentezlenen tüm proteinlerin yapısal, nicel ve fonksiyonel düzeyde karakterize edilmesini amaçlayan sistem biyolojisi yaklaşımlarıdır. Bu analizler, hücresel işlevlerin bütüncül bir şekilde anlaşılması ve biyomoleküler süreçlerin haritalandırılması açısından kritik öneme sahiptir. Henüz işlevi tanımlanmamış gen veya proteinlerin potansiyel biyolojik rollerine ilişkin öngörüler; genomik dizilim verileri, evrimsel korunmuşluk analizi ve yapısal benzerlik değerlendirmeleri kullanılarak yapılabilmektedir. Homoloji tabanlı modelleme, yapısal modelleme ve motif analizi gibi biyoinformatik tabanlı fonksiyon tahmin algoritmaları yaygın olarak kullanılmaktadır [81, 85].

2.7.2. Protein-Protein Etkileşim (PPI) Analizleri

Hücre içi işlevlerin yürütülmesinde rol alan proteinler arasındaki fiziksel ve işlevsel ilişkilerin ortaya konulmasına yönelik ağ temelli biyoinformatik yaklaşımlardır. Bu yöntemler, özellikle sinyal iletimi, metabolik kontrol ve gen düzenleme gibi karmaşık biyolojik süreçlerde merkezi proteinlerin tanımlanmasına olanak tanımaktadır. PPI analizlerinde STRING, BioGRID ve IntAct gibi veri tabanları yaygın olarak kullanılmakta olup; bu platformlar deneysel veriler, hesaplamalı tahminler ve literatür tabanlı ilişkileri entegre ederek yüksek güvenilirlikte ağ modelleri oluşturur [81, 86]. STRING ayrıca DISEASES modülü ile, belirli gen ve proteinlerin insan hastalıkları ile bilinen veya tahmin edilen ilişkilerini literatür ve veri tabanı taramaları aracılığıyla sunarak transkripsiyonel biyoloji açısından önemli bir bağ kurmaktadır.

2.7.3. İşlevsel Zenginleştirme Analizleri

Gen veya protein kümelerinin biyolojik anlamını ortaya koymaktadır. Gene Ontology (GO) temelli biyolojik süreç, moleküler fonksiyon ve hücresel bileşen kategorileri bu analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. GO biyolojik süreç analizleri, gen setlerinin belirli fizyolojik olaylar, metabolik aktiviteler veya hücresel yanıt mekanizmaları ile ilişkisini ortaya koymaktadır. Sinyal yolağı analizlerinde ise Reactome veri tabanı en çok tercih edilmektedir. Reactome, hücresel sinyal iletimi, metabolik yollar ve hastalık mekanizmaları gibi kapsamlı biyolojik süreçleri ayrıntılı olarak tanımlayarak ağ tabanlı görselleştirmeler ile desteklemektedir [87-89].

2.7.4. Biyolojik Yolakların Modellenmesi

Moleküler etkileşimlerin sistem düzeyinde anlaşılması açısından tamamlayıcı bir yaklaşımdır. Hücresel sinyal iletim mekanizmaları, metabolik ağlar ve hastalıklarla ilişkili

biyolojik yollar; in silico ortamda matematiksel ve algoritmik yöntemler kullanılarak modellenmektedir. Bu tür modellemeler, moleküler etkileşimlerin dinamiklerini çözümlmeye, işlevsel bozulmaların sistemsel etkilerini belirlemeye ve olası terapötik hedeflerin tanımlanmasına imkân tanımaktadır. Bu amaçla KEGG, Reactome, BioCyc ve g:Profiler gibi yolak veri tabanları; Cytoscape ve Gephi gibi ağ görselleştirme platformlarıyla birlikte yaygın şekilde kullanılmaktadır [90, 91].

2.7.5. miRNA-Hedef Gen İlişkilerinin İncelenmesi

mikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel düzeyde düzenleyen küçük, kodlamayan RNA'lar olup, epigenetik kontrolün önemli bileşenleridir. Küçük ve uzun kodlamayan RNA'lar (miRNA, lncRNA, snoRNA), post-transkripsiyonel gen düzenlemesinde rol oynayan temel epigenetik faktörlerdir. In silico ortamda bu RNA'ların hedeflediği genler; sekans benzerliği, bağlanma enerjisi ve evrimsel korunmuşluk gibi kriterlere dayalı algoritmalarla öngörülür. Böylece epigenetik düzenlemenin hücresel fonksiyonlar üzerindeki etkisi daha net biçimde ortaya konabilmektedir. In silico analizlerde, miRNA'ların hedeflediği genler; TargetScan, miRDB, miRTarBase ve HMDD gibi veri tabanları ile tahmin edilerek, bu regülatörlerin hücresel süreçlerdeki rolü ortaya konulabilmektedir. miRNA-hastalık ilişkileri hem deneysel olarak doğrulanmış hem de tahmine dayalı verileri kullanılarak epigenetik düzenleme mekanizmalarının ve hastalıklarla ilişkili moleküler yolların aydınlatılmasında önemli katkılar sağlamaktadır [83, 92].

Tablo 2.1. İn silico analizlerde yaygın olarak kullanılan veri tabanları, analiz türleri ve kullanım amaçları.

Yöntem Kategorisi	Örnek Yöntemler / Araçlar	Kullanım Amacı
Gen ve Protein Fonksiyonlarının Tahmini	Homoloji tabanlı modelleme, yapısal modelleme, motif analizi [81,85]	Henüz işlevi tanımlanmamış gen/proteinlerin biyolojik rollerini öngörmek
Protein-Protein Etkileşim (PPI) Analizi	STRING, BioGRID, IntAct [81, 86]	Proteinler arasındaki fiziksel ve işlevsel ilişkileri ortaya koymak
İşlevsel Zenginleştirme ve Yolak Analizleri	GO, Reactome, KEGG, BioCyc, g:Profiler [82, 91]	Gen/protein kümelerinin biyolojik süreçlerle ilişkisini belirlemek
miRNA-Hedef Gen Analizleri	TargetScan, miRDB, miRTarBase, HMDD [83, 92, 93]	miRNA-gen ve miRNA-hastalık ilişkilerini tahmin ve doğrulama
Ağ Analizi ve Görselleştirme	Cytoscape, Gephi [94, 95].	Moleküler ağların görselleştirilmesi ve merkezi düğümlerin belirlenmesi
İlaç Keşfi ve Toksisite Analizleri	Moleküler Docking, Virtual Screening, ADMET [96-98].	Yeni ilaç adaylarının hedef-protein etkileşimlerini ve toksisite profillerini öngörmek

2.8. İn silico Analizlerinin Kullanım Alanları

2.8.1. Biyobelirteç ve İlaç Hedefi Keşfi

In silico analizler, özellikle kanser, diyabet, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kompleks hastalıkların moleküler düzeyde incelenmesinde biyobelirteçlerin ve potansiyel ilaç hedeflerinin belirlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Gen ekspresyon profilleri, protein-protein etkileşim ağları ve miRNA-hedef gen ilişkileri üzerinden yürütülen sistem biyolojisi temelli analizler; hem erken tanı için kullanılabilecek biyobelirteç adaylarının hem de farmakolojik müdahalelere açık moleküler hedeflerin tanımlanmasını sağlamaktadır [99, 100].

2.8.2. Deneysel Verilerin Desteklenmesi ve Hipotez Geliştirme

Yüksek boyutlu deneysel veriler (RNA-Seq, mikroarray, proteomik) in silico yöntemlerle analiz edildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bulunan gen veya protein değişimleri biyolojik bağlamda yorumlanabilmektedir. Bu süreç, fonksiyonel zenginleştirme (Gene Ontology – GO), yolak analizi (Reactome, KEGG) ve ağ modellemeleri ile desteklendiğinde, deneysel bulgular yalnızca istatistiksel açıdan değil, aynı zamanda sistem biyolojisi düzeyinde de anlam kazanmaktadır [82]. Böylece daha hedefe yönelik, biyolojik olarak tutarlı ve translasyonel değeri yüksek hipotezler geliştirilebilmektedir.

2.8.3. Hastalık Mekanizmalarının Modellenmesi

Kompleks hastalıkların (diyabet, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar vb.) genetik, epigenetik ve moleküler altyapısı in silico ortamda bütüncül olarak modellenenebilir. Bu yaklaşımlar; gen ekspresyon verileri, yolak etkileşimleri, epigenetik regülasyon ve protein-protein etkileşimlerinin entegre edilmesiyle hastalığa özgü moleküler ağlar oluşturulabilmektedir. Bu ağlar, kritik moleküler düğüm noktalarını belirleyerek olası tedavi hedeflerini tanımlar [99, 100]. Ayrıca, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), yapısal varyantlar ve epigenetik işaretler gibi faktörler; GWAS ve poligenik risk skorları aracılığıyla bireysel hastalık yatkınlığı açısından değerlendirilebilmektedir. Bu tür analizler, kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları açısından önemli bir değer taşımaktadır [101, 102].

2.8.4. İlaç Keşfi ve Toksisite Analizleri

In silico yaklaşımlar, ilaç geliştirme sürecinde hem moleküler hedeflerin doğrulanmasında hem de potansiyel aday bileşiklerin toksikolojik profillerinin öngörülmesinde önemli avantajlar sağlayan analizlerdir.

Moleküler Docking ve Sanal Tarama (Virtual Screening); biyolojik hedef proteinlerle ligand etkileşimlerinin yapısını ve bağlanma afinitesini analiz ederek en güçlü adayları önceliklendirmektedir [96].

ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination, Toxicity) Tahminleri; aday bileşiklerin farmakokinetik ve toksikolojik özelliklerinin klinik öncesi aşamada değerlendirilmesini yaparak klinik başarısızlık riskini azaltmaktadır [103].

2.9. İn Silico Analizlerin Güvenilirliği ve Sınırlılıkları

STRING, miRDB, TargetScan ve HMDD gibi veritabanları, moleküler düzeyde potansiyel biyolojik bağlantıların ortaya konulmasında güçlü ve sistematik bilgiler sunmaktadır [81,83, 92]. Ancak bu araçlar, doğrudan doğrulayıcı değil; hipotez üreten, ön değerlendirme niteliğinde yaklaşımlar olarak ele alınmalıdır. Tahminlerin güvenilirliği; kullanılan algoritmaların yapısına, veritabanlarının güncelliğine ve ilişki/bağlanma skorlarının istatistiksel gücüne bağlıdır. Örneğin, miRDB ve TargetScan analizlerinde hedef skoru ≥ 90 olan eşleşmeler genellikle daha güvenilir kabul edilmektedir [92]. Bununla birlikte, STRING veritabanındaki etkileşimlerin bir bölümü doğrudan deneysel kanıtlara değil; literatür madenciliği veya dolaylı bağlantılara dayanmaktadır [81]. Benzer şekilde, HMDD veritabanı büyük ölçüde deneysel literatüre dayalıdır; ancak yeni keşfedilmiş veya henüz yayımlanmamış ilişkileri içermeyebilir [83].

Ayrıca, in silico yöntemlerin sınırlılıkları da göz önünde bulundurulmalıdır. Öncelikle, tahmin edilen ilişkilerin biyolojik geçerliliğinin sağlanabilmesi için in vitro veya in vivo deneylerle doğrulanması gereklidir [100]. Bunun yanı sıra, kullanılan veri tabanları çoğunlukla türler arası ortalama değerleri yansıttığından, belirli bir tür ya da dokuya özgü biyolojik farklılıkları tam olarak temsil edemeyebilir. Analizler, gerçek dokularda bulunan karmaşık biyokimyasal ve hücresel mikroçevre koşullarını yansıtmada da sınırlı kalabilmektedir. Diğer yandan, birçok miRNA'nın aynı anda çok sayıda farklı geni hedeflemesi biyolojik özgüllüğü azaltabilmektedir. Bu durum yalnızca hedeflenen biyolojik süreçleri değil, ilişkili olmayan diğer moleküler mekanizmaları da etkileyebilir. Örneğin, yara iyileşmesinde görevli bir geni baskılayan bir miRNA, aynı zamanda bağışıklık yanıtı, hücre döngüsü veya metabolizma ile ilişkili genlerin ekspresyonunu da değiştirebilir. Böyle bir çoklu hedefleme, öngörülme-ye-ye etkilerin ortaya çıkmasına yol açarak inflamasyonun artması, hücre proliferasyonunun bozulması veya anjiyogenezin gereksiz şekilde tetiklenmesi gibi potansiyel biyolojik yan etkilere neden olabilir [83].

Sonuç olarak, in silico analizlerden elde edilen bulgular, deneysel verilerle desteklendiğinde biyolojik bağlamda daha anlamlı ve güvenilir hale gelmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında kullanılan biyolojik materyaller, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda yürütülmüş olan "Pulslu Manyetik Alanın (PMA) Diyabetik Sıçan Deri İyileşmesi Üzerine Etkileri" başlıklı yüksek lisans tez çalışmasında elde edilen ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı arşivinde -20°C'de uygun koşullarda muhafaza edilen sıçan deri dokularıdır [104].

Söz konusu çalışmada, insizyonel yara modeli oluşturulmuş toplam 35 adet, 10-12 haftalık erkek Wistar albino sıçan kullanılmış ve hayvanlar beş gruba randomize edilmiştir. Kontrol (C) grubunda herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Non-diyabetik sham (NDS) grubunda sırt bölgesinde insizyon açılmış, ancak PMA uygulanmamıştır. Diyabetik sham (DS) grubunda streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulduktan sonra sırt bölgesine insizyon açılmış ve PMA uygulanmamıştır. Non-diyabetik deney (NDD) grubunda insizyon açılmış ve PMA uygulaması yapılmıştır. Diyabetik deney (DD) grubunda ise STZ ile diyabet oluşturulduktan sonra sırt bölgesine insizyon açılmış ve hayvanlar PMA uygulamasına maruz bırakılmıştır [104].

3.1. Pulslu Manyetik Alan (PMA) Uygulama Prosedürü

PMA uygulaması, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda bulunan Helmholtz bobin çiftinden oluşan özel bir sistem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarındaki sıçanlar (NDD ve DD), 21 gün boyunca, her gün aynı saatte, günde 4 saat süreyle; 0,03 ms puls süresi, 15 Hz frekans ve 0,5 mT şiddetinde PMA'ya maruz bırakılmıştır. Sham gruplarındaki hayvanlar (NDS ve DS) aynı süre ve koşullarda, kapalı konumdaki sistemde bekletilmiştir. Uygulamalar sırasında ortam sıcaklığı (22-24°C) ve bağıl nem (%55-60) sabit tutulmuştur [104].

3.2. Doku İzolasyonu

Deney süresi sonunda hayvanlar anestezi doz aşımı ile sakrifiye edilmiştir. Sırt bölgesinden, insizyon bölgesini kapsayacak şekilde yaklaşık 4 cm x 2 cm boyutlarında deri dokusu izole edilmiştir. Bu dokular, ileri moleküler analizlerde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, yukarıda özetlenen hayvan deneylerine yeniden müdahale edilmemiş, yalnızca eldeki arşiv dokuları kullanılmıştır. Orijinal çalışmanın etik onayı Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 20/09/2016 tarihli ve 2016/33 sayılı karar ile alınmıştır [104]. Bu çalışma için de 11/09/2023 tarihli ve 2023/38 sayılı karar ile HDYEK iznine tabi olmadığına karar verilmiştir.

3.3. RNA İzolasyonu [triplicate]

Örnekler homojenize edildi. Bunun için öncelikle 1,5 ml'lik eppendorf mikro santrifüj tüpünde ve -20°C'de muhafaza edilen doku oda sıcaklığında çözüldü. Bistüri ve penset yardımı ile petri kabına yerleştirilen deri dokusu parçalandı. 750 ml trizol (Hibrogen, 0819-CC-638), 250 ml dH₂O ile dilüe edildi. 100 mg doku başına 1 ml trizol eklenerek bistüri yardımıyla ile iyice parçalandı ve vortekslendi. Sonrasında oda ısısında 15 dakika bekletildi.

RNA eldesi için 1 ml trizol başına 0,2 ml chloroform:isoamyl alcohol (24:1) eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Ardından 13,000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlendi ve üstte oluşan sıvı faz başka bir tüpe alındı.

Sonrasında ise RNA'nın çöktürülmesi sağlandı. Bunun için ilk olarak sıvı fazın üzerine 1 ml trizol başına 0,5 ml isopropanol eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. 13,000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve pelet 1 ml trizol başına 1 ml %80 EtOH ile yıkanıp vortekslendi. Tekrar 13,000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Supernatant atıldıktan sonra pelet 5-10 dakika oda ısısında kurutulup 50 µl distile su içinde çözülerek RNA dilüsyonu sağlandı [105, 106].

3.4. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden cDNA (complementary DNA, Komplementer DNA) sentezinde yer alan reaksiyon bileşenleri ve RNA örnekleri -20°C 'den çıkarılarak çözdürüldü. Reaksiyon bileşenlerin kısa bir santrifüjünden sonra cDNA reaksiyon karışımı (mix) hazırlandı. Bu karışım için gerekli bileşenler ve miktarları Tablo 3.1'de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar (100 µl için)
dH ₂ O	48 µl
dNTP (2 mM)	40 µl
Revers Transkriptaz (RT) enzimi (200U/ µl)	0,4 µl
5X RT Buffer	16 µl
Oligo(dT)18 (100 pmol/µl)	10 µl
RNase İnhibitör (40 U/µl)	1 µl
Toplam	115,4 µl

Hazırlanan karışımdan her bir reaksiyon tüpüne 50 µl konuldu ve ardından her bir örneğe ait 5 µl RNA numaralandırılmış bu reaksiyon tüplerine eklendi. cDNA reaksiyon tüpleri, 37°C'de 60 dk, 95°C'de 5 dk olacak şekilde thermal cyler cihazında inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. Örnekler, Real-time PCR uygulamasına kadar -20°C'de bekletildi.

3.5. Primer ve Prob Dizilerinin Sentezlenmesi

Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Enstitüsü veri tabanı (NCBI; National Institute of Biotechnology Information) kullanılarak, ekspresyonları analiz edilmek istenen *tgfa*, *tnfa*, *vegfa*, *nfe2l2*, *nf-kb1*, *nf-kb2* ve *ctnnb1* ve endojen kontrol olarak kullanılan *ACTB*'nin primer ve prob dizileri Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı ile tasarlandı [107].

Her prob 5' ucunda FAM ile işaretlenmiş floresan ışıma yapabilen boya ve 3' ucunda ise bu ışımının vuku bulduğu dalga boyuna sahip ışığın yayılmasını engelleyen Black Hole Quencher® (BHQ) adındaki "quencher" (soğurucu) kovalent bağ ile bağlanmıştır. (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. Real-Time PCR ile ekspresyon analizlerinde kullanılan primer-prob dizileri.

Gen Adı	Gen No*	Gen Nükleotid Dizi No**	Primer – Prob dizileri***	
tgfa	24827	NM_012671.2	tgfa-F	5'-CCTGAAGCCATTGATCTATCTCAA-3'
			tgfa-R	5'-GGGTCGCTTTCCAGTTTGG-3'
			tgfa-PR	5'-FAM-TACGCATACATGTGCGCACGTACACAC-BHQ-1-3'
tnfa	24835	NM_012675.3	tnf-F	5'-CGGGCTCAGAATTTCCAACA-3'
			tnf-R	5'-CGCAATCCAGGCCACTACTT-3'
			tnf-PR	5'-FAM-CTACGATGCTCAGAAACACACGAGACGCT-BHQ-1-3'
vegfa	83785	NM_001110333.2	vegfa-F	5'-GGGCTGCTGCAATGATGAA-3'
			vegfa-R	5'-ATCCGCATGATCTGCATAGTGA-3'
			vegfa-PR	5'-FAM-CCTGGAGTGCGTGCCACGTC-BHQ-1-3'
nfe2l2	83619	NM_031789.2	nfe2l2-F	5'-CGGCATTTCACTGAACACAAGT-3'
			nfe2l2-R	5'-TGGGTCTCCGTAAATGGAAGA-3'
			nfe2l2-PR	5'-FAM-CAGCCGAGCATCCCCAGAGCAC-BHQ-1-3'
nf-kb1	366998	NM_001012224.1	nfkb1-F	5'-CCCACTGAAACACCCTTGGT-3'
			nfkb1-R	5'-CACGGACAGCAGGCTTAGC-3'
			nfkb1-PR	5'-FAM-TTAGAGTCATCCTCCGGTCCAGTGCG-BHQ-1-3'
nf-kb2	81736	NM_001276711.1	nfkb2-F	5'-TGCTTACGGTGGGATTGCA-3'
			nfkb2-R	5'-TTATGGTGCCATGGGTGATG-3'
			nfkb2-PR	5'-FAM-TCCATCCCGAGCCACTAAATCCAA-BHQ-1-3'
ctnnb1	84353	NM_053357.3	ctnnb1-F	5'-GCCAAGTGGGTGGCATAGAG-3'
			ctnnb1-R	5'-TCGGTAATGTCTCCCTGTCA-3'
			ctnnb1-PR	5'-FAM-CTCTTGTCGCACTGTCTTCGTGC-BHQ-1-3'
ACTB	81822	NM_031144.3	Actb_rat-F	5'-GGCTCCTAGCACCATGAAG-3'
			Actb_rat-R	5'-ACCAATCCACACAGAGTACT-3'
			Actb_rat-PR	5'-Yakima Yellow-TCAAGATCATTGCTCTCTCTGAGCGC-BHQ-1-3'

* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> ** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/> *** Kısaltmalar: F: Forward, R: Reverse, PR: Prob

3.6. Real-Time PCR ile Ekspresyon Analizi Yöntemi (qPCR)

Ekspresyon analizinde Applied Biosystems (ABI) Prism 7500 Real-Time PCR cihazı kullanıldı. Tablo 3.3'e göre her gen için ayrı ayrı karışım hazırlandı.

Tablo 3.3. Real-time-PCR gen ekspresyonu için kullanılan solüsyon ve miktarları.

Reaksiyon Bileşeni	Miktarı
dH ₂ O	5 µl
qPCR Probe Master Mix (2x)	12,5 µl
tgfa	
tnfa	
vegfa	1 µl primer çifti (F ve R) (900nM)
nfe2l2	0,6 µL prob (200 nM)
nf-κb1	
nf-κb2	
ctnnb1	
ACTB	1µl primer çifti (F ve R) (900nM)
	0,5 µL prob (200 nM)
TOPLAM	22,6 µl

Endojen kontrol olarak β-aktin kullanıldı. Sağlıklı sıçanlara (kontrol grubundan elde edildi) ait RNA havuzundan referans örnek oluşturuldu. Tablo 3.4'te gösterilen plate diziliminde 96 kuyucuklu plate'in her bir kuyucuğuna 20 µl'lik karışım eklendi. Her bir gen için 2 µl cDNA örneği kondu ve plate'in üst kısmı film (MicroAmp Optical Adhesive Film) ile kaplandı. Daha sonra plate perfect spin ile santrifüj yapıldıktan sonra cihaz içindeki ısı bloğuna yerleştirildi. Başlama evresinde 50°C'de 2 dk, 95°C'de 10 dk ve döngü evresinde 50 döngü 95°C'de 15 sn, 60°C'de 90 sn olacak şekilde Real-time PCR işlemi gerçekleştirildi. Her bir örnekten "triplicate" şekilde çalışıldı.

Tablo 3.4. Ekspresyon analizi yapılan genlerin her birinde kullanılan ve reaksiyonların yerini gösteren “plate” dizilimi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 ACTB	DD1 ACTB	DD2 ACTB	DD3 ACTB	DD4 ACTB	DD5 ACTB	DD6 ACTB	DD7 ACTB				
B	0 tgfa	DD1 tgfa	DD2 tgfa	DD3 tgfa	DD4 tgfa	DD5 tgfa	DD6 tgfa	DD7 tgfa				
C	0 vegfa	DD1 vegfa	DD2 vegfa	DD3 vegfa	DD4 vegfa	DD5 vegfa	DD6 vegfa	DD7 vegfa				
D	0 tnfa	DD1 tnfa	DD2 tnfa	DD3 tnfa	DD4 tnfa	DD5 tnfa	DD6 tnfa	DD7 tnfa				
E	0 nfe2l2	DD1 nfe2l2	DD2 nfe2l2	DD3 nfe2l2	DD4 nfe2l2	DD5 nfe2l2	DD6 nfe2l2	DD7 nfe2l2				
F	0 nf-kb1	DD1 nf-kb1	DD2 nf-kb1	DD3 nf-kb1	DD4 nf-kb1	DD5 nf-kb1	DD6 nf-kb1	DD7 nf-kb1				
G	0 nf-kb2	DD1 nf-kb2	DD2 nf-kb2	DD3 nf-kb2	DD4 nf-kb2	DD5 nf-kb2	DD6 nf-kb2	DD7 nf-kb2				
H	0 ctnnb1	DD1 ctnnb1	DD2 ctnnb1	DD3 ctnnb1	DD4 ctnnb1	DD5 ctnnb1	DD6 ctnnb1	DD7 ctnnb1				

DD: Diyabetik deney. 0: Kontrollerden oluşan referans örnek, Yukarıdaki plate dizilimi diğer gruplar için de aynı şekilde tasarlanmıştır.

3.7. Genlere Ait Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Yöntem; hedef ve endojen kontrol ile referans örneğine göre ekspresyon düzeylerindeki farklılıkları hesaplama şeklinde çalışmaktadır. Yaklaşık iki saat süren analizden sonra programın hesaplamış olduğu $\Delta\Delta CT$ değerleri kullanılarak karşılaştırmalı eşik devri adı verilen (comparative Ct) yöntem ile $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplandı. Göreceli gen ekspresyonu analizi de denilen bu yöntemde bir referans RNA ve bir endojen kontrole göre araştırılan genlerin verileri alındı. SDS 2.0.6 yazılımı ile logaritmik çizelgede gerçek zamanlı çoğalma eğrilerinin analizi tamamlandı ve normalizasyon için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerini kullanarak ekspresyon düzeyleri belirlendi [108].

3.8. İstatistiksel Yöntemler

Çalışma verileri TIBCO Software STATISTICA Version 13.5.0.17 paket programı ile analiz edildi. Veriler ortalama, standart sapma, medyan, 1. çeyreklik, 3. çeyreklik, sayı ve yüzde olarak özetlendi. Normallik varsayımına uyum kontrolü Shapiro-Wilk ile test edildi. Varsayımı sağlayan değişkenlerin ikiden fazla grup karşılaştırmalarında ANOVA, varsayımı sağlamayan değişkenler için Kruskal Wallis testi kullanıldı. İki den fazla grup karşılaştırmalarında farklılığın hangi grup veya gruplardan kaynaklandığının tespiti için Dunn Z ve Tukey testleri kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alındı.

3.9. İn Silico Analiz Yöntemi

Bu çalışmada elde edilen deneysel gen ekspresyon verilerinin biyolojik yorumunu desteklemek ve bu bulguları daha geniş bir sistem biyolojisi çerçevesinde değerlendirmek amacıyla in silico analizlerle özellikle, incelenen genler arasındaki olası miRNA-gen ilişkilerinin, protein-protein etkileşim ağlarının ve fonksiyonel biyolojik süreçlerin ortaya konması

hedeflenmiştir. Böylece, yalnızca in vivo deneysel sonuçlara dayalı bir değerlendirme yapmakla sınırlı kalınmamış; aynı zamanda PMA uygulamasının diyabetik ve non-diyabetik yara iyileşmesi üzerindeki olası moleküler mekanizmaları bütüncül bir bakış açısıyla öngörmek amaçlanmıştır.

Bu nedenle çalışma tasarımı ve elde edilen deneysel bulguları desteklemek amacıyla, belirlenen genler ($tgfa$, $vegfa$, $tnfa$, $nfe2$, $nf-kb1$, $nf-kb2$ ve $ctnnb1$) için çeşitli in silico analizler gerçekleştirilmiştir.

İn silico yaklaşımlar, istatistiksel testlerden bağımsız, ancak algoritmik modelleme ve tahmine dayalı yöntemlerdir. Deneysel bulguların biyolojik mekanizmalarla ilişkilendirilmesi, potansiyel moleküler etkileşimlerin ortaya konması ve epigenetik düzenleyici ağların öngörülmesi amacıyla nitel değerlendirme aracı olarak kullanılmıştır. Analiz kapsamında:

3.9.1. Protein-Protein Etkileşim (PPI) Analizi

Proteinler arası olası etkileşim ağlarını belirlemek için STRING veritabanı (<https://string-db.org/>, erişim: 31.01.2025) kullanılmıştır. STRING, proteinlerin hem fiziksel hem de fonksiyonel ilişkilerini içermekte olup, deneysel bulgular, hesaplamalı tahmin yöntemleri ve literatür madenciliği gibi farklı kaynaklardan elde edilen verileri bütünleştirmektedir [109]. Elde edilen etkileşimler, her bir bağlantı için hesaplanan güven skorlarıyla ağırlıklandırılmış ve analizlerde 0,4 (orta güven) eşik değeri kullanılmıştır. Ayrıca sonuçların istatistiksel olarak güvenilirliğini artırmak amacıyla Yanlış Keşif Oranı (FDR) $\leq 0,05$ kriteri uygulanmıştır. Bu analizler sonucunda, belirlenen genler arasındaki olası fiziksel ve fonksiyonel ilişkiler tanımlanmış; genlerin hücresel ağ içerisindeki konumları ve etkileşim düzeyleri hakkında öngörüler geliştirilmiştir. Bununla birlikte, fonksiyonel zenginleştirme analizleri (GO ve KEGG) aracılığıyla incelenen genlerin biyolojik süreçlerdeki rollerine, moleküler fonksiyonlarına ve hücresel bileşenlerdeki görevlerine ilişkin bilgiler elde edilmiştir. Ayrıca, bu analizler genlerin dahil olduğu biyolojik yolları ortaya koyarak, çalışmada değerlendirilen genlerin sistem biyolojisi bağlamındaki işlevsel önemini desteklemiştir.

3.9.1.1. Güven Skoru ve Yanlış Keşif Oranı Belirlenmesi

STRING veritabanında etkileşimler 0 ile 1 arasında bir güven skoru ile değerlendirilmekte olup, düşük eşikler ($\leq 0,25$) çok sayıda yalancı pozitif ilişkiye yol açarken, yüksek eşikler ($\geq 0,7$) ise yalnızca güçlü deneysel kanıtı olan sınırlı sayıdaki etkileşimi kapsamakta ve ağın biyolojik çeşitliliğini azaltmaktadır. Bu nedenle 0,4 değeri, yanlış pozitiflerin azaltılması ile ağın keşifsel kapsamının korunması arasında en uygun dengeyi sağlamaktadır [81].

Yanlış Keşif Oranı (False Discovery Rate, FDR) yapılan testler arasında yanlış anlamlılık oranını kontrol eden bir yöntem olup [110], biyoinformatik analizlerde en sık tercih edilen eşik değerlerden biridir. Bu sınır, bulunan anlamlı sonuçların en fazla %5'inin yanlış olabileceği varsayımına dayanır ve istatistiksel güvenilirlik ile biyolojik keşif gücü arasında dengeli bir

yaklaşım sağlar. Daha katı bir eşik olan $FDR \leq 0,01$, yanlış pozitif oranını %1'e düşürerek sonuçların güvenilirliğini artırsa da biyolojik açıdan değerli olabilecek pek çok yolak ve sürecin gözden kaçmasına yol açabilir. Buna karşılık daha gevşek bir eşik olan $FDR \leq 0,1$, daha fazla yolak ve sürecin analizde yer almasına imkân tanırken yanlış pozitif riskini artırır. Bu nedenlerle, çalışmada $FDR \leq 0,05$ değeri, biyolojik çeşitliliği korurken istatistiksel güvenilirliği sağlamada en uygun denge noktası olarak tercih edilmiştir.

3.9.2. miRNA-Hedef Gen Analizi

Epigenetik düzenleyici moleküller olan miRNA'ların, incelenen genler üzerindeki potansiyel etkilerini belirlemek amacıyla birden fazla veritabanı ve algorithmadan yararlanılmıştır. Bu kapsamda miRNA-hedef gen ilişkileri, miRDB, miRTargetLink 2.0, TargetScan 8.0 ve HMDD v4.0 veritabanları üzerinden incelenmiş; özellikle yüksek hedef skoruna (%80 ve üzeri) sahip miRNA'ların patolojik süreçlerdeki potansiyel rolleri değerlendirilmiştir.

Öncelikle miRDB (<https://mirdb.org/>, erişim: 23.01.2025) kullanılarak her gen için tahmini hedef skorları 80–100 aralığında değerlendirilmiştir [92]. Daha sonra miRTargetLink 2.0 (<https://ccb-compute.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink2>, erişim: 23.01.2025) ile hedef spesifikliğı yüksek miRNA'lar tanımlanmış; spesifikliğı %100'e yaklaşan miRNA'ların daha güçlü dizi eşleşmesi ve düzenleyici kapasiteye sahip olması nedeniyle çalışmada öncelikli olarak dikkate alınması sağlanmıştır [111]. Elde edilen miRNA–mRNA eşleşmeleri, TargetScan 8.0 (https://www.targetscan.org/vert_80/, erişim: 23.01.2025) veritabanı kullanılarak doğrulanmış ve özellikle %80 ve üzeri bağlanma yüzdesine sahip hedefler değerlendirilmiştir [93]. Son olarak, belirlenen miRNA'ların diyabetes mellitus ile ilişkileri HMDD v4.0 (<http://www.cuilab.cn/hmdd>, erişim: 23.01.2025) veritabanı aracılığıyla analiz edilmiş, böylece çalışmanın transkripsiyonel boyutu güçlendirilmiştir [112].

3.9.2.1. Hedef Skoru Belirlenmesi

Hedef skoru, bir miRNA'nın tahmini olarak bir geni ne kadar güçlü ve güvenilir şekilde hedeflediğini gösteren olasılık temelli bir ölçüttür. Bir miRNA'nın belirli bir genin 3'UTR bölgesine bağlanma olasılığını ve fonksiyonel olarak onu düzenleme gücünü ifade eden bir puanlama sistemidir. Bu değer, deneysel ölçümlere değil, biyoinformatik algoritmaların tahminlerine dayanmaktadır. miRDB veritabanında skorlar genellikle 50–100 aralığında raporlanmakta olup, 80 ve üzeri değerler yüksek güvenilirlikte kabul edilmektedir [92]. Yüksek hedef skoru (≥ 80 –85), ilgili miRNA'nın hedef geni baskılama olasılığının güçlü olduğunu ve biyolojik açıdan daha anlamlı olabileceğini gösterirken; 60–79 arası skorlar olası bir etkileşime işaret eder ancak bu tür bulguların deneysel olarak doğrulanması gereklidir. 60'ın altındaki skorlar ise genellikle zayıf tahminler olarak değerlendirilmekte ve çoğu çalışmada analiz kapsamı dışında bırakılmaktadır.

STRING veritabanında protein-protein etkileşimleri için hesaplanan güven skorları ve miRDB’de elde edilen miRNA hedef skorları, deneysel doğrulamaya değil, farklı veri kaynaklarının bütünleştirilmesine ve makine öğrenmesi tabanlı algoritmalara dayalıdır. Benzer şekilde GO/KEGG fonksiyonel zenginleştirme analizleri, biyolojik süreç ve yollara ilişkin olasılıkları ortaya koymakta; ancak doğrudan deneysel hipotez testlerini temsil etmemektedir.



4. BULGULAR

Bu çalışmada $tgfa$, $vegfa$, $tnfa$, $nfe2$, $nf-\kappa b1$, $nf-\kappa b2$ ve $ctnnb1$ genlerinin ekspresyon düzeylerine diyabetin ve tedavi amaçlı kullanılan PMA'nın etkileri incelenmiştir. Bu amaçla hiçbir işlem yapılmayan Kontrol, insizyon yarası oluşturulmuş diyabetik-sham ve non-diyabetik sham, insizyon yarası oluşturulmuş ve PMA tedavisi uygulanmış diyabetik deney ve non-diyabetik deney gruplarından 21 günlük PMA uygulaması sonunda elde edilen yaralı dokularda real-time PCR ile gen ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Ekspresyon düzeyleri ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan, birinci ve üçüncü çeyrek değerleri ve istatistiksel karşılaştırılması tabloda verilmiştir (Tablo 4.1.).

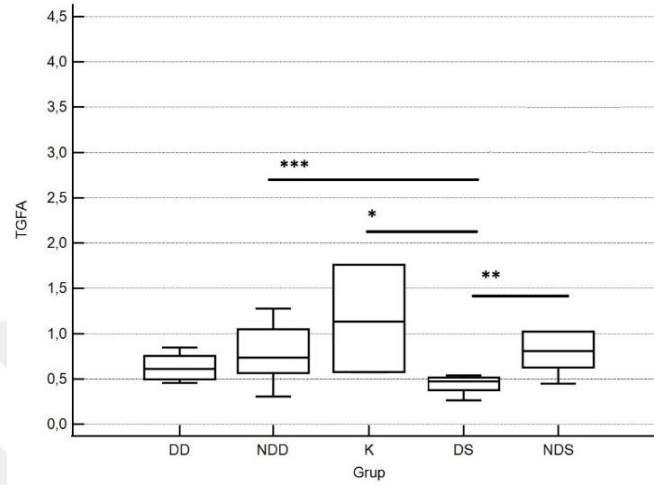


Tablo 4.1. Grupların gen ekspresyon düzeyleri. Normal dağılım gösteren veriler ortalama $\pm$ standart sapma, normal dağılmayan veriler ise medyan [Q1-Q3] biçiminde verilmiştir. *p-değerleri istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir. Tablo, her bir gen için gruplar arasında yapılan karşılaştırmalara ait istatistiksel anlamlılık düzeylerini ve anlamlı farklılık saptanan grup çiftlerini göstermektedir. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

	Diyabetik Deney n=7	Diyabetik Sham n=7	Kontrol n=7	Non-Diyabetik Deney n=7	Non-Diyabetik Sham n=7	p	Anlamlı Olan Genlerin Grup Karşılaştırmaları ve p Değerleri
TGFA	0,61	0,47	1,13	0,74	0,81	0,017*	Non-Diyabetik Sham > Diyabetik Sham p=0,008
	0,46-0,77	0,35-0,52	0,58-2,41	0,53-1,15	0,58-1,50		Kontrol > Diyabetik Sham p=0,002
							Non-Diyabetik Deney > Diyabetik Sham p=0,017
VEGFA	4,24	8,06	0,78	1,79	0,01	0,001*	Non-Diyabetik Deney > Non-Diyabetik Sham p=0,003
	0,86-5,60	3,88-8,80	0,09-2,04	1,01-6,98	0,00-0,05		Diyabetik Deney > Non-Diyabetik Sham p=0,001
							Diyabetik Sham > Non-Diyabetik Sham p<0,001
							Diyabetik Sham > Kontrol p=0,016
TNF	0,27	0,39	0,87	0,31	0,72	0,020*	Kontrol > Non-Diyabetik Deney p=0,014
	0,19-0,55	0,32-0,48	0,35-3,37	0,27-0,37	0,45-1,07		Non-Diyabetik Sham > Non-Diyabetik Deney p=0,004
							Non-Diyabetik Sham > Diyabetik Deney p=0,024
NFE2	0,61 $\pm$ 0,26	0,65 $\pm$ 0,26	0,85 $\pm$ 0,19	0,55 $\pm$ 0,27	0,46 $\pm$ 0,25	0,110	
NFKB1	1,91	1,27	1,18	2,05	0,85	0,001*	Diyabetik Sham > Non-Diyabetik Sham p=0,030
	1,54-2,41	1,19-1,96	1,05-1,76	1,64-2,74	0,68-0,97		Diyabetik Deney > Non-Diyabetik Sham p<0,001
							Non-Diyabetik Deney > Non-Diyabetik Sham p<0,001
NFKB2	0,48	0,52	0,58	0,42	0,57	0,498	
	0,29-0,77	0,44-0,61	0,41-1,43	0,41-0,46	0,38-0,73		
CTNNB1	0,42	0,40	0,75	0,46	0,93	0,067	
	0,26-0,67	0,36-0,60	0,35-1,28	0,31-0,61	0,57-3,64		

4.1. Tgfa Ekspresyon Düzeyleri

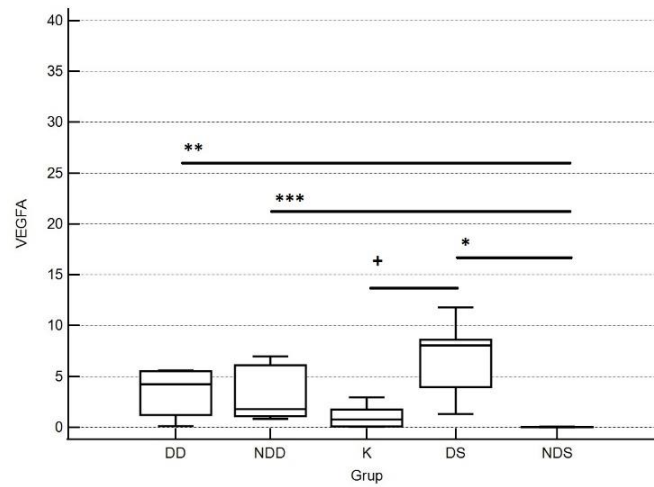
Tgfa ölçümü bakımından gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık vardır. ($p=0,017$). Bu farklılığın sebebi, Diyabetik Sham grubunun tgfa medyanının Kontrol, Non-Diyabetik Sham, Non-Diyabetik Deney gruplarından daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır ($p=0,002$; $0,008$; $0,017$).



Şekil 4.1: Tgfa ekspresyon düzeyleri. (DD: diyabetik deney, DS: diyabetik sham, K: kontrol, NDD: nondiyabetik deney, NDS: nondiyabetik sham. $p^*=0,002$; $p^{**}=0,008$; $p^{***}=0,017$)

4.2. Vegfa Ekspresyon Düzeyleri

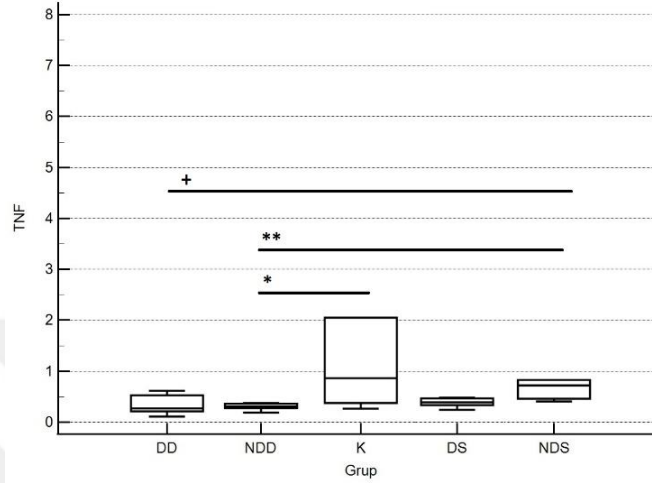
Vegfa ölçümü bakımından gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık vardır. ($p=0,001$). Bu farklılığın sebebi vegfa medyanının, Non-Diyabetik Sham grubunda Diyabetik Sham, Diyabetik Deney ve Non-Diyabetik Deney gruplarına göre ($p<0,001$; $p=0,001$; $p=0,003$) ve Kontrol grubunun da Diyabetik Sham grubuna göre daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır ($p=0,016$).



Şekil 4.2: Vegfa ekspresyon düzeyleri. (DD: diyabetik deney, DS: diyabetik sham, K: kontrol, NDD: nondiyabetik deney, NDS: nondiyabetik sham. $p^*<0,001$; $p^{**}=0,001$; $p^{***}=0,003$; $p^+=0,016$)

4.3. Tnf α Ekspresyon Düzeyleri

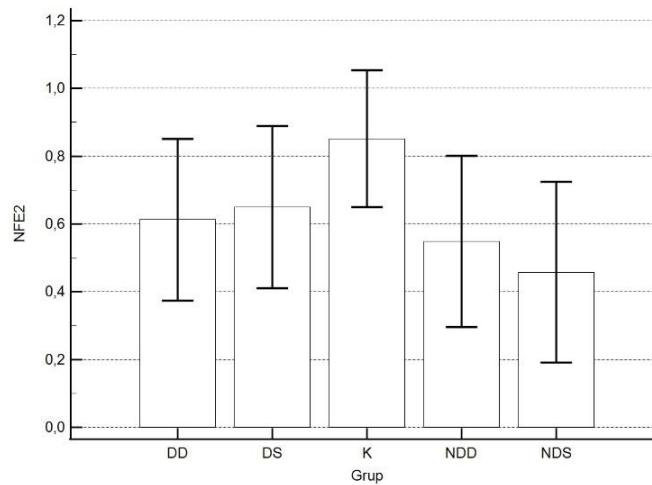
Tnf α ölçümü bakımından gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık vardır. ($p=0,020$). Bu farklılığın sebebi, Non-Diyabetik Deney grubunun tnf α medyanının Kontrol ve Non-Diyabetik Sham gruplarına göre ($p=0,014$; $p=0,004$) ve Diyabetik Deney grubunun da Non-Diyabetik Sham grubuna göre daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır ($p=0,024$).



Şekil 4.3: Tnf α ekspresyon düzeyleri. (DD: diyabetik deney, DS: diyabetik sham, K: kontrol, NDD: nondiyabetik deney, NDS: nondiyabetik sham. $p^*=0,014$; $p^{**}=0,004$; $p^+=0,024$)

4.4. Nfe2 Ekspresyon Düzeyleri

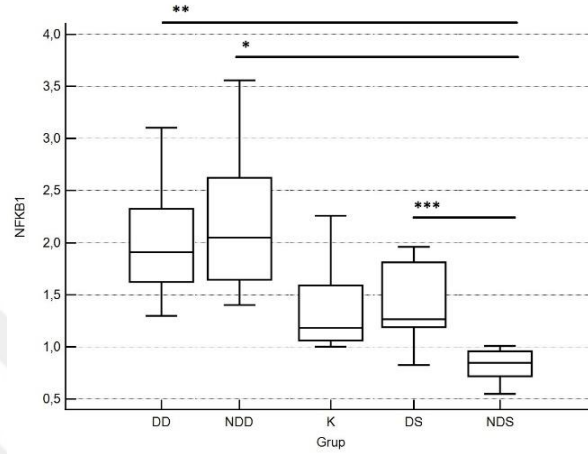
Nfe2 geninin ekspresyon düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir ($p=0,110$). Ancak yine de kontrol grubunda bu genin ifadesi non-diyabetik sham grubundan iki kat fazladır.



Şekil 4.4: Nfe2l2 ekspresyon düzeyleri. (DD: diyabetik deney, DS: diyabetik sham, K: kontrol, NDD: nondiyabetik deney, NDS: nondiyabetik sham.)

4.5. Nf- κ B1 Ekspresyon Düzeyleri

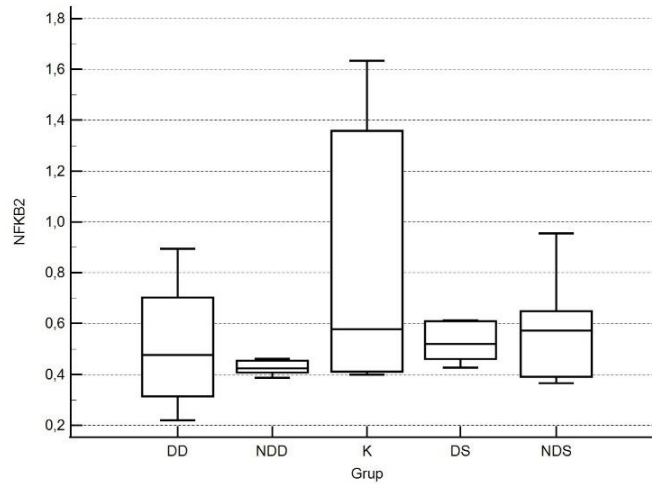
Nf- κ B1 ölçümü bakımından gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık vardır. ($p=0,001$). Bu farklılığın sebebi, Non-Diyabetik Sham grubunun nf- κ B1 medyanının Non-Diyabetik Deney, Diyabetik Deney ve Diyabetik Sham gruplarından daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır ($p<0,001$; $p<0,001$; $p=0,030$).



Şekil 4.5: Nf- κ B1 ekspresyon düzeyleri. (DD: diyabetik deney, DS: diyabetik sham, K: kontrol, NDD: nondiyabetik deney, NDS: nondiyabetik sham. $p^*<0,001$; $p^{**}<0,001$; $p^{***}=0,030$)

4.6. Nf- κ B2 Ekspresyon Düzeyleri

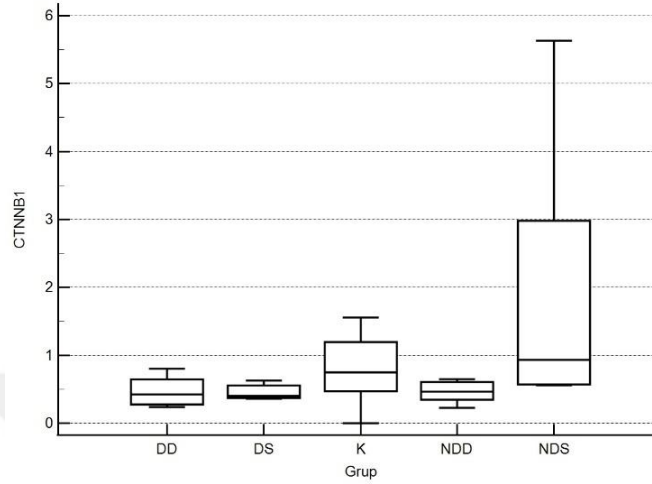
Nf- κ B2 geninin ekspresyon düzeyi kontrol grubunda diğer gruplara göre oldukça yüksek çıkmış olsa da bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,498$).



Şekil 4.6: Nf- κ B2 ekspresyon düzeyleri. (DD: diyabetik deney, DS: diyabetik sham, K: kontrol, NDD: nondiyabetik deney, NDS: nondiyabetik sham.)

4.7. Ctnnb1 Ekspresyon Düzeyleri

Ctnnb1 geninin ekspresyon düzeyi non-diyabetik sham grubunda diğer gruplara göre oldukça yüksek çıkmış olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,067$).



Şekil 4.7: Ctnnb1 ekspresyon düzeyleri. (DD: diyabetik deney, DS: diyabetik sham, K: kontrol, NDD: nondiyabetik deney, NDS: nondiyabetik sham.)

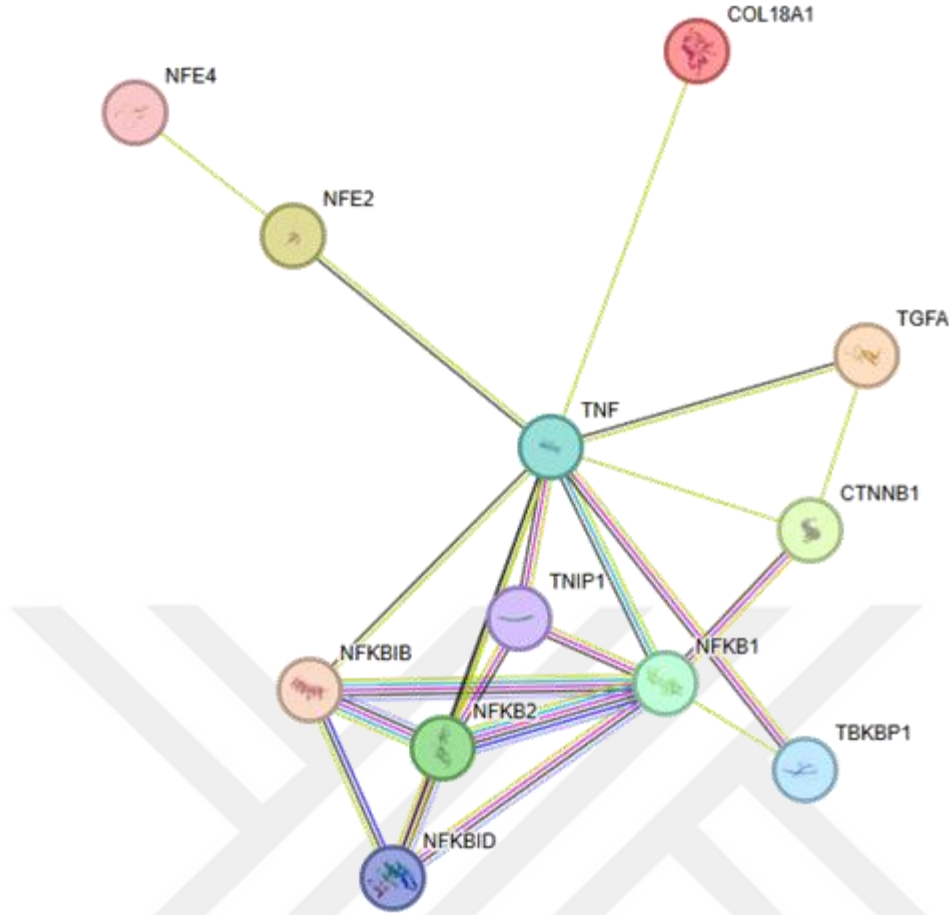
4.8. İn Silico Analiz Sonuçları

Her bir genin ağdaki konumu, işlevi ve biyolojik süreçlerle ilişkisi değerlendirilmiştir.

4.8.1. Protein-Protein Etkileşim Ağı (PPI) Analizi

Analize dahil edilen genlerin etkileşim ağı Şekil 4.8.'de verilmiştir. STRING veritabanı ile oluşturulan ağ yapısı incelendiğinde; $tnf\alpha$, $nf-\kappa b1$ ve $nf-\kappa b2$ merkezî düğümler olarak belirlenmiştir. Bu genlerin kritik düzenleyici proteinleri temsil ettiği gözlenmiş, $p<0,001$ olarak bulunmuştur.

$Nf-\kappa b1$, $nf-\kappa b2$, $RELA$ ve $nfe2$ arasındaki sıkı bağlantılar, bu proteinlerin ortak transkripsiyonel kompleksler oluşturduğunu veya aynı sinyal yollarında eşzamanlı görev aldığını göstermektedir. $vegfa$ ve $tgfa$ 'nın $nf-\kappa b1$ ile olan ilişkisi, yara iyileşmesinde anjiyogenez ve epitelyal proliferasyonun $nf-\kappa b$ aracılı mekanizmalarla düzenlenebileceğine işaret etmektedir. Daha ince ve açık renkli kenarlar (örn. $COL18A1$ veya $nfe2$ ile olan etkileşimler) düşük güven skoruna sahip olup zayıf etkileşimleri ifade etmektedir. Bu tür ilişkiler biyolojik olarak anlamlı olabilseler de deneysel doğrulama gerektirmektedir. Ağ, birkaç bağımsız alt kol içerse de genel olarak tek bir büyük bileşen etrafında kümelenmiş bir yapı sergilemekte olup, genlerin çoğunun ortak biyolojik süreçler içinde yer aldığını göstermektedir.



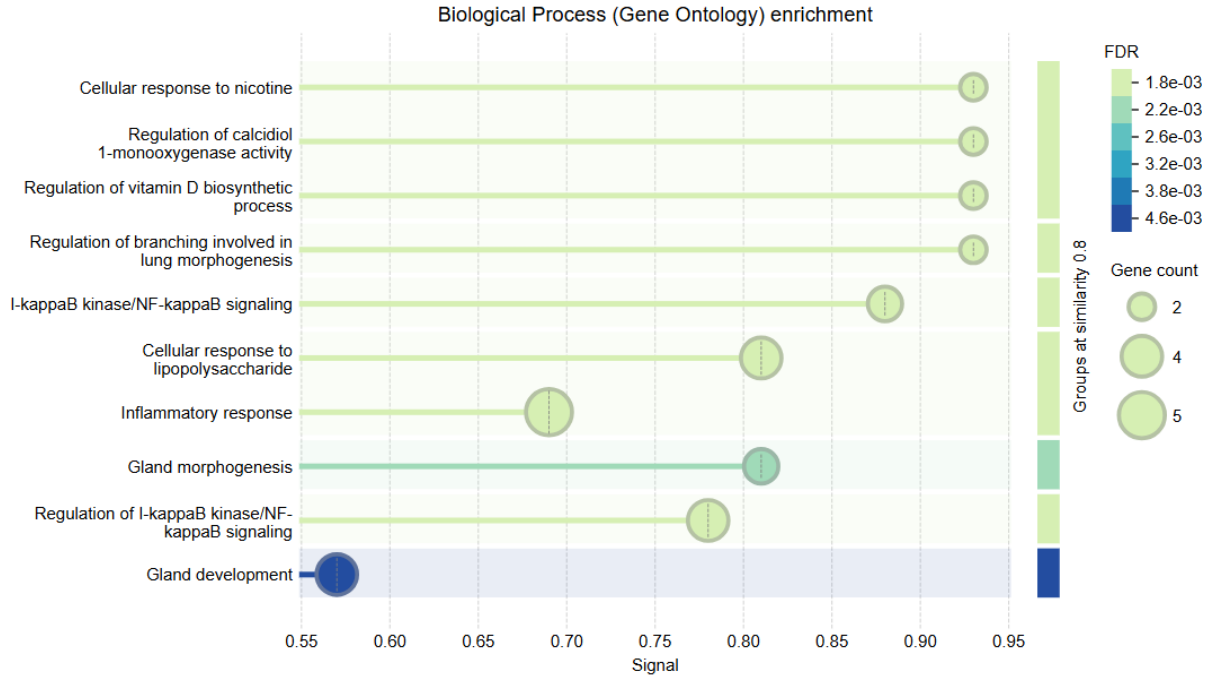
Şekil 4.8. STRING veritabanı kullanılarak oluşturulan protein-protein etkileşim (PPI) ağı. Her bir düğüm (node) bir geni veya kodladığı proteini temsil etmektedir. Düğümler arasındaki çizgiler, genler/proteinler arasındaki fiziksel veya işlevsel etkileşimleri göstermektedir. Çizgi renkleri, etkileşimin türüne ve kaynağına göre değişmekte olup; genetik etkileşim, deneysel veriler, veritabanı kayıtları, literatür desteği, ko-ifadelenmiş genler ve ortak protein domeinleri gibi farklı kanıt türlerini ifade etmektedir.

4.8.2. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi

STRING veritabanı kullanılarak diyabet patogeneziyle ilişkili biyolojik süreçler, sinyal yolları ve bu süreçlerde yer alan proteinlerin hastalıklarla olan bağlantıları belirlenmiştir.

4.8.2.1. Biyolojik Süreçlerde (GO Biological Process)

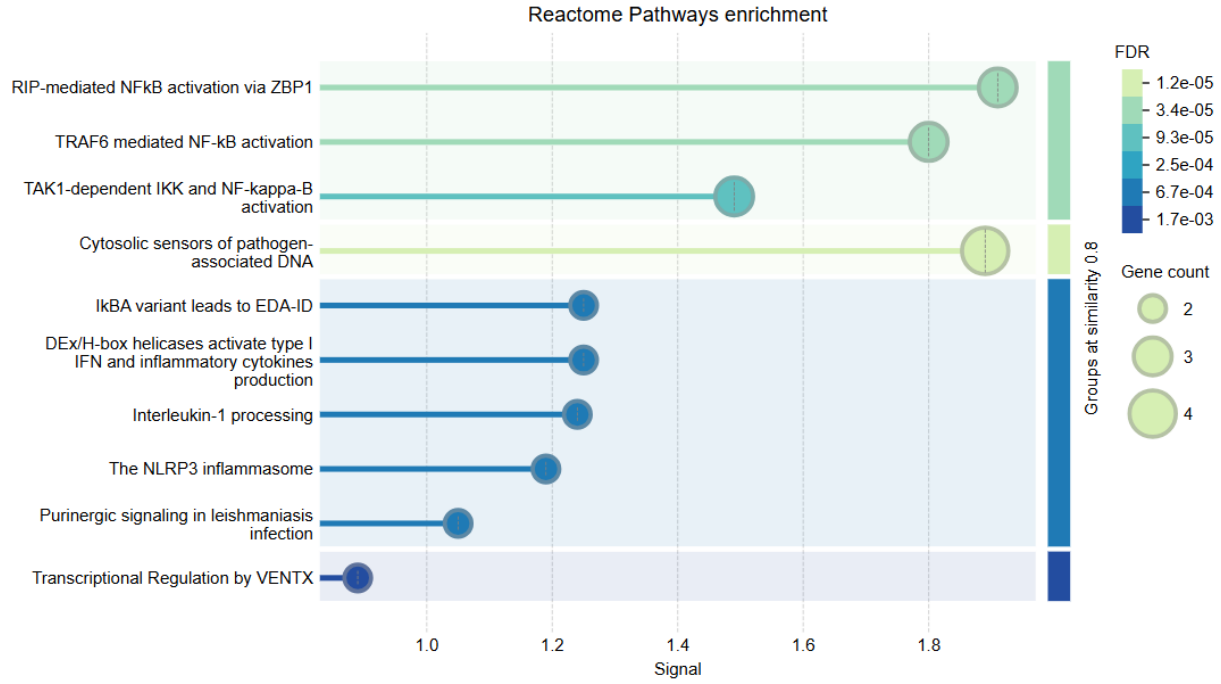
Şekil 4.9.'da anlamlı şekilde zenginleşmiş biyolojik süreçler arasında bez gelişimi, nf-kb sinyal iletimi, enflamatuar yanıt, inflammatuar yanıt, nikotine hücresel yanıt, kalsidiol 1-monooksijenaz aktivitesinin düzenlenmesi ve D vitamini biyosentezi yer aldığı görülmektedir. İncelenen genlerin ve bu süreçlerin arasındaki anlamlı ilişkilerin diyabetle ilişkilendirilebileceği gözlenmiştir.



Şekil 4.9. Biological Process (Gene Ontology) zenginleştirme analizi sonuçlarının baloncuk grafiği. Baloncukların çapı, her biyolojik süreçle ilişkili gen sayısını (Gene Count), renk yoğunluğu ise istatistiksel anlamlılık düzeyini yansıtan FDR (False Discovery Rate) değerini göstermektedir. Daha açık renkler (ör. $FDR: 1,8 \times 10^{-3} = 0,0018 < 0,05$) daha düşük FDR değerine ve dolayısıyla daha yüksek istatistiksel anlamlılığa karşılık gelmektedir. Yatay eksen üzerinde gösterilen sinyal skoru, gen kümesinin ilgili biyolojik sürece katkı gücünü ve istatistiksel güvenilirliğini ifade etmekte; sinyal değerinin büyüklüğü ise ilişkinin istatistiksel olarak ne kadar anlamlı olduğunu göstermektedir.

4.8.2.2. Sinyal Yolakları (Reactome Pathways)

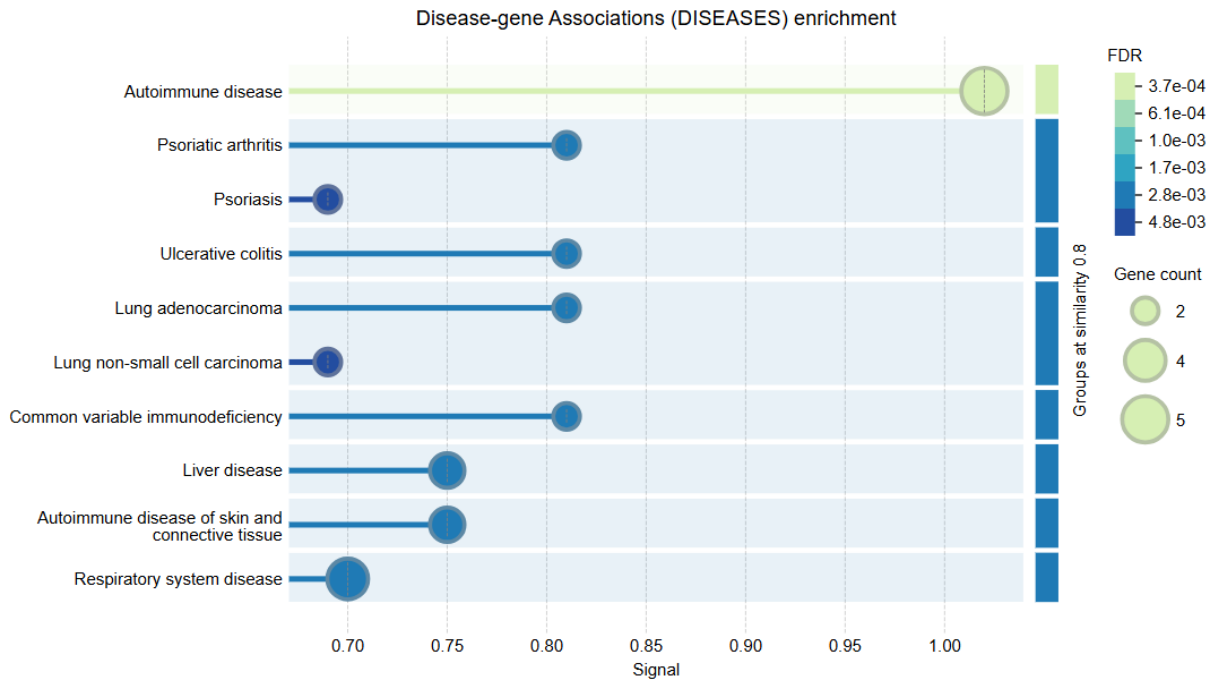
Sinyal yolağı analizlerine ilişkin veriler Reactome veritabanından elde edilmiş olup, sonuçlar Şekil 4.10.'da verilmiştir. Anlamlı şekilde zenginleşmiş yolaklar arasında ZBP1 aracılı RIP-bağımlı nf- κ b aktivasyonu, TRAF6 proteini üzerinden nf- κ b'nin uyarılması (enflamatuar yanıtla ilişkilidir), İnterlökin-1 işlenmesi, NLRP3 inflamazomu ve hücrel sitozolde yer alan patojene özgü DNA sensörleri yer almaktadır. Bu sonuçlar diyabet ve yara iyileşmesiyle ilişkilendirilebilecek sonuçlardır.



Şekil 4.10. Reactome sinyal yolları zenginleştirme analizi sonuçlarının baloncuk grafiği. Baloncukların çapı, her bir yolda yer alan gen sayısını (Gene Count), renk yoğunluğu ise istatistiksel anlamlılık düzeyini yansıtan FDR (False Discovery Rate) değerini göstermektedir. Daha açık renkler, daha düşük FDR değerine ve dolayısıyla daha yüksek istatistiksel anlamlılığa karşılık gelmektedir. Yatay eksenle gösterilen signal skoru, gen kümesinin ilgili biyolojik yollara katkı gücünü ve istatistiksel güvenilirliğini ifade etmektedir. Signal değerinin büyüklüğü ise ilişkinin istatistiksel olarak ne kadar anlamlı olduğunu göstermektedir.

4.8.2.3. Hastalık-Gen İlişkilendirme (DISEASES Database)

Etkileşim ağındaki proteinlerin ilişkili olduğu hastalıklar gösterilmiştir (Şekil 4.11.). Bu proteinlerle anlamlı şekilde ilişkili bulunan hastalıklar arasında otoimmün hastalık, psöriatik artrit, ülseratif kolit, karaciğer hastalığı, yaygın değişken immün yetmezlik ve solunum sistemi hastalıkları gibi immün, inflammatuar ve onkolojik hastalıkların öne çıktığı görülmektedir.



Şekil 4.11. DISEASES veritabanına dayalı zenginleştirme analizi sonuçlarının baloncuk grafiği.

Baloncukların çapı, her bir hastalıkla ilişkili gen sayısını (Gene Count), renk yoğunluğu ise istatistiksel anlamlılık düzeyini yansıtan FDR (False Discovery Rate) değerini göstermektedir. Daha açık renkler, daha düşük FDR değerine ve dolayısıyla daha yüksek istatistiksel anlamlılığa karşılık gelmektedir. Yatay eksende yer alan signal skoru, gen kümesinin ilgili hastalıkla olan katkı gücünü ve istatistiksel güvenilirliğini ifade etmekte; signal değerinin büyüklüğü ise ilişkinin istatistiksel olarak ne kadar anlamlı olduğunu göstermektedir.

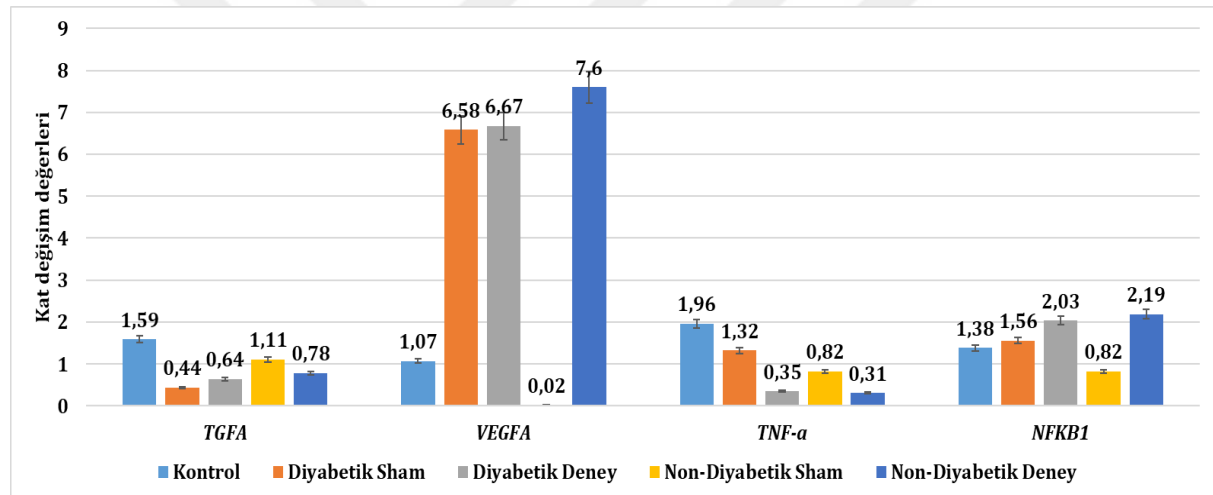
4.9. İn Silico miRNA Hedefler Analiz Sonuçları

4.9.1. İstatistiksel Olarak Anlamlı Tespit Edilen Genlerin İfade Farklılıkları

Bu çalışmada, diyabetik yara modeli oluşturulan sıçanlarda PMA uygulamasının etkilediği genlerin post-transkripsiyonel düzeydeki düzenleyicileri olan miRNA'lar in silico yöntemlerle analiz edilmiştir. Hedeflenen genler arasında $tnf\alpha$, $nf-kb1$, $nf-kb2$, $tgf\alpha$, $vegfa$, $ctnnb1$ ve $nfe2$ yer almıştır. Bu genlerin bütün gruplar için standart sapma $\pm$ ortalama ve p değerleri Tablo 4.2.'de verilmiştir. Bu genlerden istatistiksel olarak anlamlı tespit edilen genlerin ifade farklılıkları Şekil 4.12.'de gösterilmiştir. Bu genlere yönelik miRNA hedefleri analiz edilmiştir.

Tablo 4.2. Gen ekspresyon $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin ortalama $\pm$ standart sapma değerleri.

	Diyabetik Deney	Diyabetik Sham	Kontrol	Non-Diyabetik Deney	Non-Diyabetik Sham	p
	n=7	n=7	n=7	n=7	n=7	
tgfa	0,64 $\pm$ 0,15	0,44 $\pm$ 0,10	1,59 $\pm$ 1,46	0,78 $\pm$ 0,34	1,11 $\pm$ 0,92	0,017*
vegfa	6,67 $\pm$ 9,75	6,58 $\pm$ 3,59	1,07 $\pm$ 1,12	7,60 $\pm$ 13,45	0,02 $\pm$ 0,03	0,001*
tnfa	0,35 $\pm$ 0,19	1,32 $\pm$ 2,50	1,96 $\pm$ 2,50	0,31 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,50	0,020*
nfe2	0,61 $\pm$ 0,26	0,65 $\pm$ 0,26	0,85 $\pm$ 0,19	0,55 $\pm$ 0,27	0,46 $\pm$ 0,25	0,110
nf-kb1	2,03 $\pm$ 0,59	1,56 $\pm$ 0,76	1,38 $\pm$ 0,48	2,19 $\pm$ 0,75	0,82 $\pm$ 0,18	0,001*
nf-kb2	0,50 $\pm$ 0,25	0,53 $\pm$ 0,08	0,83 $\pm$ 0,54	0,46 $\pm$ 0,12	0,58 $\pm$ 0,22	0,498
ctnnb1	0,47 $\pm$ 0,22	0,45 $\pm$ 0,11	0,79 $\pm$ 0,57	0,47 $\pm$ 0,16	1,93 $\pm$ 2,03	0,067



Şekil 4.12. Gruplara göre gen ekspresyon düzeylerinin ortalama kat değişimleri. Çubukların üzerindeki sayılar, Kat değişim (fold change) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ortalama değerleri göstermektedir. Kat değişim değeri > 1 ise gen ekspresyonunda artış (up-regülasyon); < 1 ise gen ekspresyonunda azalma (down-regülasyon); $= 1$ ise gen ekspresyonda anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermektedir.

Kat değişim grafiği incelendiğinde;

Tgfa: Diyabetik sham grubunda tgfa düzeyi 0,44 ile en düşük seviyededir, bu da diyabetik ortamda bu genin baskılandığını göstermektedir. Diyabetik deney grubunda değer 1,11'e yükselmiş olsa da kontrol grubunun altında kalmıştır. Non-diyabetik sham grubunda tgfa 0,78 ile baskılanmış düzeydedir, ancak non-diyabetik deney grubunda 1,07'ye yükselerek sham grubuna kıyasla kısmi bir toparlanma göstermiştir

Vegfa: Diyabetik sham (6,58) ve diyabetik deney (6,67) gruplarında vegfa yüksek bulunmuştur, bu da diyabetik ortamda hipoksi/iskemiye bağlı anjiyogenik yanıtın sürdüğünü

düşündürmektedir. Non-diyabetik sham grubunda vegfa 0,02'ye düşerek baskılanma görülmüş, ancak non-diyabetik deney grubunda 1,07'ye yükselerek kontrol düzeylerine yaklaşma eğilimi göstermiştir. Bu sonuçlar, pulslu elektromanyetik alan (PEMA)'nın özellikle non-diyabetik koşullarda vegfa düzeylerini koruyucu bir etki sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Tnf α : Diyabetik sham grubunda tnf α 0,35; non-diyabetik sham grubunda ise 0,31 değerleriyle düşük bulunmuştur. Bu, sham gruplarında inflamatuvar yanıtın baskılandığını göstermektedir. Diyabetik deney grubunda tnf α düzeyi 1,32'ye yükselmiş, bu da PMA uygulamasının inflamatuvar yanıtı kısmen aktive edebildiğini düşündürmektedir. Non-diyabetik deney grubunda ise 0,82'ye yükselmiş, sham grubuna göre artış göstermiştir. Genel olarak sham gruplarında düşük olan tnf α düzeyleri, deney gruplarında kısmi olarak yükselmiştir.

Nf- κ b1: Diyabetik sham grubunda nf- κ b1 1,56 ile kontrolün üzerinde bulunmuştur. Diyabetik deney grubunda 2,03'e çıkarak daha da artmıştır. Non-diyabetik sham grubunda 0,82 ile kontrolün altında seyretmiş, ancak non-diyabetik deney grubunda 2,19 ile tüm gruplar arasında en yüksek değere ulaşmıştır. Bu bulgular, PMA uygulamasının hem diyabetik hem non-diyabetik ortamlarda nf- κ b yolunu güçlü şekilde aktive ettiğini göstermektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde sham gruplarında baskılanma görülürken, deney gruplarında vegfa korunmuş, tnf α kısmen yükselmiş, nf- κ b1 belirgin olarak artmış ve tgfa'da sınırlı toparlanma gözlenmiştir.

4.9.2. Genler ve miRNA Hedefleri (miRDB).

Genleri hedefleyen fonksiyonel miRNA'ları tespit edebilmek amacıyla miRDB veritabanı kullanıldı. Bu veritabanı, makine öğrenme algoritmalarına dayalı olarak miRNA-hedef gen ilişkilerini tahmin eder ve her eşleşmeye özgü bir eşleşme skoru (target score) sunar. Analizde, %80 ve üzeri eşleşme skoruna sahip miRNA'lar dikkate alınarak yüksek hedef özgüllüğü gösteren miRNA adayları belirlendi.

miRDB veri tabanından elde edilen veriler tgfa geni için toplam 118, vegfa için 232, tnf α için 59, nf- κ b1 geni için 77 miRNA hedefi tanımladı. Bunlar içerisinde eşleşme skoru %80 üzeri olan miRNA'lar gösterildi (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Genler ve miRNA hedefleri (miRDB).

tgfa		vegfa		tnfa		nf-kb1	
Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı
98	hsa-miR-3942-3p	100	hsa-miR-1277-5p	100	hsa-miR-5692a	95	hsa-miR-548ap-5p
96	hsa-miR-148a-3p	100	hsa-miR-5011-5p	96	hsa-miR-34a-3p	95	hsa-miR-548a-5p
96	hsa-miR-152-3p	100	hsa-miR-190a-3p	93	hsa-miR-4803	95	hsa-miR-548h-5p
96	hsa-miR-148b-3p	99	hsa-miR-3163	92	hsa-miR-4263	95	hsa-miR-548i
95	hsa-miR-3148	96	hsa-miR-410-3p	89	hsa-miR-939-5p	95	hsa-miR-548as-5p
91	hsa-miR-1266-5p	96	hsa-miR-2053	87	hsa-miR-4262	95	hsa-miR-548d-5p
88	hsa-miR-7110-3p	95	hsa-miR-5706	87	hsa-miR-150-5p	95	hsa-miR-548w
87	hsa-miR-4518	95	hsa-miR-4782-5p	86	hsa-miR-5196-5p	95	hsa-miR-548ab
87	hsa-miR-302c-5p	95	hsa-miR-15b-5p	86	hsa-miR-181b-5p	95	hsa-miR-548ay-5p
86	hsa-miR-374a-5p	95	hsa-miR-877-3p	86	hsa-miR-4747-5p	95	hsa-miR-548ad-5p
86	hsa-miR-942-5p	95	hsa-miR-16-5p	86	hsa-miR-181a-5p	95	hsa-miR-548b-5p
85	hsa-miR-7151-3p	95	hsa-miR-8485	86	hsa-miR-181d-5p	95	hsa-miR-548o-5p
83	hsa-miR-4311	95	hsa-miR-15a-5p	86	hsa-miR-181c-5p	95	hsa-miR-548ar-5p
83	hsa-miR-3688-3p	95	hsa-miR-195-5p	86	hsa-miR-3121-3p	95	hsa-miR-548au-5p
83	hsa-miR-651-3p	94	hsa-miR-374b-3p	85	hsa-miR-10527-5p	95	hsa-miR-548y
82	hsa-miR-1587	94	hsa-miR-7-1-3p	84	hsa-miR-3686	95	hsa-miR-548ae-5p

Tablo 4.3. (devamı) Genler ve miRNA hedefleri (miRDB).

tgfa		vegfa		tnfa		nf-kb1	
Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı
82	hsa-miR-3136-5p	94	hsa-miR-4524a-5p	84	hsa-miR-452-3p	95	hsa-miR-548am-5p
82	hsa-miR-4439	94	hsa-miR-3202	84	hsa-miR-4753-3p	95	hsa-miR-548aq-5p
82	hsa-miR-499a-5p	94	hsa-miR-29c-3p	82	hsa-miR-3617-3p	95	hsa-miR-548c-5p
82	hsa-miR-374b-5p	94	hsa-miR-7-2-3p	82	hsa-miR-1343-5p	95	hsa-miR-559
81	hsa-miR-3915	94	hsa-miR-497-5p	82	hsa-miR-1236-5p	95	hsa-miR-548ak
80	hsa-miR-370-5p	94	hsa-miR-548p			95	hsa-miR-548j-5p
80	hsa-miR-6721-5p	94	hsa-miR-6852-5p			95	hsa-miR-548bb-5p
		94	hsa-miR-29a-3p			94	hsa-miR-548n
		94	hsa-miR-1468-3p			91	hsa-miR-4699-3p
		94	hsa-miR-4775			91	hsa-miR-3663-3p
		94	hsa-miR-4524b-5p			90	hsa-miR-548l
		94	hsa-miR-29b-2-5p			90	hsa-miR-299-5p
		94	hsa-miR-29b-3p			88	hsa-miR-4729
		94	hsa-miR-6838-5p			88	hsa-miR-671-5p
		94	hsa-miR-424-5p			85	hsa-miR-548t-5p
		93	hsa-miR-200c-3p			85	hsa-miR-6801-5p

Tablo 4.3. (devamı) Genler ve miRNA hedefleri (miRDB).

tgfa		vegfa		tnfa		nf-kb1	
Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı
		93	hsa-miR-429			85	hsa-miR-508-3p
		93	hsa-miR-4742-3p			85	hsa-miR-548az-5p
		93	hsa-miR-6839-5p			85	hsa-miR-10393-3p
		93	hsa-miR-200b-3p			84	hsa-miR-4795-3p
		93	hsa-miR-3668			83	hsa-miR-2909
		92	hsa-miR-576-5p			82	hsa-miR-450b-5p
		92	hsa-miR-5692c				
		92	hsa-miR-5692b				
		91	hsa-miR-12129				
		91	hsa-miR-378j				
		89	hsa-miR-2115-3p				
		89	hsa-miR-205-5p				
		89	hsa-miR-939-3p				
		89	hsa-miR-569				
		89	hsa-miR-578				
		88	hsa-miR-6748-5p				

Tablo 4.3. (devamı) Genler ve miRNA hedefleri (miRDB).

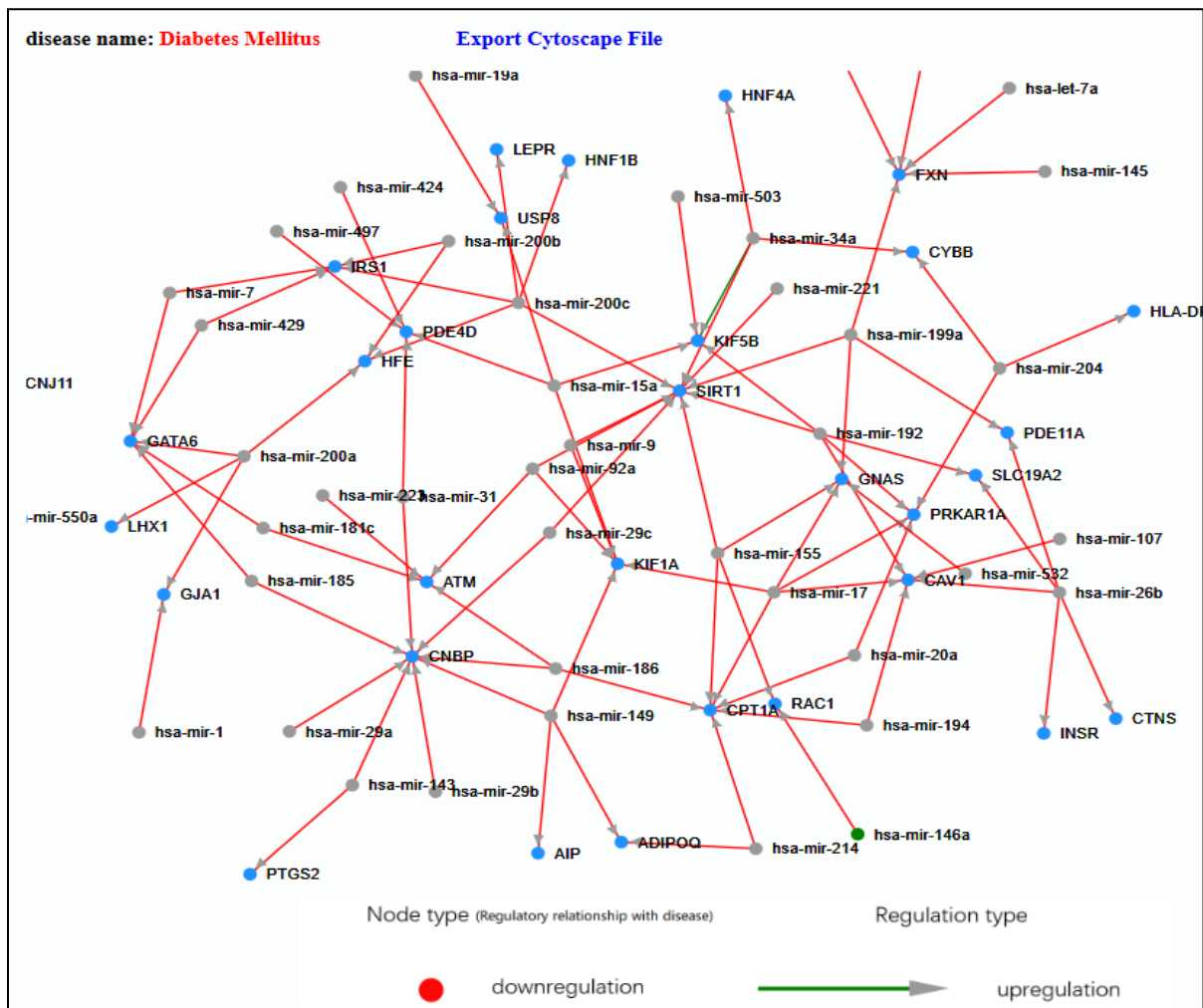
tgfa		vegfa		tnfa		nf-kb1	
Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı
		88	<i>hsa-miR-655-3p</i>				
		88	<i>hsa-miR-451b</i>				
		88	<i>hsa-miR-374c-5p</i>				
		88	<i>hsa-miR-4648</i>				
		87	<i>hsa-miR-361-5p</i>				
		87	<i>hsa-miR-4270</i>				
		87	<i>hsa-miR-6844</i>				
		87	<i>hsa-miR-297</i>				
		87	<i>hsa-miR-1299</i>				
		86	<i>hsa-miR-4441</i>				
		86	<i>hsa-miR-5580-3p</i>				
		85	<i>hsa-miR-6083</i>				
		85	<i>hsa-miR-4766-3p</i>				
		84	<i>hsa-miR-186-5p</i>				
		84	<i>hsa-miR-503-5p</i>				
		84	<i>hsa-miR-516b-5p</i>				

Tablo 4.3. (devamı) Genler ve miRNA hedefleri (miRDB).

tgfa		vegfa		tnfa		nf-kb1	
Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı	Hedef skoru	miRNA adı
		81	hsa-miR-140-5p				
		81	hsa-miR-3618				
		81	hsa-miR-6501-5p				
		80	hsa-miR-646				
		80	hsa-miR-3152-3p				

4.9.3. Diabetes Mellitus'ta miRNA-Hedef Ağı (HMDD v4.0)

HMDD v4.0 veritabanı kullanılarak elde edilen miRNA'ların Diabetes Mellitus ile doğrudan ilişkisi sorgulanmıştır. Diabetes Mellitus'ta miRNA-hedef ağı Şekil 4.13.'te verilmiştir. Yapılan taramada, analiz edilen genlere karşılık gelen miRNA'ların Diabetes Mellitus ile deneysel olarak desteklenmiş ilişkileri bulunmamıştır. Çalışılan genler ve miRNA hedeflerinin yeni olduğu belirlenmiştir. Sistem biyolojisi bakış açısıyla ağın genel yapısı epigenetik mekanizmaların diyabet üzerindeki etkilerini bütüncül biçimde ortaya koyduğunu ve miRNA'ların hedef genler aracılığıyla hücresel fonksiyonları nasıl modüle ettiğini görsel olarak yansıtmaktadır.



Şekil 4.13. Diyabet ile ilişkili olduğu deneysel olarak doğrulanmış miRNA'lar ve hedef genlerini gösteren ağ diyagramı. Mavi düğümler diyabetle ilişkili genleri (SIRT1, ATM, CNBP), gri düğümler ise bu genleri hedefleyen miRNA'ları (*hsa-miR-34a*, *hsa-miR-29c*, *hsa-miR-31*) temsil etmektedir. Yeşil düğüm, yalnızca *hsa-miR-214*'ü ve bu miRNA'nın upregülasyon (ifade artışı) ile ilişkisini göstermektedir. Kırmızı oklar, ilgili miRNA'nın hedef gen üzerinde downregülasyon (baskılama) etkisini; yeşil ok ise upregülasyon (artırıcı etki) potansiyelini ifade etmektedir. Örneğin, *hsa-miR-34a*'nın SIRT1 genine olan baskılayıcı etkisi kırmızı okla gösterilmiş olup, bu etkileşim diyabetik patofizyoloji ile ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde, *hsa-miR-214*'ün CPT1A genine olan ve yeşil okla gösterilen bağlantısı, gen ekspresyonunu artırabileceğini ve bu düzenlemenin diyabetle bağlantılı olabileceğini göstermektedir.

4.9.4. Spesifik, Korunmuş miRNA Hedeflerinin Analizi (TargetScan)

TargetScan verileri, bulunan miRNA'ların hedefleri için zayıf korunmuş olduğunu göstermiştir. Korunmuş bölgeler için yapılan analizlerde spesifik miRNA'lar elde edilmiştir (Şekil 4.14.). Şekil değerlendirildiğinde, *tgfa* geninin 3344–3350. pozisyonunda hsa-miR-301b-3p, miR-3666, miR-301a-3p, miR-454-3p, miR-130b-3p, miR-130a-3p ve miR-4295 gibi birçok miRNA için güçlü bağlanma bölgeleri taşıdığı belirlenmiştir. *Tnfα* geninde ise 451–457. pozisyonda aynı miRNA'ların bağlanma potansiyeli bulunmuştur. Bu durum, tek bir miRNA'nın birden fazla geni hedefleyerek post-transkripsiyonel düzeyde çoklu düzenleme yapabileceğini düşündürmektedir. *vegfa* geninde 166–173. pozisyonda yalnızca hsa-miR-205-5p ile güçlü ve korunmuş bir bağlanma bölgesi saptanmıştır. Ayrıca, *nf-κb1* geninin 29–35. pozisyonunda hsa-miR-9-5p için olası bir hedeflenme bölgesi tanımlanmıştır.

Conserved		Conserved	
	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)		Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 3344-3350 of TGFA 3' UTR	5' ...UGAUGUCUGUAUUG-UUGCACUG... 3'	Position 451-457 of TNF 3' UTR	5' ...UCCUCUUAUUUAUG-UUGCACUU... 3'
hsa-miR-301b-3p	CGAAACUGUUAUAGUAACGUGAC	hsa-miR-130b-3p	UACGGGAAAGUAGUAACGUGAC
Position 3344-3350 of TGFA 3' UTR	5' ...UGAUGUCUGUAUUGUUGCACUG... 3'	Position 451-457 of TNF 3' UTR	5' ...UCCUCUUAUUUAUGUUGCACUU... 3'
hsa-miR-3666	AGCCGUAUGAUGAAGACGUGAC	hsa-miR-301a-3p	CGAAACUGUUAUAGUAACGUGAC
Position 3344-3350 of TGFA 3' UTR	5' ...UGAUGUCUGUAUUGUUGCACUG... 3'	Position 451-457 of TNF 3' UTR	5' ...UCCUCUUAUUUAUGUUGCACUU... 3'
hsa-miR-301a-3p	CGAAACUGUUAUAGUAACGUGAC	hsa-miR-130a-3p	UACGGGAAAGUAGUAACGUGAC
Position 3344-3350 of TGFA 3' UTR	5' ...UGAUGUCUGUAUUGUUGCACUG... 3'	Position 451-457 of TNF 3' UTR	5' ...UCCUCUUAUUUAUGUUGCACUU... 3'
hsa-miR-454-3p	UGGGAUUAUCGUUAUACGUGAU	hsa-miR-454-3p	UGGGAUUAUCGUUAUACGUGAU
Position 3344-3350 of TGFA 3' UTR	5' ...UGAUGUCUGUAUUGUUGCACUG... 3'	Position 451-457 of TNF 3' UTR	5' ...UCCUCUUAUUUAUGUUGCACUU... 3'
hsa-miR-130b-3p	UACGGGAAAGUAGUAACGUGAC	hsa-miR-3666	AGCCGUAUGAUGAAGACGUGAC
Position 3344-3350 of TGFA 3' UTR	5' ...UGAUGUCUGUAUUGUUGCACUG... 3'	Position 451-457 of TNF 3' UTR	5' ...UCCUCUUAUUUAUGUUGCACUU... 3'
hsa-miR-130a-3p	UACGGGAAAGUAGUAACGUGAC	hsa-miR-301b-3p	CGAAACUGUUAUAGUAACGUGAC
Position 3344-3350 of TGFA 3' UTR	5' ...UGAUGUCUGUAUUGUUGCACUG... 3'	Position 451-457 of TNF 3' UTR	5' ...UCCUCUUAUUUAUGUUGCACUU... 3'
hsa-miR-4295	UUCUUUUUGUAACGUGAC	hsa-miR-4295	UUCUUUUUGUAACGUGAC
Conserved		Conserved	
	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)		Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 166-173 of VEGFA 3' UTR	5' ...AUCCAGAAACUGAAUGAAGGA... 3'	Position 29-35 of NFKB1 3' UTR	5' ...UCCACACCGUGUAAACCAAGC... 3'
hsa-miR-205-5p	GUCUGAGGCCACCUUACUCCU	hsa-miR-9-5p	AGUAUGUGAUCUUAUUGUUUCU

Şekil 4.14. Spesifik, korunmuş miRNA hedeflerinin analizi. TargetScan 8.0 veritabanına göre *tgfa*, *tnfa*, *vegfa* ve *nf-κb1* genlerinin 3' UTR (çevrilmeyen bölge) dizilerinde evrimsel olarak korunmuş miRNA bağlanma bölgeleri tanımlanmıştır. Her tabloda, üst satırda hedef gen dizisi, alt satırda ise potansiyel olarak bağlanabilecek miRNA dizisi hizalı biçimde verilmiştir. Baz eşleşmeleri dikey çizgiler (||||) ile gösterilmiş olup, bu hizalamalar yalnızca dizilim benzerliğini değil, aynı zamanda mRNA'nın translasyonunun baskılanmasına veya yıkımına yol açabilecek potansiyel etkileşimleri yansıtmaktadır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, diyabetin ve tedavi amaçlı kullanılan PMA'nın, $tg\alpha$, $veg\alpha$, $tnf\alpha$, $nfe2$, $nf-kb1$, $nf-kb2$ ve $ctnnb1$ genlerinin ekspresyon düzeylerine etkisi incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda, her bir genin ekspresyonunda farklı gruplar arasında anlamlı değişiklikler gözlemlenmiş olup, bu değişiklikler diyabetin ve PMA tedavisinin etkilerini yansıttığı söylenebilir. Bu bulgular, diyabetin ve inflamasyonun gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin yanı sıra, PMA tedavisinin moleküler düzeyde iyileşme süreçlerini nasıl modüle ettiğini anlamamıza yardımcı olmaktadır.

PMA uygulamasının yara iyileşmesini destekleyici terapötik etkileri, çeşitli klinik ve deneysel çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu çalışmalar, PMA uygulamasının yalnızca yara iyileşme süresini kısaltmakla kalmayıp, aynı zamanda yara derinliği ve ağrı şiddetinde de anlamlı azalmalar sağladığını göstermektedir. Özellikle, hücresel proliferasyonun uyarılmasıyla ilişkili moleküler mekanizmaların aktive edilmesi yoluyla PMA'nın bası yaraları gibi kronik yara modelleri üzerindeki olumlu etkileri vurgulanmıştır [113, 114].

Manyetik alan uygulamalarının yara iyileşmesini destekleyici potansiyeline dair henüz yeterli sayıda çalışma bulunmamakla birlikte, bazı araştırmacılar mıknatısların bu süreçte rol oynayabileceğini ileri sürmüştür. Nitekim kütanöz yara iyileşmesini inceleyen bir hayvan modelinde, manyetik alan uygulamasının yara kapanma sürecini hızlandırdığı gösterilmiştir [115].

Diyabetik bireylerde yara iyileşmesi, hiperglisemik ortamın neden olduğu inflamatuvar disregülasyon, vasküler yetersizlik ve hücresel disfonksiyon nedeniyle belirgin şekilde yavaşlamaktadır. Bu bağlamda, PMA'nın diyabetik ülser formasyonunu ve ilerlemesini baskılayarak nekroz oluşumunu önleyebileceği ve amputasyon insidansını azaltabileceği ileri sürülmektedir [116]. Ayrıca, farklı manyetik alan yoğunluklarında (2 mT ve 10 mT) uygulanan PMA tedavilerinin yara iyileşmesinin çeşitli evrelerinde biyomekanik özellikler üzerinde farklı etkiler oluşturduğu bildirilmiştir. Bu durum, tedavi protokolü parametrelerinin iyileşme süreci üzerindeki belirleyici rolüne işaret etmektedir [117].

Yara iyileşme sürecinde PMA'nın etkili olduğu düşünülen temel mekanizmalardan biri, gen ekspresyon profillerinde oluşturduğu düzenleyici değişikliklerdir. Bu kapsamda son dönem çalışmalarda, inflamatuvar süreçlerde görev alan genlerin PMA tarafından modüle edildiği rapor edilmiştir. Özellikle venöz bacak ülseri modelinde yapılan bir çalışmada, PMA'nın $tg\beta$, $COX2$, $IL6$, $IL1\beta$ ve $tnf\alpha$ gibi genlerin ekspresyonunu düzenleyerek inflamasyonu azalttığı ve iyileşme sürecini desteklediği gösterilmiştir [118].

$Tg\alpha$, hücre proliferasyonunu ve doku iyileşmesini düzenleyen önemli bir büyüme faktörüdür. Özellikle yaralanma sırasında, $tg\alpha$ 'nın dokuların yeniden yapılanmasında ve iyileşme sürecinin hızlandırılmasında büyük bir rol oynadığı bilinmektedir. Epidermal büyüme faktör

reseptörü (EGFR) yolunu aktive ederek epitel hücrelerin çoğalmasını ve dokuların yeniden yapılanmasını teşvik eder [119]. Diyabetik ortamlarda $tg\alpha$ ekspresyonunun baskılanması, hiperaktif inflamasyon, AGE (ileri glikasyon son ürünleri) birikimi ve oksidatif stres gibi faktörlerin gen regülasyonunu olumsuz etkilemesiyle ilişkilidir [48, 120]. Yapılan bir çalışmada $tg\alpha$ ekspresyonunun, diyabetik yaralarda yukarı regüle olduğu gözlenmiştir [121]. Başka bir çalışmada, diyabetik ayak ülserli hastalardan alınan dokularda $tg\alpha$ düzeylerinin arttığı bildirilmiştir [122]. İnsanlardan elde edilen deri dokularında yapılan başka bir çalışmada da yaralanmalarda $tg\alpha$ düzeyinin azaldığını ve bunun inflamasyon evresinin uzayıp proliferasyon evresine geçememekten kaynaklandığı ileri sürülmüştür [123]. Sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada ise $tg\alpha$ düzeylerinin diyabetik sıçanlarda non-diyabetiklere (kontrol) göre 3. günde neredeyse 2 katına çıktığı, sonraki günlerde kontrolle aynı düzeyde olduğu gösterilmiştir [124]. Bu çalışmada da $tg\alpha$ geninin ekspresyon düzeyleri açısından yapılan istatistiksel analizde, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,017$). Diyabetik Sham grubunun $tg\alpha$ ortalamasının, diğer gruplara göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Diyabetik Sham grubunda $tg\alpha$ ortalamasının diğer gruplara kıyasla daha düşük bulunması, diyabetik koşullara özgü çeşitli moleküler, hücresel ve epigenetik mekanizmalarla açıklanabilir. Kronik hiperglisemi, $nf-\kappa b$ aktivasyonu ve oksidatif stres yoluyla $tg\alpha$ gibi büyüme faktörlerinin ifadesini baskılayabilmektedir. Nitekim diyabetik yaralarda epidermal büyüme faktörü (EGF) ve reseptörlerinin düzeylerinde belirgin azalma olduğu bildirilmiştir [125]. Bunun yanı sıra, diyabetik ortamda inflamatuvar M1 makrofaj fenotipinin baskın olması, doku onarımını destekleyen $tg\alpha$ gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonunu azaltmakta ve yara iyileşmesinin proliferatif faza geçişini geciktirmektedir [126]. Ayrıca, miR-130b-3p ve miR-301a-3p gibi mikroRNA'lar $tg\alpha$ mRNA'sını hedef alarak translasyonunu baskılamakta olup, bu durum diyabetik koşullarda daha belirgin hale gelmektedir [127]. Literatürde, pulslu manyetik alan (PMA/PEMA) uygulamalarının diyabetik ortamda hücre proliferasyonunu artırarak yara iyileşmesini desteklediği bildirilmiştir [6]. Benzer şekilde, PEMA'nın fibroblast proliferasyonu ve anjiyogenezi FGF-2 salınımı aracılığıyla uyardığı da rapor edilmiştir [128]. Her ne kadar bu çalışmalarda $tg\alpha$ ekspresyonu veya MAPK/ERK1/2 fosforilasyonu doğrudan ölçülmemiş olsa da elde edilen bulgular, PEMA'nın $tg\alpha$ aracılı MAPK/ERK1/2 sinyal yolunu aktive ederek proliferatif yanıtı destekleyebileceğine işaret etmektedir. Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, Diyabetik Sham grubunda $tg\alpha$ düzeylerinin baskılanmasının hem hiperglisemiye bağlı inflamatuvar yanıt hem de epigenetik düzenleyiciler ile ilişkili olduğu söylenebilir.

PMA uygulamasının $tg\alpha$ ekspresyonunu arttırması, elektromanyetik alanların hücresel seviyede proliferatif sinyalleri tetiklediğini ve anti-inflamatuvar etki gösterebildiğini destekleyen çalışmalara paraleldir. Callaghan ve ark. (2008), PMA uygulamasının epitel proliferasyonunu ve büyüme faktörü salınımını artırarak yara iyileşmesini hızlandırdığını bildirmiştir [128]. Non-

diyabetik gruplarda $tg\alpha$ düzeylerinin yüksek olması, fizyolojik koşullarda bu genin yara onarım sürecinde doğal olarak aktif olduğunu göstermektedir. PMA uygulaması bu durumu daha da desteklemiş görünmektedir (Grup 5>Grup 4), ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Gen ekspresyon düzeyi yara oluşumdan 21 gün sonra değerlendirilmiş olması $tg\alpha$ 'nın iyileşmenin farklı evrelerinde farklı ekspresyon seviyeleri gösterebileceğine işaret edebilir. Diyabetik grupta bu genin ekspresyonunun düşük olması, diyabetin iyileşme süreçlerini nasıl olumsuz etkilediğine dair güçlü bir gösterge olabilir. Diyabet, özellikle kan şekerinin uzun süre yüksek seyretmesi nedeniyle doku iyileşmesini engelleyen bir durumdur ve $tg\alpha$ seviyesinin azalması, iyileşme sürecinin yavaşlamasına veya başarısız olmasına yol açabilir. Bununla birlikte, PMA tedavisinin $tg\alpha$ ekspresyonunu artırıcı etkisi, bu tedavinin diyabetin olumsuz etkilerini telafi etme potansiyeline sahip olduğuna işaret etmektedir. PMA'nın, hücre proliferasyonunu ve iyileşme sürecini hızlandırmak için $tg\alpha$ düzeylerini artırması, yaralanma ve iyileşme sürecinde önemli bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir [129, 130].

Vegfa, anjiyogenezde kritik bir rol oynayan bir faktördür. Yaralanma sonrası dokulara oksijen ve besin temini sağlamak için yeni damarların oluşması gerekmektedir. Vegfa, damar endotel hücrelerinin çoğalmasını teşvik ederek bu süreci başlatır. Vegfa, anjiyogenez sürecinin temel düzenleyicilerindendir. Yara iyileşmesinde vegfa aracılığıyla endotel hücre proliferasyonu, migrasyonu ve damar sızıntısı artışı sağlanarak granülasyon dokusunun oluşumu desteklenir [131]. Kontrol grubunda düşük olması ise bu grupta yara oluşturulmadığından anjiyogenez meydana gelmesine gerek olmamasından kaynaklanabilir [132, 133].

NDS grubunda vegfa seviyelerinin NDD grubuna göre düşük olması, PMA'nın vegfa ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir. Vegfa ekspresyonunun artması, anjiyogenez sürecinin hızlanması ve yaraların daha hızlı iyileşmesi anlamına gelebilir. Ayrıca, PMA tedavisinin vegfa ekspresyonunu artırıcı etkisi, tedavinin anjiyogenez ve iyileşme sürecini teşvik edebileceğini ortaya koymaktadır. DD ve DS grupları arasında fark olmaması diyabetik sıçanlarda vegfa ekspresyonuna PMA'nın etkili olmadığını göstermiştir. Bu durum diyabetin etkileri nedeniyle PMA tedavisine rağmen anjiyogenezde aksamalara işaret etmektedir.

Bir çalışmada diyabetik ayak ülser modeli oluşturulmuş sıçanlarda diyabetin vegfa düzeylerinin düşmesine neden olduğu bildirilmiştir [134]. Başka bir çalışmada, elektromanyetik alanın vegfa ekspresyonunu arttırdığı ve diyabetik farelerde yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir [135]. PMA'nın akut iskemili diyabetik sıçanlarda vegfa düzeylerini değiştirmede de bildirilmiştir [136]. Yine diyabetik nefropatili sıçanlarda PMA'nın vegfa düzeylerini düşürerek renal yara iyileşmesini olumsuz etkilediği de gösterilmiştir [137]. Önceki çalışmalar, PMA uygulamasının vegfa salınımını artırarak neovaskülarizasyonu desteklediğini ve bu etkinin yara iyileşmesini hızlandırabileceğini göstermiştir [138, 139]. Hem insanlardan elde edilen hücre kültürü hem de diyabetik fare modelinde vegfa düzeylerinin diyabetle düştüğü ve bu genin

ekspresyon seviyesindeki artışın anjiyogenezi ve dolayısıyla iyileşmeyi hızlandığı da literatürde bildirilmiştir [140].

Kontrol grubundaki vegfa düzeyi (1.07 ± 1.12) ise referans bir değer niteliğinde olup, tüm deneysel grupların karşılaştırılmasında orta düzeyde bir ekspresyon seviyesini temsil eder. Ancak kontrol grubunun Non-Diyabetik Sham grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek vegfa düzeyi göstermesi ($p = 0.016$), bu grubun da fizyolojik stres altındaki dokuya kıyasla daha fazla vegfa sentezlediğini düşündürmektedir.

Bu bulgular, vegfa'nın yara iyileşmesinde çevresel koşullara son derece duyarlı bir gen olduğunu ortaya koymaktadır. PMA uygulaması hem diyabetik hem de non-diyabetik ortamlarda vegfa ekspresyonunu artırarak anjiyogenezi yanıtını modüle edici bir rol oynamıştır. Non-diyabetik fizyolojik durumda vegfa baskılanırken, elektromanyetik alan uygulamasıyla bu baskı aşılmış ve vasküler iyileşme potansiyeli desteklenmiştir.

Tnf α geninin ekspresyonunda, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,020$). tnf α , yara iyileşmesi sürecinde proinflatuvar bir sitokin olarak erken fazda aktifleşir ve nötrofil ile makrofaj infiltrasyonunu uyarır. Ancak tnf α 'nın aşırı ve uzamış ekspresyonu, doku yıkımına ve kronik inflamasyona yol açarak yara iyileşmesini geciktirir [141]. Diyabetik grupta tnf α seviyelerinin yüksek olması, diyabetin inflamatuvar yanıtları güçlendirdiğini ve bu durumun yara iyileşmesini engellediğini gösterebilir. Diyabet, uzun süreli yüksek kan şekeri nedeniyle bağışıklık sisteminin düzensiz çalışmasına ve aşırı inflamasyona neden olabilir. Bu bağlamda, tnf α 'nın yüksek seviyeleri, doku iyileşmesi yerine daha fazla inflamasyonun ortaya çıkmasına neden olabilir. Stz ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda düşük frekanslı PMA'nın tnf α ekspresyon düzeyini düşürerek inflamasyon evresini sonlandırılmasını ve proliferasyonun artarak iyileşmenin hızlandığı gösterilmiştir [142]. Hem sıçan hem de farelerde yapılan bir çalışmada tnf α 'nın inhibe edilmesiyle yara iyileşmesinin hızlandığı bildirilmiştir [143]. İnsanlarla yapılan bir çalışmada da tnf α 'nın diyabetiklerde non-diyabetiklere göre yüksek olduğu bildirilmiştir [144].

Non-Diyabetik Deney grubunda PMA uygulaması sonrası tnf α ekspresyonunun belirgin şekilde baskılanması, elektromanyetik alanların anti-inflatuvar etkisini göstermektedir. Literatürde, PMA'nın tnf- α üretimini azalttığı, nf-kb sinyal yolunu inhibe ederek inflamasyonu yatıştırdığı rapor edilmiştir [145]. Bu sonuçlar, non-diyabetik fizyolojik koşullarda bile PMA'nın immün modülasyon potansiyeline sahip olduğunu desteklemektedir. Diyabetik Deney grubunda tnf ekspresyonunun, Non-Diyabetik Sham grubuna göre daha düşük olması, diyabetik ortamda PMA'nın baskılayıcı etkisinin belirginleştiğini göstermektedir. Bu durum, elektromanyetik tedavilerin diyabet gibi kronik inflamasyonla karakterize hastalıklarda terapötik potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir [146].

Tnf α ekspresyonundaki farklılıklar, diyabetik ortamın proinflamatuvar karakterini ve PMA uygulamasının bu inflamatuvar yanıtı nasıl modüle ettiğini ortaya koymaktadır. Non-diyabetik ortamda tnfa baskılanması, inflamasyonun azaltılması yoluyla yara iyileşmesini destekleyici bir mekanizmaya işaret etmektedir. PMA'nın hem diyabetik hem de non-diyabetik koşullarda tnfa düzeylerini düşürmesi, moleküler düzeyde immün yanıtı düzenleyici etkisini göstermektedir.

Nfe2, oksidatif stresin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Oksidatif stres, diyabet ve yaralanma gibi durumlarda dokulara zarar verebilir ve iyileşme sürecini yavaşlatabilir. nfe2, transkripsiyon faktörleri ailesine ait olup, antioksidan genlerin regülasyonunda rol oynayan nrf2/ARE (Antioxidant Response Element) sinyal sisteminde yer alan bir alt birim olarak kabul edilmektedir. Hücrel redoks dengesinin korunması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkilerinin azaltılması ve oksidatif stres yanıtının düzenlenmesinde görev alır [147].

Bu çalışmada nfe2 gen ekspresyonu gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir (p=0,110). Bu durum, genin diyabet ve PMA uygulamasının etkilerinden bağımsız olarak belirli bir dengeyi koruduğunu düşündürmektedir. Literatürde nfe2 ekspresyonunun diyabetin erken evrelerinde artış gösterdiği, ilerleyen dönemde ise azaldığı bildirilmektedir [148]. Bu bilgi, çalışmamızda gruplar arasında fark gözlenmemesinin olası nedenlerinden biri olarak, örneklerin yara oluşturulmasının 21. gününde alınmasıyla ilişkilendirilebilir. Ayrıca elektromanyetik alan uygulamalarının antioksidan yanıtla ilişkili genleri (özellikle nrf2 ve HO-1 gibi) dolaylı yollardan etkileyebildiği, ancak bu etkinin uygulama dozu, süresi ve hedef hücre tipine bağlı olarak değişkenlik gösterebildiği bildirilmektedir [149, 150]. Bu bağlamda, çalışmamızda kullanılan PMA parametrelerinin nfe2 ekspresyonu üzerinde belirgin bir etki oluşturmamış olması olasıdır.

Nfe2'nin biyolojik aktivitesinin yalnızca gen ekspresyon düzeyine bağlı olmadığı, aynı zamanda post-translasyonel modifikasyonlar gibi ek düzenleyici mekanizmalarla da şekillendiği bilinmektedir [151]. Bu nedenle, nfe2'nin antioksidan savunma sistemindeki rolünün daha net anlaşılabilmesi için, protein düzeyindeki değişimlerin ve fonksiyonel aktivitenin değerlendirileceği ileri analizlerin yapılması gerekmektedir.

Nf-kb1 geni, kanonik nf-kb yolunun önemli bir bileşenidir ve hücrelerde inflamasyon, immün yanıt, hücrel hayatta kalma, apoptozun önlenmesi ve stres yanıtı gibi temel süreçleri düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. Tnf α , IL-1 β gibi sitokinlerin ekspresyonunu tetikler ve yara iyileşmesinde erken faz inflamatuvar yanıtın yöneticisidir [152]. Nf-kb1'in aşırı ekspresyonu, aşırı inflamasyona ve doku hasarının daha da ilerlemesine neden olabilir. Diyabetik gruplarda nf-kb1 ekspresyonunun yüksek olması, diyabetin kronik inflamasyon düzeylerini nf-kb1 aracılığıyla sürdürdüğünü ve bu durumun iyileşme süreçlerini engellediğini düşündürmektedir. PMA uygulamasının bu grubun ekspresyon seviyesini daha da

artırmış olabileceği görülmüştür. Bu durum, PMA'nın bazı koşullarda proinflamatuvar yanıtları da uyurabileceğini düşündürmektedir [153]. Non-Diyabetik Deney grubunda yüksek nf- κ b1 ekspresyonu, elektromanyetik alanın fizyolojik ortamda immün yanıtı aktive edebileceğini göstermektedir. Bu durum, literatürde bildirilen elektromanyetik stimülasyonun immün hücrelerde nf- κ b yolunu aktive edebildiğine dair bulgularla örtüşmektedir [152]. Non-Diyabetik Sham grubunda nf- κ b1 seviyelerinin daha düşük olması, bu grupta inflamasyonun daha kontrollü olduğunu ve iyileşme sürecinin daha verimli ilerlediğini gösterebilir. PMA uygulamasının, nf- κ b1 ekspresyonunu modüle etmesi, tedavinin inflamasyonu düzenleyici bir etkisi olduğuna işaret etmektedir [154, 155].

Nf- κ b1 ekspresyon bulguları hem diyabetik ortamın hem de PMA uygulamasının inflamatuvar sinyal yolağını önemli düzeyde etkileyebileceğini ortaya koymaktadır. Non-diyabetik koşullarda düşük nf- κ b1 düzeylerinin, PMA uygulamasıyla belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir; bu da elektromanyetik stimülasyonun nf- κ b aktivasyonu üzerinden immün hücrelerel süreçleri etkileyebileceğini göstermektedir. Diyabetik ortamda ise zaten yükselmiş olan nf- κ b1 düzeyleri, PMA uygulaması ile daha da yükselebilmektedir. Bu durum, proinflamatuvar etki ile antiinflamatuvar denge arasındaki ilişkinin doz ve süreye duyarlı olduğunu düşündürmektedir.

Nf- κ b2, kanonik olmayan nf- κ b yolunun önemli bir alt birimi olup, özellikle kronik inflamasyon, bağışıklık düzenlenmesi, lenfoid organ gelişimi ve bazı hücrelerel stres yanıtları ile ilişkilidir [156]. Bu gen, tnfr süper ailesi (birbirleriyle ilişkili gen veya protein) üyeleri (örneğin CD40L, BAFF) aracılığıyla aktive edilir ve RelB ile heterodimer oluşturarak hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır. Çalışmada elde edilen bulgular, nf- κ b2 ekspresyonunun diyabetik ortamdan ya da PMA uygulamasından anlamlı biçimde etkilenmediğini göstermektedir. Bu durumun birkaç farklı sebebi olabilir. Kanonik olmayan nf- κ b yolu, akut inflamasyon yerine daha çok gecikmiş veya kronik uyarılarda aktive olduğundan, kullanılan zaman noktası veya deneysel model bu genin aktivasyonu için yeterli olmayabilir [157]. PMA uygulaması daha çok kanonik nf- κ b (nf- κ b1) aktivasyonu üzerinden etkili olmuş olabilir. Nitekim bu çalışmada nf- κ b1 geninde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir [157].

Bu çalışmada nf- κ b2 geninin ekspresyon düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir. Bu bulgu, kanonik olmayan nf- κ b yolunun incelenen koşullarda baskın bir şekilde aktive olmadığını düşündürmektedir. PMA'nın ya da diyabetik ortamın, bu gen üzerinde kısa sürede belirgin bir etki göstermemesi beklenen bir sonuç olabilir. Yine de nf- κ b2'nin fonksiyonel katkılarının anlaşılabilmesi için daha farklı zaman noktalarında, protein düzeyi analizleriyle desteklenmiş deneysel yaklaşımların gerekli olduğu düşünülmektedir.

Ctnnb1, hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve doku homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan bir genetik faktördür. ctnnb1, hücreler arası bağlantı ve sinyal iletiminde görev yapan β -katenin proteinini kodlar. Wnt/ β -katenin sinyal yolu, özellikle

hücre proliferasyonu, migrasyonu ve yara iyileşmesi gibi süreçlerde kritik bir rol oynar [158, 159]. Diyabetik koşullarda Wnt/ β -katenin yolunun baskılandığı, bunun da fibroblast aktivitesinde azalma, epitelizasyonda gecikme ve doku rejenerasyonunun bozulmasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir [159]. Bu çalışma da benzer şekilde, diyabetik gruplarda *ctnnb1* ekspresyonunun düşük seviyelerde olduğu bulunmuştur.

Non-Diyabetik Sham grubunda diğer gruplara göre daha yüksek bir ekspresyon düzeyi gözlemlenmiş olsa da bu fark grup içi varyasyonun yüksekliği nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Yüksek ekspresyon değeri, Wnt/ β -katenin yolunun fizyolojik şartlar altında aktif olabileceğini ve bazal iyileşme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. [160, 161]. Diyabetik ortamda ise ekspresyonun baskılandığı, gözlemlenmiştir.

Non-diyabetik deney (PMA uygulanmış) grubuna ait verilere göre *ctnnb1* ekspresyonuna etkisi sınırlı kalmıştır. Non-diyabetik deney grubunda *ctnnb1* ekspresyonu beklenenin aksine düşüktür. Literatürde elektromanyetik stimülasyonun β -katenin aktivitesini dolaylı olarak etkileyebileceği, ancak bu etkinin hücre tipine ve uygulama parametrelerine göre değiştiği bildirilmiştir [162-164]. PMA uygulamasının da bu genin ekspresyonunu düşürdüğü ancak bu düşüşün istatistiksel anlamlı bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Wnt/ β -katenin yolunun yara iyileşmesindeki rolü göz önünde bulundurulduğunda, *ctnnb1*'in post-transkripsiyonel veya translasyonel düzeyde de değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada deneysel verileri desteklemek amacıyla Protein-protein etkileşimi ile çalışılan genleri hedeflediği öngörülen miRNA'lara yönelik yapılan *in silico* analiz sonuçları incelendiğinde;

PPI analizine göre *tnf α* , *nf- κ b1* ve *nf- κ b2* proteinleri inflamasyon ve bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde merkezi bir ağ yapısı oluşturmuştur (Şekil 4.8.). Bu bulgu, deneysel verilerimizde PMA uygulaması sonrası *tnf α* ve *nf- κ b1* ekspresyonlarında gözlenen artış ile de örtüşmektedir. Literatürde de *tnf*-*nf- κ b* ekseninin kronik inflamasyonu sürdürdüğü ve yara iyileşmesini geciktirdiği bildirilmiştir [165, 166]. Dolayısıyla çalışmamızın bulguları literatürle uyumludur.

Tgfa ve *vegfa*, ağın periferik üyeleri olarak tanımlanmış olup, inflamasyon yanıtının kontrol altına alınmasıyla dolaylı olarak aktive oldukları görülmüştür. Deneysel bulgular da bu öngörüü desteklemektedir: *vegfa*, diyabetik ortamda yüksek düzeyde, non-diyabetik sham grubunda ise baskılanmış; PMA uygulaması sonrasında ise toparlanma göstermiştir. Bu sonuç, *vegf*'in ortam şartlarına göre bozulmuş aktivasyonu (bağlama bağlı düzensiz aktivasyonunun) yara iyileşmesini bozabileceğini, ancak uygun koşullarda iyileşmeyi destekleyebileceğini ortaya koyan önceki çalışmalarla uyumludur [167, 168].

Ctnnb1, Wnt/ β -katenin sinyal yolu aracılığıyla rejeneratif süreçlere katılmıştır. Bu bulgu literatürde daha önce tanımlanan mekanizmalarla uyumludur [158]. *CTNNB1*, Wnt/ β -katenin

sinyal yolu aracılığıyla rejeneratif süreçlere katılmıştır. Bu bulgu literatürde daha önce tanımlanan mekanizmalarla uyumludur; çünkü Wnt ligandlarının reseptörlerine bağlanmasıyla β -kateninin degradasyon kompleksi tarafından yıkımı engellenir; bu birikim nükleusa taşınarak TCF/LEF transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve böylece hücre proliferasyonu ile doku rejenerasyonu süreçleri başlatılır [158]. Nfe2'nin ağdaki bağlantılarının ise daha zayıf olduğu gözlenmiştir. Bu genin diğer genlerle sınırlı etkileşim göstermesi, nfe2'nin daha spesifik ve bağlama (hücre tipi, doku, stres koşulu) özgü bir düzenleyici rol üstlenebileceğini düşündürmektedir. Literatürde nrf2/nfe2'nin redoks homeostazı ve yara iyileşmesinde rol oynadığına dair bulgular bulunmakla birlikte [36], çalışmamız bu açıdan literatüre yeni katkılar sunmakta ve nfe2'nin bağlama özgü rolüne dair daha kapsamlı araştırmalar için ön bilgi niteliğinde olup gelecekte yapılacak deneysel çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde hem deneysel hem de *in silico* bulgular, PMA'nın çoklu biyolojik yolları eş zamanlı etkileyerek inflamasyonun düzenlenmesi, anjiyogenezin desteklenmesi ve rejeneratif süreçlerin uyarılmasında kapsamlı bir modülatör rol üstlenebileceğini ortaya koymaktadır. Bu bulgu literatürdeki önceki çalışmalarla da uyumludur; nitekim oksidatif stresin kontrolü, yara iyileşmesinde kritik bir belirleyici olarak tanımlanmış ve nrf2/nfe2'nin bağlama özgü redoks regülasyonu yoluyla hücrel dengeyi sağladığı bildirilmiştir [36]. Benzer şekilde, Ma (2019) ve Loboda et al. (2016) tarafından yapılan çalışmalar da nrf2'nin oksidatif stres yanıtlarını düzenleyerek inflamatuvar süreçlerin baskılanması ve doku rejenerasyonunun desteklenmesinde merkezi rol üstlendiğini göstermiştir [169, 170]. Çalışmamızın bulguları, bu literatür desteğiyle birlikte değerlendirildiğinde, PMA'nın nrf2 aracılı mekanizmaları da içeren geniş kapsamlı bir biyolojik modülasyon gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Gene Ontology (GO) zenginleştirme analizi sonuçlarına göre öne çıkan biyolojik süreçler arasında nitrik okside hücrel yanıt, sitokin aracılı sinyal yolağının düzenlenmesi, lipopolisakkarit (LPS) yanıtı ve IL-1 β üretiminin düzenlenmesi yer almaktadır (Şekil 4.9.). Bu süreçlerin ortak noktası, doğrudan inflamatuvar yanıt ve bağışıklık sistemi regülasyonu ile ilişkili olmalarıdır. Literatürde de benzer şekilde, tnfa ve nf-kb ailesinin kronik inflamasyonun sürdürülmesinde merkezi rol üstlendiği ve özellikle yara iyileşmesi bağlamında patolojik inflamatuvar ortamın düzenlenmesinde kritik oldukları bildirilmiştir [171, 172]. Çalışmamızda tnfa, nf-kb1 ve nf-kb2 genlerinin bu süreçlerle güçlü biçimde ilişkili bulunması, PMA'nın inflamasyonun kontrolü üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanı sıra, vegfa geninin damar gelişimi ve yeniden şekillenme süreçlerinde görev alması, deneysel bulgularımızda gözlenen anjiyogenez ile ilişkili artışları destekler niteliktedir. Bu bulgu literatürle de uyumludur; zira vegfa'nın endotel hücre proliferasyonu ve vaskülogenezin başlıca düzenleyicisi olduğu ve düşük frekanslı elektromanyetik alan uygulamalarının vegfa

ekspresyonunu artırarak anjiyogenezi destekleyebileceği daha önce gösterilmiştir [173, 174]. Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, PMA uygulamasının hem inflamatuvar yanıtı modüle ederek hem de anjiyogenezi destekleyerek yara iyileşmesine çok yönlü katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Reactome analizinde en zenginleştirilmiş yollar arasında TNFR1 aracılığıyla nf-kb aktivasyonu, vegfa-VEGFR2 sinyal yolu ve Wnt/ β -katenin yolu öne çıkmıştır (Şekil 4.10.). Bu yollar sırasıyla yara iyileşmesinin üç temel fazını temsil etmektedir: inflamasyon, anjiyogenez ve rejeneratif doku yanıtları. Deneysel gen ekspresyon sonuçlarımızla uyumlu olarak, PMA uygulamasının özellikle inflamasyonu düzenleyen tnfr1/nf-kb eksenini ve doku onarımını destekleyen vegf aracılı mekanizmalar üzerinden etkili olabileceği söylenebilir. Bu yolların aktive olması, PMA'nın inflamasyonun dengelenmesi, damar oluşumunun desteklenmesi ve rejeneratif süreçlerin uyarılması gibi çok boyutlu etkiler oluşturabileceğini ortaya koymaktadır. Literatürde de benzer şekilde, PMA'nın bu biyolojik yollar üzerinde düzenleyici etkiler gösterebileceği rapor edilmiştir. Örneğin Ross ve ark. (2013) PMA'nın inflamatuvar süreci modüle edebileceğini [153], Gualdi ve ark. (2021) büyüme faktörlerinin aktivasyonu üzerinden rejeneratif süreçleri destekleyebileceğini [175] ve Helmy & Valdebran (2024) PMA'nın doku onarımı ile vasküler yanıt üzerinde etkili olduğunu bildirmiştir [176]. Bu bağlamda çalışmamız, önceki literatürle büyük ölçüde benzerlik göstermekte ve PMA'nın yara iyileşmesi sürecinde her durumda aynı etkiyi göstermeyen, koşullara ve iyileşme aşamasına göre farklı sonuçlar ortaya çıkarabilen bir düzenleyici (faz-özel ve bağlama duyarlı bir modülatör) olabileceğini desteklemektedir.

DisGeNET veritabanına dayalı hastalık ilişkilendirme analizi, incelenen genlerin özellikle otoimmün hastalıklar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, yara iyileşme bozuklukları ve akciğer hastalıkları ile güçlü biçimde ilişkili olduğunu göstermiştir (Şekil 4.11.). Bu hastalık kategorilerinin ortak özelliği, kronik inflamasyon ve bozulmuş doku onarımıyla yakından bağlantılı olmalarıdır. Bulgularımız, analiz edilen genlerin diyabetle ilişkili komplikasyonlarda gözlenen kronik inflamasyon, bağışıklık sistemi bozuklukları ve iyileşme sorunları ile doğrudan bağlantılı olabileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle yara iyileşme bozukluklarına yönelik biyolojik süreçlerin zenginleşmiş olarak saptanması, çalışmamızın transkripsiyonel potansiyelini destekleyen önemli bir bulgu niteliği taşımaktadır. Ayrıca, bu genlerin ilgili hastalık süreçleriyle bağlantılı olması, elde edilen moleküler düzeydeki sonuçların klinik açıdan da anlamlı olabileceğini göstermektedir. Literatürde de diyabetik yara iyileşmesinde kronik inflamasyonun ve bozulmuş doku onarımının merkezi rol oynadığı rapor edilmiş olup [165, 177], çalışmamızın sonuçları bu bulgularla uyumlu bulunmuştur.

Epigenetik düzenleyiciler arasında yer alan mikroRNA'lar (miRNA'lar), hedefledikleri genlerin ekspresyonunu hem transkripsiyonel hem de transkripsiyonel düzeyde kontrol edebilme

özellikleri sayesinde, birçok hastalığın patogenezinde, tanısında ve tedavi stratejilerinde önemli bir rol üstlenmektedir. Özellikle yara iyileşmesi gibi karmaşık biyolojik süreçlerde miRNA'ların, doku yenilenmesi, inflamasyon, anjiyogenez ve hücrel farklılaşma gibi kritik olayları yönlendirdiği bilinmektedir [178–180].

Bu doğrultuda, gen ekspresyonunda anlamlı farklılık gösteren *tgfa*, *vegfa*, *tnfa* ve *nf-kb1* genleri, miRNA'lar açısından *in silico* yaklaşımla (miRDB, TargetScan ve miRTargetLink 2.0 veri tabanları kullanılarak) değerlendirilmiştir. miRDB verilerine göre *tgfa* için 118, *vegfa* için 232, *tnf* için 59 ve *nf-kb1* için 77 yüksek eşleşme skoruna sahip fonksiyonel miRNA hedefi tanımlanmıştır. Çalışmaya yalnızca eşleşme skoru %80 ve üzeri olan miRNA'lar dahil edilmiş, özellikle *vegfa* için 60'tan fazla miRNA'nın bu eşiği aşması, genin post-transkripsiyonel düzeyde yoğun biçimde düzenlendiğini ve PMA uygulamasının bu miRNA'lar aracılığıyla etkili olabileceğini düşündürmüştür.

Elde edilen yüksek skorlu miRNA'ların önemli bir kısmının HMDD v4.0 veritabanında diyabetik yara iyileşmesi ile daha önce ilişkilendirilmemiş olması (Şekil 4.13.), bu adayların translasyonel potansiyeli yüksek, yeni terapötik hedefler olabileceğini göstermektedir. TargetScan 8.0 analizleri ise bu miRNA bağlanma bölgelerinin çoğunun zayıf korunmuş olduğunu, dolayısıyla tür-özümlü olabileceğini ortaya koymuştur. Bu durum, sıçan modelinden elde edilen verilerin doğrudan insanlara genellenebilirliğini sınırlasa da belirli bazı korunmuş hedef bölgelerin varlığı, bu miRNA'ların insanlar için de geçerli biyolojik düzenleyiciler olabileceğini işaret etmektedir (Şekil 4.14.).

Bu sonuçlar PMA'nın etkilerinin yalnızca transkripsiyonel düzeyle sınırlı kalmadığı, aynı zamanda epigenetik ve post-transkripsiyonel mekanizmalar üzerinden de ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Tanımlanan miRNA'lar, gen ekspresyonunu baskılama, translasyonel inhibisyon veya mRNA stabilitesini azaltma yoluyla yara iyileşmesine ilişkin biyolojik süreçleri hassas biçimde modüle edebilmektedir. Özellikle *tnfa* ve *nf-kb1* gibi inflamasyonla doğrudan ilişkili genlerde tespit edilen miRNA hedefleri, PMA'nın anti-inflamatuar etkilerinin epigenetik mekanizmalar üzerinden gerçekleşebileceğini düşündürmektedir.

miRNA hedef analizlerinin detaylı değerlendirilmesi bazı önemli bulguları öne çıkarmıştır. Özellikle *tnfa* ve *tgfa* genlerinin miR-130b-3p ve miR-301a-3p tarafından ortak olarak hedeflenmesi, bu genlerin eş zamanlı düzenlenebileceğini düşündürmektedir. Literatürde miR-301a-3p'nin M2 makrofaj polarizasyonunu desteklediği ve inflamasyon modülasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir [181]; bu açıdan bulgularımız literatürle uyumludur. *nf-kb1* için ise, literatürde miR-146a, miR-155 ve miR-21 gibi miRNA'ların *nf-kb* sinyalini düzenlediği ortaya konmuştur [182, 183]. Çalışmamızda da *nf-kb1*'in çok sayıda yüksek skorlu miRNA tarafından hedeflenmesi bu verileri destekler niteliktedir. *Vegfa* açısından, miR-205-5p'nin ekspresyonu baskılandığı bilinmektedir [184-186]. Bizim bulgularımızda da non-diyabetik sham grubunda

vegfa'nın baskılanmış olması bu mekanizmayla uyumlu bulunmuş; PMA sonrası gözlenen toparlanma ise elektromanyetik alanın bu baskıyı hafifletebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, çalışmamızda tanımlanan bazı miRNA'ların (örn. hsa-miR-5692a, hsa-miR-1277-5p) daha önce diyabetik yara iyileşmesi bağlamında rapor edilmemiş olması, literatüre yeni ve özgün bir katkı sağlamaktadır. Bu adayların, diyabetik yara tedavisine yönelik potansiyel yeni terapötik stratejiler için umut verici olduğu yönünde değerlendirilmektedir.

Bu analizler, PMA'nın gen ekspresyonunu miRNA düzeyinde etkileyebileceğini işaret etmekte ve miRNA hedefli tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından bir temel oluşturabileceğini düşündürmektedir. Özellikle literatürde daha önce tanımlanmamış, yüksek skorlu ve türler arası korunmuşluğu olan miRNA'ların belirlenmesi, diyabetik yara iyileşmesinde yeni terapötik stratejiler için potansiyel adaylar olabileceğine işaret etmektedir. Ancak bu öngörülerin, deneysel veriler ve fonksiyonel analizlerle desteklenmesi ve transkripsiyonel düzeyde doğrulanması gerekmektedir.

Bu çalışmada elde edilen deneysel ve in silico bulgular, PEMA'nın etkilerinin sabit olmadığını frekans, manyetik şiddet, süre ve iyileşme fazı gibi parametrelere bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini, nf- κ b1 düzeylerinin deney gruplarında belirgin yüksekliği, bu etkinin özellikle inflamatuvar yanıt ve proliferatif süreçlerin dengelenmesi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu artışın biyolojik olarak ne anlama geldiğinin (yara kapanma hızı, granülasyon dokusu oluşumu, kollajen maturasyonu gibi) netleştirilmesi için farklı parametre kombinasyonlarının sistematik olarak test edilmesi gerekmektedir. Nitekim Helmy ve Valdebran'ın (2024) yaptığı kapsamlı derlemede, PEMA'nın yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin frekans, manyetik alan şiddeti, uygulama süresi, doku tipi ve yara iyileşmesinin fazı gibi değişkenlere oldukça duyarlı olduğunu vurgulamaktadır [176]. Yazarlar, bazı koşullarda PEMA'nın hücre proliferasyonu ve büyüme faktörlerini artırarak iyileşmeyi desteklediğini, ancak farklı ayarlarda tam tersi etkiler gösterebildiğini ayrıca PEMA'nın MMP-2, IL-6 ve tgfb gibi sinyal molekülleri üzerinden etkili olabileceğini öne sürmektedir. Bu bağlamda, bulgularımız, PEMA'nın faz-özel ve parametre-duyarlı bir modülatör olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir. Bu durum literatürle de uyumludur; nitekim Helmy & Valdebran (2024), klinik uygulamaya geçişte bu parametrelerin optimize edilmesine yönelik kontrollü çalışmaların kritik bir gereklilik olduğunu vurgulamıştır [176].

Bu analizler, PMA'nın gen ekspresyonunu miRNA düzeyinde etkileyebileceğini işaret etmekte ve miRNA hedefli tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için önemli bir temel oluşturabileceğini düşündürmektedir. Özellikle literatürde daha önce tanımlanmamış, yüksek skorlu ve türler arası korunmuşluğu olan miRNA'ların saptanması, diyabetik yara iyileşmesinde yeni terapötik stratejiler geliştirilmesi açısından dikkat çekici bulgular olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle, in silico olarak belirlenen miRNA-gen etkileşimlerinin,

deneysel veriler ve fonksiyonel analizlerle desteklenerek translasyonel düzeyde doğrulanmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen *in silico* bulguların gen ekspresyon verileriyle entegrasyonu, PMA uygulamasının diyabetik yara iyileşmesindeki olası moleküler hedeflerini ve düzenleyici ağlarını tanımlamada değerli bir çerçeve sunmaktadır. Özellikle inflamasyon ve anjiyogenez ile ilişkili genlerde gözlenen değişimler, PPI ağ analizleri ve miRNA hedef tahminleriyle desteklenmiş, böylece deneysel veriler çok katmanlı bir biyoinformatik yaklaşımla güçlendirilmiştir. Bununla birlikte, *in silico* analizlerin doğası gereği elde edilen tahminlerin doğruluğu, kullanılan veritabanlarının güncelliği, algoritmaların parametreleri ve türler arası farklılıklar gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Ayrıca, bu analizler genellikle hücre tipine veya spesifik patofizyolojik bağlama duyarlı olmaksızın yürütüldüğünden, diyabetik yara mikroçevresindeki özgün düzenleyici mekanizmaların tam olarak yansıtılmaması olasıdır [82, 187, 188].

Diğer taraftan, bu yöntemler çoğunlukla gen veya mRNA düzeyindeki değişimlere odaklanmakta; protein düzeyindeki düzenleyici etkiler, post-translasyonel modifikasyonlar veya hücre içi lokalizasyon farklılıkları gibi ek faktörleri kapsamamaktadır. Gen ekspresyon düzeyinde anlamlı farklılık gözlenmese bile protein fonksiyonu değişebilmektedir. Bu nedenle, *in silico* öngörülerin biyolojik geçerliliğinin fonksiyonel deneylerle (örneğin gen susturma/çoğaltma çalışmaları, luciferase reporter assay) test edilmesi kritik önemdedir [189, 190].

Sonuç olarak, bu bulgular PMA'nın terapötik potansiyeline işaret etmekte ve diyabetik yara iyileşmesinde rol oynayan epigenetik düzenleyici mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. Ancak mevcut verilerin biyolojik anlam ve klinik uygulanabilirlik açısından öncül hipotezler olarak değerlendirilmesi uygun olacaktır. *In silico* tahminlerin sınırlılıkları, kullanılan veritabanlarının kapsamı ve algoritmik farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi [82, 187], inflamatuvar yanıtın kompleks yapısı ve patofizyolojik bağlama özgü regülasyonlar da bu sonuçların yorumlanmasında dikkat edilmesi gereken unsurlardır [188]. Gelecekte yapılacak protein düzeyi analizleri, hücre tipine özgü fonksiyonel çalışmalar ve kapsamlı *in vivo* doğrulamalar, özellikle miRNA biyolojisinde de vurgulandığı üzere fonksiyonel doğrulamanın önemi açısından kritik olacaktır [191]. Bu yaklaşımlar, elde edilen tahminlerin geçerliliğini test ederek hem PMA'nın translasyonel değerini hem de diyabetik yara iyileşmesinde yeni hedeflerin ortaya konmasını mümkün kılacaktır.

Bu değerlendirmeler ışığında, çalışmamızda elde edilen *in silico* bulguların gen ekspresyon verileriyle entegrasyonu, PMA'nın diyabetik yara iyileşmesi sürecinde çok katmanlı ve parametreye duyarlı bir biyolojik modülatör olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, elde edilen öngörülerin biyolojik geçerliliği, fonksiyonel deneylerle doğrulandığında daha güçlü bir translasyonel değere ulaşacaktır. Dolayısıyla, bu bulguların ileride yapılacak protein düzeyi

analizleri, hücre-tipine özgü fonksiyonel testler ve in vivo validasyon çalışmaları ile desteklenmesi, hem PMA'nın terapötik potansiyelini ortaya koymada hem de diyabetik yara iyileşmesinde rol oynayan epigenetik düzenleyici mekanizmaların aydınlatılmasında kritik öneme sahiptir.



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, diyabetik ve non-diyabetik Wistar Albino sıçan modellerinde uygulanan PMA tedavisinin insizyonel yara iyileşmesi üzerindeki etkileri; $tgfa$, $vegfa$, $tnfa$, $nfe2$, $nf-kb1$, $nf-kb2$ ve $ctnnb1$ genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler, protein-protein etkileşim (PPI) ağı yapıları, biyolojik yolak zenginleştirme analizleri ve *in silico* miRNA hedef tahminleri bir arada değerlendirilerek, PMA'nın yara mikroçevresine yönelik biyolojik etkileri bütüncül bir yaklaşımla incelenmiştir. Gen ekspresyon analizleri, non-diyabetik deney grubunda $tgfa$ ve $vegfa$ genlerinin istatistiksel olarak anlamlı biçimde arttığını; tnf ve $nf-kb1/2$ genlerinin ise baskılandığını göstermiştir. Bu sonuçlar, PMA'nın inflamatuvar süreçleri hafifleterek anjiyogenezi desteklediğini ve iyileşme sürecine olumlu katkı sağladığını göstermektedir. $Ctnnb1$ ve $nfe2$ genlerinde istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon değişikliği gözlenmemiş olmakla birlikte, bu genlerin bağlama özgü yolaklarda görev aldığı ve PMA'nın dolaylı etkileriyle düzenlenebileceğini düşündürmektedir.

PPI analizlerinde $tnfa$, $nf-kb1$ ve $nf-kb2$ inflamatuvar süreçlerde merkezi konumda bulunurken; $tgfa$ ve $vegfa$ periferik bağlantılarda yer almıştır. $Ctnnb1$ 'in Wnt/ β -katenin yoluyla rejeneratif süreçlerde; $nfe2$ 'nin ise oksidatif stres yanıtlarında rol aldığı belirlenmiştir. Bu sonuç, PMA'nın yalnızca tekil gen hedeflerine değil, aynı zamanda geniş sinyal iletim ağları üzerinden sistemik düzeyde etkiler oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Fonksiyonel zenginleştirme analizlerinde, yara iyileşmesinin üç temel aşamasını temsil eden inflamasyon ($tnfr1$ aracılı $nf-kb$ aktivasyonu), anjiyogenez ($vegfa$ -VEGFR2 yolu) ve doku yenilenmesi (Wnt/ β -katenin yolu) gibi süreçlerin PMA uygulamasıyla aktive edilebileceği görülmüştür. Gene Ontology (GO) ve Reactome analizleri bu süreci desteklerken; DisGeNET veritabanı üzerinden yapılan hastalık ilişkilendirmeleri, incelenen genlerin otoimmün hastalıklar, yara iyileşme bozuklukları ve inflamatuvar durumlarla güçlü şekilde bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur.

Çalışmada ayrıca, gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı farklılık gösteren $tgfa$, $vegfa$, $tnfa$ ve $nf-kb1$ genlerinin epigenetik düzenleyicileri olan miRNA'lar, miRDB, TargetScan ve miRTargetLink 2.0 veri tabanları kullanılarak *in silico* olarak analiz edilmiştir. Özellikle $vegfa$ için 60'tan fazla yüksek eşleşme skoruna sahip miRNA'nın tanımlanmış olması, bu genin post-transkripsiyonel düzeyde karmaşık bir düzenleme ağına tabi olduğunu göstermektedir. $Tnfa$ ve $nf-kb1$ gibi inflamasyonla ilişkili genlere ait tanımlanan miRNA'lar, PMA'nın anti-inflamatuvar etkilerinin epigenetik düzeyde de gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. miRNA-gen etkileşimlerinin büyük bölümünün HMDD v4.0 veritabanında daha önce diyabetik yara iyileşmesi ile ilişkilendirilmediği görülmüş; bu da tanımlanan miRNA'ların literatürde yeni ve transkripsiyonel potansiyeli yüksek moleküler hedefler olabileceğini göstermektedir. TargetScan analizlerinde bu hedef bölgelerin çoğunun zayıf korunmuş olduğu saptanmış; ancak bazı korunmuş bölgeler bu

etkileşimlerin insanlar için de geçerli olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, gelecekteki transkripsiyonel çalışmalarda türler arası korunmuşluk gösteren miRNA-mRNA etkileşimlerine öncelik verilmesi önerilmektedir.

Genel olarak elde edilen bulgular, non-diyabetik koşullarda PMA'nın genetik ve epigenetik düzeyde anlamlı bir düzenleyici etki oluşturduğunu, diyabetik grupta ise hiperglisemiye bağlı bozulmuş moleküler yanıtların tam olarak geri çevirmemekle birlikte, sınırlı da olsa olumlu yönde etkilenebildiğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, PMA'nın biyolojik etkilerinin uygulama zamanı, süresi, şiddeti ve glisemik durum gibi faktörlere duyarlı olduğunu göstermektedir. Elde edilen bütüncül veriler, PMA'nın yara iyileşmesini desteklemede çok katmanlı bir moleküler etki profiline sahip olduğunu ve özellikle diyabetik yara yönetiminde hedefe yönelik yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine bilimsel bir temel sunduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak, PMA tedavisinin yara iyileşmesi üzerinde yalnızca transkripsiyonel düzeyde değil, aynı zamanda epigenetik (miRNA aracılı) ve post-transkripsiyonel mekanizmalar yoluyla da etkili olabileceği gösterilmiştir. Bulgular, PMA'nın inflamasyonun baskılanması, anjiyogenezin desteklenmesi ve rejeneratif süreçlerin uyarılması yoluyla yara mikroçevresine çok yönlü katkılar sağladığını ortaya koymaktadır. Bu kapsamda tanımlanan miRNA-gen etkileşimlerinin deneysel verilerle doğrulanması, diyabetik yara iyileşmesinde miRNA temelli yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine zemin oluşturacaktır. Gelecekte yapılacak daha geniş ölçekli ve fonksiyonel çalışmalar ise PMA'nın klinik uygulamadaki transkripsiyonel değerini daha net biçimde ortaya koyacağı düşünülmektedir.

ÖNERİLER

1. PMA'nın gen ekspresyonunu ve sinyal yollarını düzenleyici etkisi, özellikle diyabetik yara mikroçevresinde önemli moleküler değişimlere yol açmaktadır. Bu durum, PMA'nın yara iyileşmesini hızlandırıcı etkisini ortaya koyabilecek moleküler çalışmalar ile desteklenmelidir. Bu nedenle, PMA'nın etkinliği farklı doz, süre ve frekans kombinasyonlarıyla klinik öncesi modellerde optimize edilmesi önerilmektedir.

2. Bu çalışmada analiz edilen genler belirli sinyal yollarına ait örnek genlerdir. Ancak geniş ölçekli gen taramaları (örneğin RNA-seq) ile PMA'ya özgü duyarlılık gösteren gen kümeleri tanımlanarak tedaviye duyarlılık biyobelirteçleri geliştirilebilir.

3. TargetScan ve HMDD veritabanı analizlerinde elde edilen sonuçlar, çalışmada tanımlanan miRNA-gen etkileşimlerinin literatürde daha önce tanımlanmamış ve dokuya özgü veya patolojik duruma bağlı olarak ortaya çıkabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, gelecekteki çalışmalarda bu etkileşimlerin in vitro veya in vivo modellerde fonksiyonel deneylerle doğrulanması önerilmektedir.

4. PMA'nın gen düzenleyici etkilerinin yalnızca transkripsiyonel düzeyde değil, aynı zamanda post transkripsiyonel ve epigenetik düzeylerde de ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu nedenle, PMA'nın mikroRNA temelli yaklaşımlarla birlikte değerlendirileceği ileri düzey çalışmaların yapılması özellikle kronik yara tedavisinde daha etkili ve hedefe yönelik kombinasyonel tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

5. STRING, Reactome ve miRNA veritabanlarına dayalı olarak yürütülen ağ analizleri, genlerin yalnızca tekil olarak değil, etkileşim içinde çalıştığını göstermektedir. Bu nedenle, gelecekte yapılması planlanan araştırmaların bireysel gen ya da protein odaklı yaklaşımlardan ziyade gen-protein-miRNA-yolak etkileşimlerini bütüncül olarak ele alan sistem biyolojisi temelli modellerle yürütülmesi, biyolojik süreçlerin daha derinlemesine anlaşılmasına olanak sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- [1]. Bekem, A., Ünal, A., Aydın, H., Tüzün, İ. S., & Karşıdağ, T. (2014). Deri iyileşmesinin mekanik olarak incelenmesi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 2(3), 141–145.
- [2]. Karsidag, T., Asensio, J. A., Kabukcuoglu, F., & Tuzun, S. (2010). Preliminary study comparing the effects of locally and systemically applied L-carnitine on the healing of full-thickness skin defects. *Scandinavian Journal of Surgery*, 99, 147–152.
- [3]. Altındaş, M. (2001, 18–19 Ekim). Diyabetik yara. *Cilt Hastalıkları ve Yara Bakımı Sempozyumu*, İstanbul, 121–126.
- [4]. Seifter, E., Rettura, G., Padawer, J., Stratford, F., Kambosos, D., & Levenson, S. M. (1981). Impaired wound healing in streptozotocin diabetes: Prevention by supplemental vitamin A. *Annals of Surgery*, 194(1), 42–50.
- [5]. Volmer-Thole, M., & Lobmann, R. (2016). Neuropathy and diabetic foot syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 917.
- [6]. Cheing, G. L. Y., Li, X., Huang, L., Kwan, R. L. C., & Cheung, K. K. (2014). Pulsed electromagnetic fields (PEMF) promote early wound healing and myofibroblast proliferation in diabetic rats. *Bioelectromagnetics*, 35(3), 161–169.
- [7]. Goudarzi, I., Hajizadeh, S., Salmani, M. E., & Abrari, K. (2010). Pulsed electromagnetic fields accelerate wound healing in the skin of diabetic rats. *Bioelectromagnetics*, 31(4), 318–323.
- [8]. Strauch, B., Patel, M. K., Navarro, J. A., Berdichevsky, M., Yu, H. L., & Pilla, A. A. (2007). Pulsed magnetic fields accelerate cutaneous wound healing in rats. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 120(2), 425–430.
- [9]. Athanasiou, A., Karkambounas, S., Batistatou, A., Lykoudis, E., Katsaraki, A., Kartsioni, T., Papalois, A., & Evangelou, A. (2007). The effect of pulsed electromagnetic fields on secondary skin wound healing: An experimental study. *Bioelectromagnetics*, 28(5), 362–368.
- [10]. Henry, S. L., Concannon, M. J., & Yee, G. J. (2008). The effect of magnetic fields on wound healing: Experimental study and review of the literature. *Journal of Plastic Surgery*, 8, 393–399.
- [11]. Nagase, T., Sanada, H., Oe, M., Takehara, K., Nishide, K., & Kadowaki, T. (2011). Screening of foot inflammation in diabetic patients by non-invasive imaging modalities. In T. Dinh (Ed.), *Global perspective on diabetic ulcerations* (pp. 27–46). InTech.
- [12]. International Diabetes Federation (IDF). (2025). *Diabetes Atlas* (11th ed.). <https://diabetesatlas.org/resources/idf-diabetes-atlas-2025/>
- [13]. World Diabetes Foundation. (2018). *Turkey – Peer to Peer Diabetes Education Programme: Final report, WDF11-626*. <https://www.worlddiabetesfoundation.org/sites/default/files/DiabetesEducation-Final.pdf>
- [14]. Açar, K. G. (2006). *Diabetik ayakta tedavi yaklaşımları ve Wagner sınıflamasının tedaviyi yönlendirmedeki rolü* (Uzmanlık tezi). Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2. Cerrahi Kliniği, İstanbul.
- [15]. Darcan, S. (2013). *Streptozotosin ile diabet yapılmış sıçanların deri yaraları üzerine Hypericum perforatum merheminin etkilerinin incelenmesi* (Yüksek Lisans tezi). Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.

- [16]. Nishikawa, T., Edelstein, D., & Brownlee, M. (2000). The missing link: A single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney International*, 58, 26–30.
- [17]. Aydın, O. E. (2006). *Vasküler endotel büyüme faktörünün diyabetik yara iyileşmesi üzerine etkileri: Farelerde deneysel çalışma* (Uzmanlık tezi). Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, İzmir.
- [18]. Lorenzi, M. (2007). The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: Attractive, elusive, and resilient. *Experimental Diabetes Research*, 2007, 1–10.
- [19]. Hein, D. K., & King, G. L. (1996). Vascular abnormalities in diabetes mellitus. In J. R. Sowers (Ed.), *Endocrinology of the vasculature* (pp. 135–144). Humana Press.
- [20]. Magill, S. B., & Dananberg, J. (1996). Effects of hyperglycemia on vascular endothelium nitric oxide metabolism. In J. R. Sowers (Ed.), *Endocrinology of the vasculature* (pp. 145–156). Humana Press.
- [21]. Wheeler, S., Singh, N., & Boyko, E. J. (2007). The epidemiology of diabetic neuropathy. In A. Veves & R. A. Malik (Eds.), *Diabetic neuropathy* (2nd ed., pp. 7–30). Humana Press.
- [22]. Laing, P. (1998). The development and complications of diabetic foot ulcers. *American Journal of Surgery*, 176(2), 11–19.
- [23]. Rebolledo, F. A., Soto, J. M. T., & Peña, J. E. (2011). The pathogenesis of the diabetic foot ulcer: Prevention and management. In T. Dinh (Ed.), *Global perspective on diabetic ulcerations* (pp. 155–182). InTech.
- [24]. Stokes, I. A. F., Faris, I. B., & Hutton, W. C. (1975). The neuropathic ulcer and loads on the foot in diabetic patients. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 46, 839–847.
- [25]. Rodero, M. P., & Khosrotehrani, K. (2010). Skin wound healing modulation by macrophages. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3(7), 643–653.
- [26]. Lyons, T. E. (2007). Management of diabetic foot complications. In A. Veves & R. A. Malik (Eds.), *Diabetic neuropathy* (2nd ed., pp. 473–506). Humana Press.
- [27]. Chhabra, S., Chhabra, N., Kaur, A., & Gupta, N. (2017). Wound healing concepts in clinical practice of OMFS. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 16(4), 403–423.
- [28]. Natarajan, S., Williamson, D., Stiltz, A. J., & Harding, K. (2000). Advances in wound care and healing technology. *American Journal of Clinical Dermatology*, 1(5), 269–275.
- [29]. Bennett, N. T., & Schultz, G. S. (1993). Growth factors and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptors. *The American Journal of Surgery*, 165(6), 728–737.
- [30]. Witte, M. B., & Barbul, A. (1997). General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 509–528.
- [31]. Trinh, X. T., Long, N. V., Van Anh, L. T., Nga, P. T., Giang, N. N., Chien, P. N., Nam, S. Y., & Heo, C. Y. (2022). A comprehensive review of natural compounds for wound healing: Targeting bioactivity perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9573. <https://doi.org/10.3390/ijms23179573>

- [32]. Gantwerker, E. A., & Hom, B. D. (2011). Skin: Histology and physiology of wound healing. *Facial Plastic Surgery Clinics*, 19(3), 441–453.
- [33]. Robson, C. M. (2003). Proliferative scarring. *Surgical Clinics of North America*, 83, 557–569.
- [34]. Alliance of Genome Resources. (2024, Aralık). *Gene information: Gene ID 4778*. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4778/#gene-expression>
- [35]. He, F., Ru, X., & Wen, T. (2020). NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4777. <https://doi.org/10.3390/ijms21134777>
- [36]. Süntar, I., Çetinkaya, S., Panieri, E., Saha, S., Buttari, B., Profumo, E., & Saso, L. (2021). Regulatory role of Nrf2 signaling pathway in wound healing process. *Molecules*, 26(9), 2424. <https://doi.org/10.3390/molecules26092424>
- [37]. Lippross, S., Beckmann, R., Streubesand, N., Ayub, F., Tohidnezhad, M., Campbell, G., Kan, Y. W., Horst, F., Sönmez, T. T., Varoga, D., Lichte, P., Jahr, H., Pufe, T., & Wruck, C. J. (2014). Nrf2 deficiency impairs fracture healing in mice. *Calcified Tissue International*, 95(4), 349–361. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9900-5>
- [38]. Kweider, N., Fragoulis, A., Rosen, C., Pecks, U., Rath, W., Pufe, T., & Wruck, C. J. (2011). Interplay between vascular endothelial growth factor (VEGF) and nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2): Implications for preeclampsia. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(50), 42863–42872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.286880>
- [39]. Ambrozova, N., Ulrichova, J., & Galandakova, A. (2017). Models for the study of skin wound healing: The role of Nrf2 and NF-κB. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 161(1), 1–13. <https://doi.org/10.5507/bp.2016.063>
- [40]. Vilcek, J., & Lee, T. H. (1991). Tumor necrosis factor: New insights into the molecular mechanism of its multiple actions. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 7313–7316.
- [41]. Munster, A. M. (1996). The immunologic response and strategies for intervention. In D. N. Herndon (Ed.), *Total burn care* (pp. 279–292). W.B. Saunders.
- [42]. Öztöpalan, D. F., Işık, R., & Durmuş, A. S. (2017). Yara iyileşmesinde büyüme faktörleri ve sitokinlerin rolü. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10(1), 83–88.
- [43]. Duan, Y. W., Chen, S. X., Li, Q. Y., & Zang, Y. (2022). Neuroimmune mechanisms underlying neuropathic pain: The potential role of TNF-α-necroptosis pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7191. <https://doi.org/10.3390/ijms23137191>
- [44]. Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M. S., Ehrlich, H. P., & Brem, H. (2009). The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Journal of Surgical Research*, 153(2), 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.04.023>
- [45]. Kong, M., Li, Y., Wang, K., Zhang, S., & Ji, Y. (2023). Infantile hemangioma models: Is the needle in a haystack? *Journal of Translational Medicine*, 21, 308. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04144-0>
- [46]. Park, Y. R., Sultan, M. T., Park, H. J., Lee, J. M., Ju, H. W., Lee, O. J., Lee, D. J., Kaplan, D. L., & Park, C. H. (2018). NF-κB signaling is key in the wound healing processes of silk fibroin. *Acta Biomaterialia*, 67, 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.12.006>

- [47]. Durand, J. K., & Baldwin, A. S. (2017). Targeting IKK and NF- κ B for therapy. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 107, 77–115.
<https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2016.11.006>
- [48]. Zheng, S. Y., Wan, X. X., Kambey, P. A., Luo, Y., Hu, X. M., Liu, Y. F., Shan, J. Q., Chen, Y. W., & Xiong, K. (2023). Therapeutic role of growth factors in treating diabetic wound. *World Journal of Diabetes*, 14(4), 364–395. <https://doi.org/10.4239/wjd.v14.i4.364>
- [49]. Zushi, S., Shinomura, Y., Kiyohara, T., Miyazaki, Y., Kondo, S., Sugimachi, M., Higashimoto, Y., Kanayama, S., & Matsuzawa, Y. (1998). STAT3 mediates the survival signal in oncogenic ras-transfected intestinal epithelial cells. *International Journal of Cancer*, 78(3), 326–330.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19981029\)78:3<326::AID-IJC12>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19981029)78:3<326::AID-IJC12>3.0.CO;2-4)
- [50]. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, 22(2), 153–183. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>
- [51]. Dhillon, A., Hagan, S., Rath, O., & Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26, 3279–3290. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>
- [52]. Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410, 37–40. <https://doi.org/10.1038/35065000>
- [53]. Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E., & Croce, C. M. (1985). The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*, 229(4720), 1390–1393. <https://doi.org/10.1126/science.3929382>
- [54]. Booth, B. W., & Smith, G. H. (2007). Roles of transforming growth factor- α in mammary development and disease. *Growth Factors*, 25(4), 227–235.
<https://doi.org/10.1080/08977190701750698>
- [55]. Stojadinovic, O., Brem, H., Vouthounis, C., Lee, B., Fallon, J., Stallcup, M., Merchant, A., Galiano, R. D., & Tomic-Canic, M. (2005). Molecular pathogenesis of chronic wounds: The role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *American Journal of Pathology*, 167(1), 59–69. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62953-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62953-7)
- [56]. Zhu, Y., & Li, X. (2023). Advances of Wnt signalling pathway in colorectal cancer. *Cells*, 12, 447. <https://doi.org/10.3390/cells12030447>
- [57]. Choi, S., Yoon, M., & Choi, K. Y. (2022). Approaches for regenerative healing of cutaneous wound with an emphasis on strategies activating the Wnt/ β -catenin pathway. *Advances in Wound Care*, 11(2), 70–86. <https://doi.org/10.1089/wound.2020.1284>
- [58]. Guo, S., & Dipietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219–229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>
- [59]. Long, M., Rojo de la Vega, M., Wen, Q., Bharara, M., Jiang, T., Zhang, R., Zhou, S., Wong, P. K., Wondrak, G. T., Zheng, H., & Zhang, D. D. (2016). An essential role of NRF2 in diabetic wound healing. *Diabetes*, 65(3), 780–793. <https://doi.org/10.2337/db15-0564>
- [60]. Xu, F., Zhang, C., & Graves, D. T. (2013). Abnormal cell responses and role of TNF- α in impaired diabetic wound healing. *BioMed Research International*, 2013, Article 754802.
<https://doi.org/10.1155/2013/754802>

- [61]. Zhu, Y., Wang, Y., Jia, Y., Xu, J., & Chai, Y. (2019). Roxadustat promotes angiogenesis through HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 signaling and accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats. *Wound Repair and Regeneration*, 27(4), 324–334. <https://doi.org/10.1111/wrr.12708>
- [62]. Yuan, Y., Wei, L., Li, F., Guo, W., Li, W., Luan, R., Lv, A., & Wang, H. (2010). Pulsed magnetic field induces angiogenesis and improves cardiac function of surgically induced infarcted myocardium in Sprague-Dawley rats. *Cardiology*, 117(1), 57–63. <https://doi.org/10.1159/000321459>
- [63]. Camacho-Rodríguez, H., Guillen-Pérez, I. A., Roca-Campaña, J., Baldomero-Hernández, J. E., Tuero-Iglesias, Á. D., Galván-Cabrera, J. A., Rodríguez-Cordero, M., Palenzuela-Gardón, D. O., Berlanga-Acosta, J., & Novoa-Pérez, L. I. (2018). Heberprot-P's effect on gene expression in healing diabetic foot ulcers. *MEDICC Review*, 20(3), 10–14. <https://doi.org/10.37757/MR2018.V20.N3.4>
- [64]. Zhang, H., Nie, X., Shi, X., Zhao, J., Chen, Y., Yao, Q., Sun, C., & Yang, J. (2018). Regulatory mechanisms of the Wnt/ β -catenin pathway in diabetic cutaneous ulcers. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1114. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01114>
- [65]. Adeerjiang, Y., Sidike, A., Gan, X. X., Li, Q. T., & Jiang, S. (2025). The role of Wnt3a/ β -catenin/TCF7L2 pathway in diabetes and cardiorenal complications. *Cardiorenal Medicine*, 15(1), 72–82. <https://doi.org/10.1159/000543145>
- [66]. Yang, S., Zhang, Z., Dan, J., Zhou, Q., Wang, X., Li, W., Zhou, L., Yang, L., & Xie, L. (2020). Insulin promotes corneal nerve repair and wound healing in type 1 diabetic mice by enhancing Wnt/ β -catenin signaling. *American Journal of Pathology*, 190(11), 2247–2258. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.08.006>
- [67]. Ma, B., & Hottiger, M. O. (2016). Crosstalk between Wnt/ β -catenin and NF- κ B signaling pathway during inflammation. *Frontiers in Immunology*, 7, 378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00378>
- [68]. Hata, A., & Chen, Y. G. (2016). TGF- β signaling from receptors to Smads. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9), a022061. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022061>
- [69]. Wang, H. L., Wang, L., Zhao, C. Y., & Lan, H. Y. (2022). Role of TGF- β signaling in beta cell proliferation and function in diabetes. *Biomolecules*, 12(3), 373. <https://doi.org/10.3390/biom12030373>
- [70]. Xu, W. D., Wang, J., Yuan, T. L., Li, Y. H., Yang, H., Liu, Y., Zhao, Y., & Herrmann, M. (2016). Interactions between canonical Wnt signaling pathway and MAPK pathway regulate differentiation, maturation and function of dendritic cells. *Cellular Immunology*, 310, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.09.006>
- [71]. Guan, X., He, Y., Wei, Z., Shi, C., Li, Y., Zhao, R., Pan, L., Han, Y., Hou, T., & Yang, J. (2021). Crosstalk between Wnt/ β -catenin signaling and NF- κ B signaling contributes to apical periodontitis. *International Immunopharmacology*, 98, 107843. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107843>
- [72]. Purcell, E. M., & Morin, D. J. (2012). *Electricity and magnetism* (3rd ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139547295>
- [73]. Baysal, U., & Temel, Ö. (2009). Atımlı (darbeli) elektromanyetik alanla tedaviye yardımcı biyomedikal cihaz geliştirilmesi. *Mühendis ve Makine*, 51, 24–29.

- [74]. Watson, T. (2014). Pulsed magnetic fields in therapy. In *Magnetic fields in therapy* (pp. 1–13).
- [75]. Raji, A. M. (1984). An experimental study of the effects of pulsed electromagnetic field (Diapulse) on nerve repair. *Journal of Hand Surgery*, 9(2), 105–112.
- [76]. Bellossi, A., & Desplaces, A. (1991). Effect of a 9 mT pulsed magnetic field on C3H/Bi female mice with mammary carcinoma: A comparison between the 12 Hz and the 460 Hz frequencies. *In Vivo*, 5(1), 39–40.
- [77]. Grant, G., Cadossi, R., & Steinberg, G. (1994). Protection against focal cerebral ischemia following exposure to a pulsed electromagnetic field. *Bioelectromagnetics*, 15(3), 205–216.
- [78]. Kavaliers, M., & Ossenkopp, K. P. (1988). Magnetic fields inhibit opioid-mediated ‘analgesic’ behaviours of the terrestrial snail, *Cepaea nemoralis*. *Journal of Comparative Physiology A*, 162, 551–558.
- [79]. Ahmadian, S., Zarchi, S. R., & Bolouri, B. (2006). Effects of extremely-low-frequency pulsed electromagnetic fields on collagen synthesis in rat skin. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 43, 71–75.
- [80]. Ekins, S., Mestres, J., & Testa, B. (2007). In silico pharmacology for drug discovery: Methods for virtual ligand screening and profiling. *British Journal of Pharmacology*, 152(1), 9–20. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707305>
- [81]. Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: Customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D605–D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>
- [82]. Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., & Vilo, J. (2019). g:Profiler: A web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W191–W198. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz369>
- [83]. Huang, Z., Shi, J., Gao, Y., Cui, C., Zhang, S., Li, J., Zhou, Y., & Cui, Q. (2019). HMDD v3.0: A database for experimentally supported human microRNA–disease associations. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D1013–D1017. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1010>
- [84]. Pinzón, N., Li, B., Martinez, L., Sergeeva, A., Presumey, J., Apparailly, F., & Seitz, H. (2017). microRNA target prediction programs predict many false positives. *Genome Research*, 27(2), 234–245. <https://doi.org/10.1101/gr.205146.116>
- [85]. Radivojac, P., Clark, W. T., Oron, T. R., Schnoes, A. M., Wittkop, T., Sokolov, A., Graim, K., Funk, C., Verspoor, K., Ben-Hur, A., Pandey, G., Yunes, J. M., Talwalkar, A. S., Repo, S., Souza, M. L., Piovesan, D., Casadio, R., Wang, Z., Cheng, J., ... Friedberg, I. (2013). A large-scale evaluation of computational protein function prediction. *Nature Methods*, 10(3), 221–227. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2340>

- [86]. Orchard, S., Ammari, M., Aranda, B., Breuza, L., Briganti, L., Broackes-Carter, F., Campbell, N. H., Chavali, G., Chen, C., del-Toro, N., Duesbury, M., Dumousseau, M., Galeota, E., Hinz, U., Iannuccelli, M., Jagannathan, S., Jimenez, R., Khadake, J., Lagreid, A., Licata, L., ... Hermjakob, H. (2014). The MIntAct project—IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D358–D363. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1115>
- [87]. Jassal, B., Matthews, L., Viteri, G., Gong, C., Lorente, P., Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Cook, J., Gillespie, M., Haw, R., Loney, F., May, B., Milacic, M., Rothfels, K., Sevilla, C., Shamovsky, V., Shorser, S., Varusai, T., Weiser, J., Wu, G., ... D'Eustachio, P. (2020). The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic acids research*, 48(D1), D498–D503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031>
- [88]. Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*, 25(1), 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- [89]. The Gene Ontology Consortium. (2021). The Gene Ontology resource: Enriching a Gold mine. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D325–D334. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1113>
- [90]. Kitano, H. (2002). Systems biology: A brief overview. *Science*, 295(5560), 1662–1664. <https://doi.org/10.1126/science.1069492>
- [91]. Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., & Ishiguro-Watanabe, M. (2023). KEGG: Integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D587–D594. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac963>
- [92]. Chen, Y., & Wang, X. (2020). miRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets. *Briefings in Bioinformatics*, 21(1), 90–101. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>
- [93]. Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, 4, e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- [94]. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- [95]. Bastian, M., Heymann, S., & Jacomy, M. (2009). Gephi: An open source software for exploring and manipulating networks. *Proceedings of the International AAAI Conference on Weblogs and Social Media*, 3(1), 361–362.
- [96]. Alam, S., & Khan, F. (2018). Virtual screening, docking, ADMET and molecular dynamics study of NDM-1 inhibitors. *Scientific Reports*, 8, 8947. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23768-7>
- [97]. Lei, T., Chen, F., Wang, X., Li, Y., Li, D., Tang, Y., & Jiang, H. (2016). ADMET evaluation in drug discovery: 15. Accurate prediction of rat oral acute toxicity using relevance vector machine and consensus modeling. *Journal of Cheminformatics*, 8, 6. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0117-7>

- [98]. Cao, D. S., Xu, Q. S., Hu, Q. N., Liang, Y. Z., & Zhang, L. X. (2012). ADMET evaluation in drug discovery. 11. Pharmacokinetics Knowledge Base (PKKB): A comprehensive database of pharmacokinetic and toxic properties for drugs. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(5), 1132–1141. <https://doi.org/10.1021/ci300112j>
- [99]. Karczewski, K. J., & Snyder, M. P. (2018). Integrative omics for health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 19, 299–310. <https://doi.org/10.1038/nrg.2018.4>
- [100]. Hasin, Y., Seldin, M., & Lusis, A. (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology*, 18, 83. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1215-1>
- [101]. Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorff, L. A., Hunter, D. J., McCarthy, M. I., Ramos, E. M., Cardon, L. R., Chakravarti, A., Cho, J. H., Guttacher, A. E., Kong, A., Kruglyak, L., Mardis, E., Rotimi, C. N., Slatkin, M., Valle, D., Whittemore, A. S., Boehnke, M., ... Visscher, P. M. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 461(7265), 747–753. <https://doi.org/10.1038/nature08494>
- [102]. Torkamani, A., Wineinger, N. E., & Topol, E. J. (2018). The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nature Reviews Genetics*, 19(9), 581–592. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0018-x>
- [103]. Wang, Y. (2015). In silico ADME/T modelling for rational drug design. *Cambridge Journal of Drug Discovery*, 1, e3. <https://doi.org/10.1017/S0033583515000190>
- [104]. Demir, Y. (2025). *Pulslu manyetik alanın diyabetik sıçan deri iyileşmesi üzerine etkileri* (Yüksek Lisans tezi). Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı.
- [105]. Rio, D. C., Ares, M., Jr., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb.prot5439. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>
- [106]. Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- [107]. National Center for Biotechnology Information. (2025, August 20). *NCBI homepage*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [108]. Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- [109]. Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: Protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51, 638–646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1005>
- [110]. Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- [111]. Liu, W., & Wang, X. (2019). Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biology*, 20(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1614-0>

- [112]. Cui, C., Zhong, B., Fan, R., & Cui, Q. (2024). HMDD v4.0: A database for experimentally supported human microRNA–disease associations. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D1327–D1332. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad999>
- [113]. Devine, P. (1998). Electric stimulation and wound healing. *Journal of WOCN*, 25(6), 291–295. [https://doi.org/10.1016/S1071-5754\(98\)90026-2](https://doi.org/10.1016/S1071-5754(98)90026-2)
- [114]. Gupta, A., Taly, A. B., Srivastava, A., Kumar, S., & Thyloth, M. (2009). Efficacy of pulsed electromagnetic field therapy in healing of pressure ulcers: A randomized control trial. *Neurology India*, 57(5), 622–626. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.57820>
- [115]. Henry, S. L., Concannon, M. J., & Yee, G. J. (2008). The effect of magnetic fields on wound healing: Experimental study and review of the literature. *Eplasty*, 8, e40.
- [116]. Kwan, R. L., Wong, W. C., Yip, S. L., Chan, K. L., Zheng, Y. P., & Cheing, G. L. (2015). Pulsed electromagnetic field therapy promotes healing and microcirculation of chronic diabetic foot ulcers: A pilot study. *Advances in Skin & Wound Care*, 28(5), 212–219. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000462012.58911.53>
- [117]. Choi, H. M. C., Cheung, A. K. K., Ng, G. Y. F., & Cheing, G. L. Y. (2018). Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) on the tensile biomechanical properties of diabetic wounds at different phases of healing. *PloS one*, 13(1), e0191074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191074>
- [118]. Costantini, E., Aielli, L., Gualdi, G., Baronio, M., Monari, P., Amerio, P., & Reale, M. (2024). Pulsed radiofrequency electromagnetic fields as modulators of inflammation and wound healing in primary dermal fibroblasts of ulcers. *Bioengineering*, 11(4), 357. <https://doi.org/10.3390/bioengineering11040357>
- [119]. Yadollahpour, A., & Jalilifar, M. (2014). Electromagnetic fields in the treatment of wound: A review of current techniques and future perspective. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8(4), 2863–2877.
- [120]. Brown, R. L., Breeden, M. P., & Greenhalgh, D. G. (1994). PDGF and TGF- α act synergistically to improve wound healing in the genetically diabetic mouse. *Journal of Surgical Research*, 56(6), 562–570. <https://doi.org/10.1006/jsre.1994.1090>
- [121]. Zins, S. R., Amare, M. F., Tadaki, D. K., Elster, E. A., & Davis, T. A. (2010). Comparative analysis of angiogenic gene expression in normal and impaired wound healing in diabetic mice: Effects of extracorporeal shock wave therapy. *Angiogenesis*, 13, 293–304. <https://doi.org/10.1007/s10456-010-9186-9>
- [122]. Yu, G. T., Monie, D. D., Khosla, S., Tchkonja, T., Kirkland, J. L., & Wyles, S. P. (2024). Mapping cellular senescence networks in human diabetic foot ulcers. *Geroscience*, 46(1), 1071–1082. <https://doi.org/10.1007/s11357-023-00854-x>
- [123]. Seria, E., Galea, G., Borg, J., Schembri, K., Grech, G., Tagliaferro, S. S., & Felice, A. (2021). Novel leukocyte-depleted platelet-rich plasma-based skin equivalent as an in vitro model of chronic wounds: A preliminary study. *BMC Molecular and Cell Biology*, 22(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12860-021-00366-6>

- [124]. Vasir, B., Reitz, P., Xu, G., Sharma, A., Bonner-Weir, S., & Weir, G. C. (2000). Effects of diabetes and hypoxia on gene markers of angiogenesis (HGF, cMET, uPA and uPAR, TGF- α , TGF- β , bFGF and vimentin) in cultured and transplanted rat islets. *Diabetologia*, 43(6), 763–772. <https://doi.org/10.1007/s001250051374>
- [125]. Galkowska, H., Wojewodzka, U., & Olszewski, W. L. (2006). Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 14(5), 558–565. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2006.00155.x>
- [126]. Mirza, R. E., Fang, M. M., Ennis, W. J., & Koh, T. J. (2013). Blocking interleukin-1 β induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes*, 62(7), 2579–2587. <https://doi.org/10.2337/db12-1450>
- [127]. Gu, J. J., Fan, K. C., Zhang, J. H., Chen, H. J., & Wang, S. S. (2018). Suppression of microRNA 130b inhibits glioma cell proliferation and invasion, and induces apoptosis by PTEN/AKT signaling. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(1), 284–292. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3233>
- [128]. Callaghan, M. J., Chang, E. I., Seiser, N., Aarabi, S., Ghali, S., Kinnucan, E. R., Simon, B. J., & Gurtner, G. C. (2008). Pulsed electromagnetic fields accelerate normal and diabetic wound healing by increasing endogenous FGF-2 release. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 121(1), 130–141. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000293761.27219.84>
- [129]. Bond, S. R., & Stoll, P. C. (2016). TGF- α and its role in wound healing. *Journal of Wound Care*, 25(2), 77–82. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.2.77>
- [130]. Derynck, R., & Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β receptor signaling. *Nature*, 425(6958), 577–584. <https://doi.org/10.1038/nature02006>
- [131]. Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6), 669–676. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>
- [132]. Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*, 25(4), 581–611. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0011>
- [133]. Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), 932–936. <https://doi.org/10.1038/nature04336>
- [134]. Zhang, Z., Chen, T., Liu, W., Xiong, J., Jiang, L., & Liu, M. (2023). Paeonol accelerates skin wound healing by regulating macrophage polarization and inflammation in diabetic rats. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 27(5), 437–448. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2023.27.5.437>
- [135]. Sheikh, A. Q., Taghian, T., Hemingway, B., Cho, H., Kogan, A. B., & Narmoneva, D. A. (2012). Regulation of endothelial MAPK/ERK signalling and capillary morphogenesis by low-amplitude electric field. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(78), 20120548. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0548>
- [136]. Pan, Y., Dong, Y., Hou, W., Ji, Z., Zhi, K., Yin, Z., Wen, H., & Chen, Y. (2013). Effects of PEMF on microcirculation and angiogenesis in a model of acute hindlimb ischemia in diabetic rats. *Bioelectromagnetics*, 34(3), 180–188. <https://doi.org/10.1002/bem.21755>

- [137]. Li, F., Lei, T., Xie, K., Wu, X., Tang, C., Jiang, M., Liu, J., Luo, E., & Shen, G. (2016). Effects of extremely low frequency pulsed magnetic fields on diabetic nephropathy in streptozotocin-treated rats. *Biomedical Engineering Online*, 15, 8. <https://doi.org/10.1186/s12938-015-0121-6>
- [138]. Peng, L., Fu, C., Wang, L., Zhang, Q., Liang, Z., He, C., & Wei, Q. (2021). The effect of pulsed electromagnetic fields on angiogenesis. *Bioelectromagnetics*, 42(3), 250–258. <https://doi.org/10.1002/bem.22330>
- [139]. Hyldahl, F., Hem-Jensen, E., Rahbek, U. L., Tritsarlis, K., & Dissing, S. (2023). Pulsed electric fields stimulate microglial transmitter release of VEGF, IL-8 and GLP-1 and activate endothelial cells through paracrine signaling. *Neurochemistry International*, 163, 105469. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105469>
- [140]. Chen, C., Lin, L. Y., Chen, J. W., & Chang, T. T. (2023). CXCL5 suppression recovers neovascularization and accelerates wound healing in diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology*, 22(1), 172. <https://doi.org/10.1186/s12933-023-01900-w>
- [141]. Xu, F., Zhang, C., & Graves, D. T. (2013). Abnormal cell responses and role of TNF- α in impaired diabetic wound healing. *BioMed Research International*, 2013, Article 754802. <https://doi.org/10.1155/2013/754802>
- [142]. Mert, T., Gisi, G., Celik, A., Baran, F., Uremis, M. M., & Gunay, İ. (2015). Frequency-dependent effects of sequenced pulsed magnetic field on experimental diabetic neuropathy. *International Journal of Radiation Biology*, 91(10), 833–842. <https://doi.org/10.3109/09553002.2015.1068460>
- [143]. Zheng, L., Hui, Q., Tang, L., Zheng, L., Jin, Z., Yu, B., Wang, Z., Lin, P., Yu, W., Li, H., Li, X., & Wang, X. (2015). TAT-mediated acidic fibroblast growth factor delivery to the dermis improves wound healing of deep skin tissue in rat. *PLoS ONE*, 10(8), e0135291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135291>
- [144]. Daniele, G., Guardado Mendoza, R., Winnier, D., Fiorentino, T. V., Pengou, Z., Cornell, J., Andreozzi, F., Jenkinson, C., Cersosimo, E., Federici, M., Tripathy, D., & Folli, F. (2014). The inflammatory status score including IL-6, TNF- α , osteopontin, fractalkine, MCP-1 and adiponectin underlies whole-body insulin resistance and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica*, 51(1), 123–131. <https://doi.org/10.1007/s00592-013-0543-1>
- [145]. Kim, S. J., Jang, Y. W., Hyung, K. E., Lee, D. K., Hyun, K. H., Jeong, S. H., Min, K. H., Kang, W., Jeong, J. H., Park, S. Y., & Hwang, K. W. (2017). Extremely low-frequency electromagnetic field exposure enhances inflammatory response and inhibits effect of antioxidant in RAW 264.7 cells. *Bioelectromagnetics*, 38(5), 374–385. <https://doi.org/10.1002/bem.22049>
- [146]. Liao, F., Li, Y., Zhang, Z., Yu, Q., & Liu, H. (2025). Pulsed electromagnetic fields modulate energy metabolism during wound healing process: An in vitro model study. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 25(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12906-025-04792-3>
- [147]. Vomhof-Dekrey, E. E., & Picklo, M. J., Sr. (2012). The Nrf2-antioxidant response element pathway: A target for regulating energy metabolism. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(10), 1201–1206. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.005>
- [148]. Negi, C. K., & Jena, G. (2019). Nrf2, a novel molecular target to reduce type 1 diabetes associated secondary complications: The basic considerations. *European Journal of Pharmacology*, 843, 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.10.026>

- [149]. Vincenzi, F., Ravani, A., Pasquini, S., Merighi, S., Gessi, S., Setti, S., Cadossi, R., Borea, P. A., & Varani, K. (2017). Pulsed electromagnetic field exposure reduces hypoxia and inflammation damage in neuron-like and microglial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 232(5), 1200–1208. <https://doi.org/10.1002/jcp.25606>
- [150]. Patruno, A., Amerio, P., Pesce, M., Vianale, G., Di Luzio, S., Tulli, A., Franceschelli, S., Grilli, A., Muraro, R., & Reale, M. (2010). Extremely low frequency electromagnetic fields modulate expression of inducible nitric oxide synthase, endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in the human keratinocyte cell line HaCaT: Potential therapeutic effects in wound healing. *British Journal of Dermatology*, 162(2), 258–266. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09527.x>
- [151]. Zhong, Q., Xiao, X., Qiu, Y., Xu, Z., Chen, C., Chong, B., Zhao, X., Hai, S., Li, S., An, Z., & Dai, L. (2023). Protein posttranslational modifications in health and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. *MedComm*, 4(3), e261. <https://doi.org/10.1002/mco2.261>
- [152]. Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), a001651. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>
- [153]. Ross, C. L., Zhou, Y., McCall, C. E., Soker, S., & Criswell, T. L. (2019). The use of pulsed electromagnetic field to modulate inflammation and improve tissue regeneration: A review. *Bioelectricity*, 1(4), 247–259. <https://doi.org/10.1089/bioe.2019.0026>
- [154]. Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*, 132(3), 344–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
- [155]. Perkins, N. D. (2007). Integrating cell-signaling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrm2086>
- [156]. Sun, S. C. (2012). The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunological Reviews*, 246(1), 125–140. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01088.x>
- [157]. Vallabhapurapu, S., & Karin, M. (2009). Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology*, 27, 693–733. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132641>
- [158]. Clevers, H. (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>
- [159]. Gumede, D. B., Abrahamse, H., & Houreld, N. N. (2024). Targeting Wnt/ β -catenin signaling and its interplay with TGF- β and Notch signaling pathways for the treatment of chronic wounds. *Cell Communication and Signaling*, 22, 244. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01623-9>
- [160]. Polakis, P. (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5), a008052. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008052>
- [161]. MacDonald, B. T., & He, X. (2012). Frizzled and LRP5/6 receptors in Wnt/ β -catenin signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(3), 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.02.003>
- [162]. Gumede, D. B., Abrahamse, H., & Houreld, N. N. (2024). Targeting Wnt/ β -catenin signaling and its interplay with TGF- β and Notch signaling pathways for the treatment of chronic wounds. *Cell Communication and Signaling*, 22, 244. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01623-9>

- [163]. Ma, T., Ding, Q., Liu, C., & Wu, H. (2023). Electromagnetic fields regulate calcium-mediated cell fate of stem cells: Osteogenesis, chondrogenesis and apoptosis. *Stem Cell Research & Therapy*, 14, 133. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03303-w>
- [164]. Fathi, E., & Farahzadi, R. (2017). Enhancement of osteogenic differentiation of rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by zinc sulphate under electromagnetic field via the PKA, ERK1/2 and Wnt/ β -catenin signaling pathways. *PLoS ONE*, 12(3), e0173877. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173877>
- [165]. Eming, S. A., Krieg, T., & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 514–525. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>
- [166]. Liu, Y., Cox, S. R., Morita, T., & Kourembanas, S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells: Identification of a 5' enhancer. *Circulation Research*, 77(3), 638–643. <https://doi.org/10.1161/01.RES.77.3.638>
- [167]. Bang, F. S., Leeberg, V., Ding, M., & Dreyer, C. H. (2024). The effect of VEGF stimulation in diabetic foot ulcers: A systematic review. *Wound Repair and Regeneration*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/wrr.13171>
- [168]. Chakraborty, S., Rajesh, Y., & Das, S. (2022). VEGF signaling in wound healing and tissue regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2564. <https://doi.org/10.3390/ijms23052564>
- [169]. Ma, Q. (2019). Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 59(1), 555–575. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
- [170]. Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: An evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(17), 3221–3247. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>
- [171]. Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265), 265sr6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>
- [172]. Bonnici, L., Suleiman, S., Schembri-Wismayer, P., & Cassar, A. (2024). Targeting signalling pathways in chronic wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 50. <https://doi.org/10.3390/ijms25010050>
- [173]. Saliev, T., Mustapova, Z., Kulsharova, G., Bulanin, D., & Mikhlovsky, S. (2014). Therapeutic potential of electromagnetic fields for tissue engineering and wound healing. *Cell Proliferation*, 47(6), 485–493. <https://doi.org/10.1111/cpr.12142>
- [174]. Wang, A. (2024). Signalling pathways underlying pulsed electromagnetic field-regulated angiogenesis during bone tissue regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, Article 1333566. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1333566>
- [175]. Gualdi, G., Bolelli, F., Govoni, M., & Cadossi, R. (2021). Pulsed electromagnetic fields in musculoskeletal disorders and wound healing: Biological mechanisms and clinical effects. *Bioelectromagnetics*, 42(7), 515–532. <https://doi.org/10.1002/bem.22380>

- [176]. Helmy, J., & Valdebran, M. (2024). An integrative review of pulsed electromagnetic field therapy (PEMF) and wound healing. *Wound Practice and Research*, 32(2), 58–65. <https://doi.org/10.33235/wpr.32.2.58-65>
- [177]. Worsley, A. L., Lui, D. H., Ntow-Boahene, W., Song, W., Good, L., & Tsui, J. (2022). The importance of inflammation control for the treatment of chronic diabetic wounds. *International Wound Journal*, 20(6), 2346–2359. <https://doi.org/10.1111/iwj.14048>
- [178]. Wang, T., Feng, Y., Sun, H., Zhang, L., Hao, L., Shi, C., Wang, J., Li, R., Ran, X., Su, Y., & Zou, Z. (2012). miR-21 regulates skin wound healing by targeting multiple aspects of the healing process. *The American Journal of Pathology*, 181(6), 1911–1920. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.022>
- [179]. Moura, J., Børshiem, E., & Carvalho, E. (2014). The role of microRNAs in diabetic complications—Special emphasis on wound healing. *Genes*, 5(4), 926–956. <https://doi.org/10.3390/genes5040926>
- [180]. Banerjee, J., Chan, Y. C., & Sen, C. K. (2011). MicroRNAs in skin and wound healing. *Physiological Genomics*, 43(10), 543–556. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00157.2010>
- [181]. Wang, X., Luo, G., Zhang, K., Cao, J., Huang, C., Jiang, T., Liu, B., Su, L., & Qiu, Z. (2018). Hypoxic Tumor-Derived Exosomal miR-301a Mediates M2 Macrophage Polarization via PTEN/PI3K to Promote Pancreatic Cancer Metastasis. *Cancer research*, 78(16), 4586–4598. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3841>
- [182]. Boldin, M. P., Taganov, K. D., Rao, D. S., Yang, L., Zhao, J. L., Kalwani, M., Garcia-Flores, Y., Luong, M., Devrekanli, A., Xu, J., Sun, G., Tay, J., Linsley, P. S., & Baltimore, D. (2011). miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 208(6), 1189–1201. <https://doi.org/10.1084/jem.20101823>
- [183]. O'Connell, R. M., Zhao, J. L., & Rao, D. S. (2011). MicroRNA function in myeloid biology. *Blood*, 118(11), 2960–2969. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-291971>
- [184]. Huang, J., Wang, X., Wen, G., & Ren, Y. (2019). miRNA-205-5p functions as a tumor suppressor by negatively regulating VEGFA and PI3K/Akt/mTOR signaling in renal carcinoma cells. *Oncology Reports*, 42(4), 1677–1688. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7307>
- [185]. An, G., et al. (2017). Upregulation of microRNA-205 suppresses vascular endothelial growth factor-mediated wound healing cascade in human keloid fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(5), 1139–1148. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.022>
- [186]. Zhang, J., Zhang, J., Pang, X., Chen, Z., Zhang, Z., Lei, L., Xu, H., Wen, L., Zhu, J., Jiang, Y., Cui, Y., Chen, G., & Wang, X. (2021). MiR-205-5p suppresses angiogenesis in gastric cancer by downregulating the expression of VEGFA and FGF1. *Experimental Cell Research*, 404(2), 112579. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112579>
- [187]. Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. V. (2021). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>

[188]. Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2019). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>

[189]. Hill, M., & Tran, N. (2021). miRNA:miRNA interactions: Mechanisms and consequences in cancer. *Disease Models & Mechanisms*, 14(1), dmm047662. <https://doi.org/10.1242/dmm.047662>

[190]. Wang, Z., Wang, H., Zhou, S., Mao, J., Zhan, Z., & Duan, S. (2024). miRNA interplay: Mechanisms and therapeutic potential. *Molecular Oncology*, 18(3), 473–481. <https://doi.org/10.1002/mog2.93>

[191]. Bartel, D. P. (2018). Metazoan microRNAs. *Cell*, 173(1), 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>



EKLER

EK-A



ÖZGEÇMİŞ



YAYINLAR (Makaleler/Bildiriler/Ödüller)

1. Demir, Y., Uzun, C., Taşdelen, B. Ve Erdal, N. Biomechanical Investigations of Effects of Pulsed Magnetic Field on Wound Healing in Diabetic and Non-Diabetic Rats. International Congress on Biological and Medical Sciences 2018 kongre kitabı içinde – poster sunumu (s. 104). Niğde: Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi.
2. Erdal, D., Demir, Y., Coşkun, A., Çıtırık, L., & Büyükakıllı, B. (2025). Mersin ili ve çevresindeki bölgelerde elektromanyetik alan ölçümü ve olası sağlık etkilerinin incelenmesi. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 18(2):144-155 doi: 10.26559/mersinsbd.1586099