

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

**ÜÇ BOYUTLU YAZICI ARACILIĞI İLE HAZIRLANAN MİR-
132 VE TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ- β 3 YÜKLÜ
LİPOZOM İÇEREN DUAL ETKİLİ KİTOSAN HİDROJEL
İSKELELERİNİN TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN YANIK
YARASINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Aysima SEZER

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2026**

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

**ÜÇ BOYUTLU YAZICI ARACILIĞI İLE HAZIRLANAN MİR-
132 VE TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ- β 3 YÜKLÜ
LİPOZOM İÇEREN DUAL ETKİLİ KİTOSAN HİDROJEL
İSKELELERİNİN TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN YANIK
YARASINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Aysima SEZER

Danışman: Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ

**Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2026**

**ÜÇ BOYUTLU YAZICI ARACILIĞI İLE HAZIRLANAN MİR-132 VE
TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-B3 YÜKLÜ LİPOZOM
İÇEREN DUAL ETKİLİ KİTOSAN HİDROJEL İSKELELERİNİN TEDAVİ
ETKİNLİĞİNİN YANIK YARASINDA DEĞERLENDİRİLMESİ**

Aysima SEZER

Danışman: Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ

Bu tez çalışması 28.08.2026 tarihinde jürimiz tarafından “Biyokimya Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<i>Prof. Dr. Betül ARICA</i> (Hacettepe Üniversitesi)
Üye:	<i>Prof. Dr. Güliz ARMAĞAN</i> (Ege Üniversitesi)
Üye:	<i>Prof. Dr. Zekiye Tuba</i> <i>TÜYLÜ KÜÇÜKKILINÇ</i> (Hacettepe Üniversitesi)
Üye:	<i>Prof. Dr. Ayşe ERCAN</i> (Hacettepe Üniversitesi)
Üye:	<i>Dr. Öğr. Üyesi Yasemin YÜCEL YÜCEL</i> (Altınbaş Üniversitesi)

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

02 Eylül 2026

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

28/08/2026

Ecz. Aysima SEZER

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

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

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

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanının Prof. Dr. Samiye Yabanoğlu Çiftçi danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Aysima SEZER

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, bilimsel gelişimime değerli katkılarda bulunan, desteğini ve anlayışını her zaman hissettiğim çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ'ye,

Tez izleme sürecim boyunca değerli görüş ve önerileriyle çalışmamın şekillenmesine katkı sağlayan, aynı zamanda tez çalışmamın ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilme aşamalarında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Betül ARICA'ya,

Tez çalışmamın hayvan modelinin oluşturulması için gerekli materyallerin teminindeki katkıları ve lipozom karakterizasyon çalışmalarındaki değerli destekleri için Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a,

Tez izleme sürecim boyunca değerli görüş ve önerileriyle çalışmamın gelişmesine katkı sağlayan tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Aymelek GÖNENÇ'e,

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, akademik gelişimime katkıda bulunan Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalındaki değerli hocalarıma,

Doktora sürecinin yalnızca bilimsel değil, aynı zamanda manevi yükünü de benimle paylaşan; güzel anılar biriktirdiğim, desteklerini ve dostluklarını her zaman yanımda hissettiğim değerli çalışma arkadaşlarıma ve dostlarıma,

Hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan, sevgilerini, desteklerini ve bana olan inançlarını her zaman hissettiren; bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan canım aileme sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince 2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında burs desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK 1001 programı kapsamında 123S754 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

Sezer, A., Üç Boyutlu Yazıcı Aracılığı ile Hazırlanan miR-132 ve Transforme Edici Büyüme Faktörü- β 3 Yüklü Lipozom İçeren Dual Etkili Kitosan Hidrojel İskelelerinin Tedavi Etkinliğinin Yanık Yarasında Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2026. Yanık yaralanmalarında mortalite oranı azalmış olmakla birlikte, yanık sonrası gelişen hipertrofik skar bireylerin yaşam kalitesini düşürmekte ve sosyal yaşama katılımını olumsuz etkilemektedir. Bu tez kapsamında, miR-132 mimiğinin anti-inflamatuvar ve pro-anjiyojenik etkileri ile TGF- β 3'ün antifibrotik etkisinin birlikte kullanılması yoluyla kalıcı inflamasyonun ve TGF- β 1 ile ilişkili skar oluşumunun azaltılması, böylece yanık yara iyileşmesinin hızlandırılması ve skarsız iyileşmenin desteklenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla TGF- β 3, DOTMA/DOPC/CHOL bazlı katyonik lipozomlara enkapsüle edilmiş; miR-132 mimiği ise lipozomlarla elektrostatik olarak kompleksleştirilerek lipopleks formülasyonları hazırlanmıştır. Transfeksiyon etkinliğini artırmak amacıyla PEGile edilen formülasyonlar, 100–200 nm partikül büyüklüğü ve +40 mV'ye eşit veya daha yüksek zeta potansiyeli hedeflenerek optimize edilmiştir. Formülasyonların antifibrotik etkinliği, L929 hücrelerinde TGF- β 1 ile oluşturulan fibrozis modelinde gen ve protein düzeylerinde sırasıyla RT-qPCR ve ELISA yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Kombine uygulama, COL1/COL3 oranını optimize ederek kollajen, MMP13, MMP9, RASA1 ve sitokin düzeylerinde dengeli bir antifibrotik yanıt oluşturmuştur. TGF- β 3 yüklü lipozomlar ve miR-132 yüklü lipopleksler, lokal ve kontrollü salım sağlamak amacıyla 3B baskı ile üretilen kitosan bazlı hidrojel iskelelere yüklenmiştir. Optimize edilen hidrojel formülasyonu uygun basılabilirlik ve reolojik özellikler göstermiş; lipozom/lipoplekslerin hidrojel içerisinde disperse edilmesi şişme, degradasyon ve mekanik özellikleri değiştirmiş, yapısal özellikler SEM, DSC ve FTIR analizleriyle değerlendirilmiştir. Salım çalışmalarında TGF- β 3'ün salımı 312 saat boyunca devam ederek %96,64'e ulaşırken, miR-132 lipoplekslerinden aynı sürede %9,84 salım gerçekleşmiş ve ani salım sınırlandırılmıştır. Fare yanık yara modelinde, miR-132 ve TGF- β 3'ü birlikte içeren hidrojel iskele 7–15. günler arasında yara kapanmasını hızlandırmış ve COL1/COL3 oranını düzenlemiştir. Kombinasyon grubunda α -SMA düzeylerinin korunması, ekstraselüler matriks yeniden yapılanmasında miyofibroblast aktivitesi ve kontraktıl kapasitenin devam ettiğini göstermiştir. Sonuç olarak, miR-132 ve TGF- β 3'ün lipozom/lipopleks sistemleri aracılığıyla 3B baskılı kitosan hidrojel iskelelerden birlikte uygulanmasının, yanık yaralarında inflamatuvar ve fibrotik süreçlerin düzenlenmesi ve skarsız yara iyileşmesinin desteklenmesi açısından umut vadeden dual etkili bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Yanık, miR-132, TGF- β 3, yara iyileşmesi, lipozom, hidrojel iskele.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK 1001 programı kapsamında 123S754 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Sezer, A., Evaluation of the Therapeutic Efficacy of Dual-Acting Chitosan Hydrogel Scaffolds Containing miR-132 and Transforming Growth Factor- β 3 Loaded Liposomes Prepared by Three-Dimensional Bioprinting in Burn Wounds, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Program of Biochemistry, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2026. Although mortality rates in burn injuries have decreased, hypertrophic scarring that develops after burns reduces the quality of life of individuals and adversely affects their social participation. In this thesis, the combined use of the anti-inflammatory and pro-angiogenic effects of the miR-132 mimic together with the antifibrotic effect of TGF- β 3 was employed to reduce persistent inflammation and TGF- β 1-associated scar formation, thereby aiming to accelerate burn wound healing and to promote scarless healing. For this purpose, TGF- β 3 was encapsulated into DOTMA/DOPC/CHOL-based cationic liposomes, while the miR-132 mimic was electrostatically complexed with liposomes to prepare lipoplex formulations. To enhance transfection efficiency, the PEGylated formulations were optimized by targeting a particle size of 100–200 nm and a zeta potential equal to or greater than +40 mV. The antifibrotic efficacy of the formulations was evaluated in a fibrosis model induced with TGF- β 1 in L929 cells at the gene and protein levels by RT-qPCR and ELISA, respectively. Combined treatment optimized the COL1/COL3 ratio and produced a balanced antifibrotic response in collagen, MMP13, MMP9, RASA1 and cytokine levels. TGF- β 3-loaded liposomes and miR-132-loaded lipoplexes were incorporated into chitosan-based hydrogel scaffolds fabricated by 3D printing in order to provide local and controlled release. The optimized hydrogel formulation exhibited appropriate printability and rheological properties; dispersion of the liposomes/lipoplexes within the hydrogel altered the swelling, degradation and mechanical properties, and the structural properties were evaluated by SEM, DSC and FTIR analyses. In the release studies, TGF- β 3 release continued over 312 h and reached 96.64%, whereas 9.84% release was obtained from the miR-132 lipoplexes over the same period, with burst release being limited. In a murine burn wound model, the hydrogel scaffold containing miR-132 and TGF- β 3 together accelerated wound closure between days 7 and 15 and regulated the COL1/COL3 ratio. Preservation of α -SMA levels in the combination group indicated that myofibroblast activity and contractile capacity were maintained during extracellular matrix remodelling. In conclusion, co-delivery of miR-132 and TGF- β 3 from 3D-printed chitosan hydrogel scaffolds via liposome/lipoplex systems was shown to be a promising dual-acting approach for regulating inflammatory and fibrotic processes in burn wounds and for supporting scarless wound healing.

Keywords: Burn, miR-132, TGF- β 3, wound healing, liposome, hydrogel scaffold.

This thesis study was supported by TÜBİTAK 1001 Programme, project no. 123S754.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Derinin Yapısı	4
2.1.1. Epidermis	4
2.1.2. Dermis	5
2.1.3. Hipodermis	5
2.2. Yanık	5
2.2.1. Yanık Derecelendirilmesi ve Yanık Türleri	6
2.2.2. Yanık Morfolojisi	7
2.2.3. Yanık Patofizyolojisi	7
2.3. Yara İyileşmesi	8
2.3.1. Yanık Tedavi Stratejileri	10
2.3.2. TGF-β'ların Yara İyileşmesindeki Rolü	12
2.3.3. Yara İyileşmesinde miRNA'ların Rolü	16
2.4. TGF-β3 veya miRNA Yüklü İlaç Taşıyıcı Sistemler	25
2.4.1. Lipozomlar	27
2.5. Yara İyileşmesinde 3 Boyutlu Biyobaskı Yaklaşımları	32
3. GEREÇ ve YÖNTEM	37
3.1. Gereçler	37
3.2. Lipozom/Lipopleks Formülasyonu, Hazırlanması ve Optimizasyonu	39
3.2.1. Lipozom/Lipopleks Formülasyonlarının Mikroakışkan Karıştırma Yöntemiyle Hazırlanması	40
3.2.2. Lipozom/Lipopleks Formülasyonlarının Karakterizasyonu	42
3.2.3. Stabilité Çalışmaları	43
3.2.4. Lipozom Formülasyonlarının Saflaştırılması	44
3.2.5. Lipozom/Lipoplekslerdeki TGF-β3 ve miR-132'nin <i>in vitro</i> Salım Çalışmaları	45
3.3. <i>in vitro</i> Hücresel Alım (Transfeksiyon) Çalışmaları	45
3.4. Lipozom/Lipopleks Formülasyonlarının <i>in vitro</i> Hücre Canlılık Testi	46
3.5. Optimize Edilen Lipozom/Lipopleksler ile Hücre Kültürü Çalışmaları	46
3.5.1. Hücre Kültüründe Fibrozis Modeli Oluşturma	46
3.5.2. Dermal Fibroblast Hücrelerinden RNA İzolasyonu	47
3.5.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	47
3.5.4. RT-qPCR Analizi	48
3.5.5. ELISA	49

3.5.6. Transwell Hücre Migrasyon Testi	49
3.6. Kitosan Hidrojel Dispersiyonlarının Hazırlanması	50
3.6.1. Reolojik Karakterizasyon	51
3.6.2. Hidrojel İskelelerin 3B Biyobaskı Optimizasyon Çalışmaları	51
3.7. Hidrojel İskelelerin Karakterizasyonu	53
3.7.1. pH Değerlerinin Belirlenmesi	53
3.7.2. FTIR Analizi	53
3.7.3. Termal Analiz	53
3.7.4. Şişme, Degradasyon ve Mekanik Dayanım Testi	53
3.7.5. Çok Katmanda Por Geometrisi Tayini	54
3.8. Lipozom/Lipopleks Yüklü Hidrojel İskelelerdeki TGF- β 3 ve miR-132'nin <i>in vitro</i> Salım Çalışmaları	55
3.9. Lipozom/Lipopleks Yüklü Hidrojel İskelelerin <i>in vitro</i> Hücre Canlılık Testi	55
3.10. <i>in vivo</i> Hayvan Deneyleri	56
3.10.1. Yara Kapanmasının Görsel Gözlemi	58
3.10.2. Doku RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve RT-qPCR Analizi	59
3.10.3. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler	60
3.11. İstatistiksel Analiz	62
4. BULGULAR	63
4.1. Lipozom/Lipopleks Formülasyonlarının Karakterizasyonu	63
4.1.1. Partikül Büyüklüğü/Dağılımı ve Zeta Potansiyel Analizi	63
4.1.2. Morfoloji ve Yüzey Özellikleri Analizi	76
4.1.3. TGF- β 3 LP ve miR-132 LPX Formülasyonlarının EE (%) Değerleri	78
4.2. Stabilité Çalışmaları	79
4.3. Lipozom Formülasyonlarının Saflaştırılması	81
4.4. Lipozom/Lipoplekslerdeki TGF- β 3 ve miR-132'nin <i>in vitro</i> Salım Çalışmaları	85
4.5. Optimize Edilen Lipozom/Lipopleksler ile Hücre Kültürü Çalışmaları	88
4.5.1. <i>in vitro</i> Hücre Alım (Transfeksiyon) Çalışmaları	88
4.5.2. Lipozom/Lipopleks Formülasyonlarının <i>in vitro</i> Hücre Canlılık Testi	89
4.5.3. RT-qPCR Analizi	89
4.5.4. ELISA	92
4.5.5. Transwell Hücre Migrasyon Testi	95
4.6. Hidrojel Dispersiyonlarının Formülasyonu ve Hazırlanması	95
4.6.1. Reolojik Karakterizasyon	95
4.6.2. Hidrojel İskelelerin 3B Biyobaskı Çalışmaları	97
4.7. Hidrojel İskelelerin Karakterizasyon Çalışmaları	104
4.7.1. pH Değerlerinin Belirlenmesi	104
4.7.2. FTIR Analizi	105
4.7.3. Termal Analiz	107
4.7.4. Şişme, Degradasyon ve Mekanik Dayanım Testi	109
4.7.5. Çok Katmanda Por Geometrisi Tayini	110
4.8. Lipozom/Lipopleks Yüklü Hidrojel İskelelerdeki TGF- β 3 ve miR-132'nin <i>in vitro</i> Salım Çalışmaları	113
4.9. Lipozom/Lipopleks Yüklü Hidrojel İskelelerin <i>in vitro</i> Hücre Canlılık Testi	114
4.10. <i>in vivo</i> Hayvan Deneyleri	115
4.10.1. Yara Kapanmasının Görsel Gözlemi	116
4.10.2. Doku RT-qPCR Analizi	119

4.10.3. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler	121
5. TARTIŞMA	127
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	162
7. KAYNAKLAR	164
8. EKLER	184
EK-1: Etik Kurul İzin Belgesi	
EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK-3: Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	187

SİMGELER ve KISALTMALAR

3B	Üç boyutlu
ABC	Hızlandırılmış kan klirensi (accelerated blood clearance)
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACTA2	Aktin alfa 2, düz kas
Ago	Argonaute proteini
ALK5	Aktivin reseptörü benzeri kinaz 5
ANOVA	Varyans analizi
BCA	Bisinkoninik asit
CARPA	Kompleman aktivasyonuna bağlı psödoalerji
cDNA	Komplementer DNA
CHOL	Kolesterol
COL1	Kolajen tip I
COL1A1	Kolajen tip I $\alpha 1$ zinciri
COL1A2	Kolajen tip I $\alpha 2$ zinciri
COL3	Kolajen tip III
COL3A1	Kolajen tip III $\alpha 1$ zinciri
Ct	Eşik döngüsü (cycle threshold)
CTEM	Konvansiyonel geçirimli elektron mikroskobu
CXCL1	C-X-C motif kemokin ligandı 1
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DD	Deasetilasyon derecesi
DGCR8	DiGeorge sendromu kritik bölge 8
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOE	Deney tasarımı (design of experiments)
DOPC	1,2-dioleoil-sn-gliserol-3-fosfolin
DOPE	1,2-dioleoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin
DOTAP	N-[1-(2,3-dioleoiloksi)propil]-N,N,N-trimetilamonyum klorür
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleiloksi)propil]-N,N,N-trimetilamonyum klorür
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
DSPE-mPEG2000	1,2-distearoil-sn-gliserol-3-fosfoetanolamin-N-[metoksi(poliolen glikol)-2000]
DTT	Ditiyotritol
ECM	Hücre dışı matriks (ekstraselüler matriks)
EE	Enkapsülasyon etkinliği

EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent testi
ELS	Elektroforetik ışık saçılımı
ERK1/2	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2
FALT	Sabit sulu tabaka kalınlığı
FBS	Fetal sığır serumu
FFPE	Formalinle fikse edilmiş, parafine gömülü
FRR	Akış hızı oranı (su/organik)
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GA	Güven aralığı
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GUV	Dev tek katmanlı vezikül
H&E	Hematoksilen–eozin
HB-EGF	Heparin bağlayıcı EGF benzeri büyüme faktörü
HRP	Yaban turpu peroksidazı
HS	Hidrojel iskele
IL	İnterlökin
İHK	İmmünohistokimyasal / immünohistokimya
JAK/STAT	Janus kinaz / transkripsiyon sinyal iletili ve aktivatörü
KGF	Keratinosit büyüme faktörü
LD	Yükleme kapasitesi (loading capacity)
LP	Lipozom
LPX	Lipopleks
LUV	Büyük tek katmanlı vezikül
MAPK	Mitogenle aktive olan protein kinaz
MHF	Mikro-hidrodinamik odaklama
miRNA / miR	MikroRNA
miRISC	miRNA ile indüklenen susturma kompleksi
MKI67	Ki67 proliferasyon belirteci
MLV	Çok katmanlı vezikül
MMP	Matriks metalloproteinaz
MPS	Mononükleer fagositik sistem
mRNA	Mesajcı RNA
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
MWCO	Molekül ağırlığı kesme değeri
N/P	Nitrojen/fosfat (lipid/nükleik asit) oranı
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NO	Nitrik oksit

PARN	Poli(A)-spesifik ribonükleaz
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCL	Polikaprolakton
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PDI	Polidispersite indeksi
PEG	Poli(etilen glikol)
PFA	Paraformaldehit
PI3K/AKT	Fosfoinozidit 3-kinaz / protein kinaz B
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
pre-miRNA	Öncül miRNA
pri-miRNA	Birincil miRNA
RASA1	RAS p21 protein aktivatörü 1
RES	Retiküloendotelyal sistem
RF	Riboflavin
RM ANOVA	Tekrarlanan ölçümler varyans analizi
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
ROCK	Rho ilişkili sarmal-sarmal içeren protein kinaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
RREB1	Ras'a yanıt veren eleman bağlayıcı protein 1
RSD	Göreceli standart sapma
RT-qPCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RTU	Kullanıma hazır (ready to use)
SELE	E-selektin
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SF	Seyreltme faktörü
α-SMA	Alfa düz kas aktini
SMAD	SMAD ailesi transkripsiyon faktörleri
SS	Standart sapma
STAT3	Transkripsiyon sinyal iletili ve aktivatörü 3
SUV	Küçük tek katmanlı vezikül
SYBR	SYBR Green boyası
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TFR	Toplam akış hızı
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
TGFβ-R1 / TGFβ-R2	TGF- β tip I / tip II reseptörü
TNF	Tümör nekroz faktörü
TRAF6	TNF reseptörü ilişkili faktör 6
UTR	Çevrilmeyen bölge

UV	Ultraviyole
VCAM1	Vasküler hücre adezyon molekülü 1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VIF	Varyans şişirme faktörü
XPO1	Exportin-1
XRN1	Ekzoribonükleaz 1

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Yara iyileşmesinin 4 fazı (40)	8
2.2. miRNA biyogenezi (71).	17
3.1. Lipozom/ lipopleks formülasyonlarının hazırlanışının şematik gösterimi.	40
3.2. Mikroakışkan karıştırma yönteminde kullanılan çipin yapısını gösteren modellere ilişkin örnek fotoğraflar (uFluidic).	40
3.3. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen hayvan deneylerine ilişkin etik kurul onay belgesi.	56
4.1. Optimum formülasyonun (F22) ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değeri.	66
4.2. Standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği.	67
4.3. Normal olasılık grafikleri. A) Ortalama partikül büyüklüğü. B) PDI. C) Zeta potansiyeli.	72
4.4. Artıklar-tahmin edilen değerler grafikleri. A) Ortalama partikül büyüklüğü. B) PDI. C) Zeta potansiyeli.	73
4.5. DOTMA, DOPC ve CHOL bileşenlerinin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli yanıtları için çoklu yanıt optimizasyonu ve bileşik uygunluk grafiği.	74
4.6. Lipozom/lipopleks formülasyonlarının TEM görüntüleri. A-B-C) Boş Lipozom. D-E-F) TGF-β3 LP. G-H-I) miR-132 LPX. A-D-G) 50 nm ölçek, B-E-H) 100 nm ölçek, C-F-I) 200 nm ölçek.	77
4.7. Lipozomal formülasyonların TEM analizi ile partikül büyüklüğü dağılımı.	78
4.8. Termal stabilite ve sızıntı çalışmaları sonuçları. A) TGF-β3 LP ve B) miR-132 LPX.	79
4.9. TGF-β3 LP ve miR-132 LPX'in 4°C'de 336 saat boyunca zamana bağlı olarak A) ortalama partikül büyüklüğü, B) PDI, C) zeta potansiyeli ve D) EE (%) değerleri.	80
4.10. Farklı koşullar altında ultrasantrifüjleme sonrası peletten elde edilen lipozomların ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerleri A) Seyreltme faktörü (SF) 100, 60 000 × g, 1 saat; B) SF 10, 30 000 × g, 2 saat.	83
4.11. Ultrafiltrasyondan sonra lipozom dispersiyonunun ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerleri.	84
4.12. Üretim sonrası ve saflaştırma sonrasında elde edilen A) ortalama partikül büyüklüğü ve B) PDI değerlerinin karşılaştırması.	84
4.13. Farklı koşullar altında gerçekleştirilen ultrasantrifüj sonrası süpernatanttan elde edilen lipozomların ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerleri: A) SF 1, 1 saat boyunca 60 000 × g; B) SF 1, 2 saat boyunca 30 000 × g.	85
4.14. TGF-β3 LP ve serbest TGF-β3'ün in vitro salım profili.	86

Şekil	Sayfa
4.15. miR-132 LPX'in in vitro salım profili. Serbest miR-132 2,12 saat içinde neredeyse tamamen salınmıştır (2 saatte $95,96 \pm 0,011$). miR-132 LPX stabil kalmış ve 4 saatte sadece %3,46, 312 saatte ise %9,84 miRNA salınmıştır.	87
4.16. Lipopleks yoluyla fare fibroblast hücrelerine miR-132 alımının değerlendirilmesi (6-FAM: 6-Karboksifloresin, DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol).	88
4.17. Boş Lipozom, TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) LP + miR-132 LPX ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) LP + miR-132 LPX'in 4, 12 ve 24 saatlerdeki in vitro hücre canlılık testi sonuçları.	89
4.18. Kontrol, fibrozis ve tedavi gruplarında gen ekspresyon seviyeleri.	90
4.19. Kontrol, fibrozis ve tedavi gruplarında ELİSA yöntemi ile belirlenen protein ekspresyon seviyeleri. A) COL1, B) COL3, C) MMP13, D) mKi67 E) RASA1.	93
4.20. Transwell migrasyon testi sonuçları. Göç eden hücrelerin temsili görüntüleri. A) Kontrol, B) TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL), C) miR-132 LPX, D) TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX. E) Deney gruplarındaki göç eden hücre sayısı.	95
4.21. Boş kitosan (%7 (a/h)) hidrojel dispersiyonuna ait A) frekans taraması, B) gerinim taraması, C) viskozite ölçümleri.	96
4.22. Çeşitli derişimlerde ve 0,2 mm katman yüksekliği, farklı koşullar altında basılan kitosan ve kitosan-RF hidrojel iskelelerin görüntüleri.	98
4.23. Kitosan-RF hidrojel iskelelerin, %7 (a/h) kitosan derişiminde ve 0,2 mm katman yüksekliğinde farklı baskı koşullarında elde edilen görüntüleri.	99
4.24. Kitosan-RF hidrojel iskelelerin, %6-7 (a/h) kitosan derişimlerinde, %8 dolulukta ve 0,2 mm katman yüksekliği ile farklı baskı koşullarında elde edilen görüntüleri.	100
4.25. Kitosan-RF hidrojel iskelelerin, %7 (a/h) kitosan derişiminde, 14G iğne ucu kullanılarak, 20 mm/s hız ve 5,4 psi basınçla, %8 dolulukta ve 0,2 mm katman yüksekliğinde katman katman basılmasıyla edilen görüntüleri.	101
4.26. Kitosan-RF hidrojel iskelelerin, %7 (a/h) kitosan derişiminde, 14G iğne ucu kullanılarak 15 mm/s hızla, %8 dolulukta ve 0,2 mm katman yüksekliğinde, farklı basınçlar altında katman katman basılmasıyla elde edilen görüntüleri.	102
4.27. Lipozom yüklü kitosan-RF hidrojel iskelelerin, %8 (a/h) kitosan derişiminde, 14G iğne ucu kullanılarak, 15 mm/s hızla, %8 dolulukta ve 0,2 mm katman yüksekliğinde, farklı basınçlar altında katman katman basılmasıyla elde edilen görüntüleri.	103
4.28. Filament Ekstrüzyon Bütünlüğünün Belirlenmesi.	103
4.29. Filament çökme testi ile sapma açısının belirlenmesi.	104
4.30. FTIR Spektrumu. A) Boş hidrojel dispersiyonu. B) Lipozom/lipopleks yüklü hidrojel dispersiyonu. C) Boş hidrojel iskelesi.	106
4.31. DSC termogramları. A) Boş hidrojel iskele. B) Lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelesi.	108

Şekil	Sayfa
4.32. Mekanik test sonuçları. Boş hidrojel iskelesine ait A) uzamaya karşı yük grafiği ve B) gerinime karşı stres grafiği. Lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelesine ait C) uzamaya karşı yük grafiği ve D) gerinime karşı stres grafiği.	110
4.33. Boş hidrojel iskelesinin katmanlarına ait SEM görüntüleri. A-B) 1. katman, C-D) 2. katman, E-F) 3. katman, G-H) 4. katman.	111
4.34. Lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelesinin katmanlarına ait SEM görüntüleri. A-B-C) 1. katman, D-E-F) 2. katman, G-H-I) 3. katman, J-K-L) 4. katman.	112
4.35. TGF- β 3 LP-HS ve TGF- β 3 LP'nin in vitro salım profili.	113
4.36. miR-132 LPX-HS ve miR-132 LPX'nin in vitro salım profili.	114
4.37. Boş LP-HS ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS'nin 24 ve 48. saatlerdeki in vitro hücre canlılık testi sonuçları.	115
4.38. Farelerde ikinci derece yanık modelinin oluşturulması.	115
4.39. A) Boş LP-HS. B) TGF- β 3 LP-HS. C) miR-132 LPX-HS. D) TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS hidrojel iskelelerin uygulanması. E) Hidrojel iskele yerleştirildikten sonra pansuman yapılan fare görüntüsü.	116
4.40. Yara kapanmasının görsel gözlemi.	117
4.41. Zaman karşı yara kapanma yüzdesi grafiği.	118
4.42. Kontrol ve tedavi gruplarında gen ekspresyon düzeyleri.	120
4.43. H&E boyaması ve yarı kantitatif skor analizi. A) Kontrol. B) Boş LP-HS. C) TGF- β 3 LP-HS. D) miR-132 LPX-HS. E) TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS. F) H&E skorları.	122
4.44. COL1A2 İHK boyaması ve yarı kantitatif skor analizi. A) Kontrol. B) Boş LP-HS. C) TGF- β 3 LP-HS. D) miR-132 LPX-HS. E) TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS. F) COL1A2 yarı kantitatif skorları.	123
4.45. COL3A1 İHK boyaması ve yarı kantitatif skor analizi. A) Kontrol. B) Boş LP-HS. C) TGF- β 3 LP-HS. D) miR-132 LPX-HS. E) TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS. F) COL3A1 yarı kantitatif skorları.	124
4.46. IL-1 α İHK boyaması ve yarı kantitatif skor analizi. A) Kontrol. B) Boş LP-HS. C) TGF- β 3 LP-HS. D) miR-132 LPX-HS. E) TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS. F) IL-1 α yarı kantitatif skorları.	125
4.47. α -SMA İHK boyaması ve yarı kantitatif skor analizi. A) Kontrol. B) Boş LP-HS. C) TGF- β 3 LP-HS. D) miR-132 LPX-HS. E) TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS. F) α -SMA yarı kantitatif skorları.	126

TABLolar

Tablo	Sayfa
2.1. Yara iyileşmesinde önemli miRNA'lar, hedefleri ve etkileri (76)	20
3.1. 33 faktöriyel tasarımında kullanılan faktörlere ilişkin tablo.	41
3.2. in vitro çalışmalarda RT-qPCR analizlerinde kullanılan olan primer dizileri (F: İleri primerin sekansı, R: Revers primerin sekansı).	48
3.3. in vivo deney grupları.	57
3.4. in vivo çalışmalarda RT-qPCR analizlerinde kullanılan olan primer dizileri (F: İleri primerin sekansı, R: Revers primerin sekansı).	59
3.5. İHK analizlerde kullanılan belirteçlerin skorlama kriterleri.	61
4.1. Formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli sonuçları.	63
4.2. 2. Üretim sonrası formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli sonuçları.	65
4.3. 3. Üretim sonrası formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli sonuçları.	65
4.4. Ortalama partikül büyüklüğü için katsayı tablosundaki temel etkileşimlerin katsayıları.	69
4.5. Formülasyondaki optimal lipid oranları ve bileşimin hedeflenen parametreleri karşılama derecesi.	74
4.6. Farklı akış hızı oranlarında üretilmiş F22 formülasyonunun ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları.	75
4.7. TGF-β3 LP formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları.	75
4.8. miR-132 LPX formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları.	76
4.9. Liyofilizasyondan sonra %3-25 (a/h) trehaloz veya süktroz içeren lipozom formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerleri.	82
4.10. Ultrasontrifüjleme sonrasında peletten elde edilen lipozomların ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerleri.	83
4.11. Kitosan-RF hidrojel dispersiyonlarının reolojik özellikleri.	95
4.12. Hidrojel İskelelerin pH değerleri.	104
4.13. Boş hidrojel ve lipozom/lipopleks yüklü hidrojel mekanik dayanım testi sonuçları.	110

1. GİRİŞ

Yanık yaralanmalarında mortalite oranı geçmiş yıllara kıyasla azalmış olmasına rağmen, yanık sonrası gelişen kutanöz skar oluşumu bireylerin yaşam kalitesini düşürmekte ve sosyal yaşama katılımını olumsuz etkilemektedir (1). Yara iyileşmesi, çok aşamalı ve dinamik bir süreçtir; bu sürecin farklı aşamaları arasındaki dengenin bozulması patolojik skar oluşumuna ya da kronik yara gelişimine yol açabilmektedir (2). Yanık yaralarında ise nekrotik doku yapısı, artmış kapiller geçirgenlik ve damar sızıntısı normal iyileşme sürecini belirgin biçimde geciktirmektedir (3).

Derin kutanöz yaralanmalarda artan dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β 1 aktivitesi ve buna bağlı düşük TGF- β 3/TGF- β 1 oranı, miyofibroblast aktivasyonu ve anormal hücre dışı matris (ECM) organizasyonu ile skar oluşumuna yol açmaktadır (4, 5). Ayrıca, başarısız yara iyileşmesi ile kronik inflamasyon arasındaki ilişki bilinmektedir; ayrıca bu durumda miR-132'nin inflamatuvar ve proliferatif fazlarda yüksek düzeyde eksprese edildiği bildirilmiştir (6, 7).

miRNA'ların negatif yüklü olmaları, ribonükleazlar (RNaz) tarafından hızlı yıkıma uğramaları ve dolaşımdaki kısa yarı ömürleri nedeniyle hedef dokuya ulaştırılabilmesi için uygun taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Viral olmayan taşıyıcı sistemler, düşük toksisite ve immünojenisite, yüksek hücre alım ve suda çözünürlük, endonükleazlara direnç gibi özellikleri nedeniyle viral vektörlere kıyasla avantajlıdır. Lipozomlar aracılığıyla taşınan miRNA'ların biyoyararlanımının ve stabilitesinin yüksek olduğu, düşük doz gerektirdiği ve moleküler etkinliğinin güçlü olduğu bildirilmiştir (8).

Dermal hedefleme amacıyla kullanılan lipozomların ECM, fibroblastlar, damarlar ve sinirlerin bulunduğu dermise ulaşabilmesi gerekmektedir (9). Bu çalışma kapsamında, katyonik lipid temelli sistemler kullanılmıştır. Katyonik lipozomlar ile nükleik asitlerin oluşturduğu kompleksler lipopleks olarak adlandırılmaktadır. Katyonik lipoplekslerde miRNA ile optimum transfeksiyon etkinliği elde etmek için partikül boyut aralığının 100-200 nm, zeta potansiyelinin + 40 mV'ye eşit veya daha

büyük olması gerektiği literatürde belirtilmiştir (9-12). Bu çalışma kapsamında katyonik lipid olarak DOTMA (N-[1-(2,3-dioleyloksi)propil]-N,N,N-trimetilamonyum klorür); nötral lipid olarak DOPC (1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfokolin) ve stabilite artırıcı lipid olarak kolesterol lipozom/lipopleks formülasyonlarında kullanılmıştır (13-23). Katyonik lipozom formülasyonlarının yüzey modifikasyonda ise DSPE-mPEG2000 kullanılmıştır (24, 25).

Lokal uygulamalar, hedef dokuya etkin madde taşınmasını artırarak terapötik etkinliği iyileştirmekte ve sistemik toksisite riskini azaltmaktadır. Bu amaçla hidrojel, yara ortamında lokal uygulama ve kontrollü salım için farmasötik sistemler olarak öne çıkmaktadır. Hidrojel bazlı formülasyonların yara eksüdasını absorbe ettiği, hücre infiltrasyonunu desteklediği ve re-epitelizasyonu artırdığı gösterilmiştir (26). Ayrıca kitosan bazlı hidrojellerin biyoyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri nedeniyle yara örtüsü formülasyonlarının tasarımında avantaj sağladığı bildirilmektedir (27-29).

Bu çalışma kapsamında, dual etki hedefiyle miR-132 ve TGF- β 3 yüklü katyonik lipozom/lipopleks içeren biyoyumlu kitosan bazlı hidrojel iskelelerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Hidrojellerin mekanik özelliklerinin sınırlı olabilmesi ve üretim sonrası boyut/şekil uyarlamasının güç olması ise önemli dezavantajlar arasında yer almaktadır. Bu sınırlılıkların aşılması amacıyla jelleşme öncesi 3 Boyutlu (3B) biyobaskı yaklaşımının kullanılması planlanmıştır (30, 31). Literatürde 3B biyobaskı teknolojisinin hidrojel üretiminde tekrarlanabilirlik, doğruluk ve biyomolekül enkapsülasyonu açısından üstünlük sağladığı bildirilmiş; kitosanın biyobaskı için uygun viskozite gösterebildiği ve baskı sonrası biyoyumluluğunu koruduğu rapor edilmiştir (32). Kitosan hidrojel ağ yapısının mekanik direncini ve taşıyıcı özelliklerini optimize etmek amacıyla, literatürdeki yaklaşımlar doğrultusunda riboflavin (RF) aracılı ultraviyole (UV) çapraz bağlama yöntemi tercih edilmiştir (33).

Büyüme faktörlerinin (ör. TGF- β 3) ve miRNA'ların (ör. miR-132) anjiyogenez ve doku rejenerasyonundaki kritik rollerine karşın, stabilitelerinin ve yara yerindeki biyoyararlanımlarının düşük olması nedeniyle klinik uygulamaları sınırlı kalmaktadır (34, 35). Tek başına lipozomlar hızlı ilaç salımı, düşük stabilite ve sınırlı retansiyon; tek başına hidrojel ise burst-effect ve ani salım özellikleri nedeniyle biyoaktif

ajanların yetersiz korunması gibi sorunlar gösterebilmektedir (36, 37). Lipozomların hidrojel içinde disperse edilmesi, ilaç salım kinetiklerini iyileştirerek uzatılmış ve kontrollü salım sağlanmaktadır (36, 37). Hidrojel matrisi, lipozomal yapıyı koruyarak burst-effect ve ani salınımı azaltırken; lipozomlar hidrojellerin mekanik ve reolojik özelliklerini güçlendirmekte ve şişme davranışını iyileştirmektedir (36). Bu nedenle çalışma kapsamında, 3B biyobaskı ile üretilen kitosan bazlı hidrojel iskelelerin, TGF- β 3 yüklü lipozomlar ve miR-132 yüklü lipoplekslerle birleştirilmesi ve yanık yara iyileşmesi açısından *in vivo* koşullarda etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Literatürde yanık yara iyileşmesinde TGF- β 3 ve miR-132'nin birlikte kullanıldığı bir yaklaşıma rastlanmamıştır. Yanık yaralarının kompleks patofizyolojisi göz önüne alındığında, inflamasyon, anjiyogenez ve fibrozis süreçlerini eş zamanlı hedefleyebilecek yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (1). Bu doğrultuda, miR-132'nin antiinflamatuvar ve pro-anjiyogenik etkileri ile TGF- β 3'ün antifibrotik özelliklerinin dual etkisiyle, yanık yaralarında daha hızlı yara kapanması ve skar oluşumunun azaltılması yönünde sinerjik bir etkinin elde edilebileceği öngörülmüştür. Bu çalışmanın amacı, miR-132 ve TGF- β 3 yüklü katyonik lipozom/lipopleks içeren, 3B baskı ile üretilen kitosan bazlı hidrojel iskelelerin geliştirilmesi ve formülasyonun yanık yara iyileşmesi açısından potansiyelinin inflamasyon, kolajen sentezi, ECM yeniden düzenlenmesi gibi fibrotik yanıtla ilişkili biyokimyasal süreçlerin modülasyonu üzerinden değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Yapısı

Deri toplam vücut ağırlığının yaklaşık %16'sını oluşturan en geniş organdır. Deri dış etkenlere karşı mekanik koruma için bariyer oluşturur (38, 39). Vücut sıcaklığını düzenleme ve su kaybını önleme fonksiyonlarıyla hemostazın sürdürülmesi için gereklidir (40). Bariyer fonksiyonunun hasarında vücut enfeksiyonlara karşı açık hale gelir (41). Memeli derisi epidermis ve dermis olmak üzere iki temel katmandan oluşur. Avasküler yapıdaki epidermis keratinize skuamöz epitel yapısıyla en dıştaki su geçirmez katmanı oluşturur (40). Epidermis yüzeyi kıl folikülleri, ter ve yağ bezi kanallarını içerir. Dermis ise yara iyileşmesinde önemli rol oynayan heterojen fibroblastlardan oluşur. Dermisteki kutanöz damar ağı üçüncü katman olan hipodermise uzanır (38). Hipodermis, yağ dokusu açısından zengin deri altı tabakasıdır (40).

2.1.1. Epidermis

Alt tabakadan en üst tabakaya doğru stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum ve stratum corneum olmak üzere 5 tabakadan oluşmaktadır (40, 41). Stratum basale bazal membran ile dermisten ayrılır. Hemidesmozomların bağlandığı bazal membran, dermo-epitelyal bağlantı oluşturur. Bu tabakada keratinosit üreten kök hücreler ve melanositler bulunmaktadır. Stratum spinosum komşu hücrelerle desmozomlarla bağlantı sağlayan sitoplazmik uzantıları bulunan hücreler içerir. Ek olarak bu tabakada dendritik hücreler bulunur (41).

Stratum basale'de üretilen keratinositler 3-6 haftaya kadar farklılaşarak korneositlere dönüşür ve stratum corneum tabakası oluşturulur. Keratinositler, hücre popülasyonunun yaklaşık %90'ını oluşturan epidermis tabakasında bulunan baskın epidermal hücrelerdir. Epidermal yara iyileşmesinde ve su taşınımında önemli rol oynarlar. Keratinositlerden çeşitli büyüme faktörleri kemokinler ve sitokinler salgılanmaktadır. Keratin dahil olmak üzere birçok protein keratinositlerde

sentezlemektedir. Stratum corneumda bulunan proteinler, hücre zarları ve kompleks lipidler dehidrasyona karşı bariyer görevi yapmaktadır (40, 41).

2.1.2. Dermis

Dermis, deri ağırlığının %90'ını oluşturur. Dermal tabakada yüksek oranda ECM, vasküler endotel hücreleri, fibroblastlar, Schwann hücreleri, mast hücreleri, ter bezleri, kan damarları, kıl folikülleri ve serbest ve kapsüllü sinir uçları bulunmaktadır (41). Dermis, papiler dermis ve retiküler dermis olmak üzere 2 katmandan oluşur. Papiler dermis yüzeysel tabaka olarak adlandırılır. Fibroblastlar ve kalın kolajen lifleri retiküler dermis tabakasında bulunur. Fibroblastlar derinin elastik yapısı ve mekanik dayanıklılığından sorumlu ana dermal hücre popülasyonudur. Glikozaminoglikanlar, kolajen ve elastinler fibroblastlardan salgılanır (40).

2.1.3. Hipodermis

Deri altı fasya olarak da adlandırılan hipodermis, dermisin altında bulunur (41). Hipodermis tabakası, gevşek bağ doku, yağ hücreleri, proteoglikan ve glikozaminoglikan absorblayıcı sıvı, kan damarları ve sinirlerden oluşur. Yağ depolama ve vücut sıcaklığının düzenlenmesi en önemli fonksiyonları arasında yer alır (40). Deri altı yağ dokusunda ise büyüme faktörleri salgılanmaktadır (39).

2.2. Yanık

Yanık yaralanmaları, derinin dış etkenlere bağlı olarak sıcaklık, kimyasal maddeler veya elektrik akımı gibi faktörlere maruz kalması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Yanıkların sınıflandırılmasında etkilenen vücut yüzey alanı, maruz kalınan sıcaklık derecesi ve maruziyet süresi gibi kriterler temel alınmaktadır (42, 43). Yanık yaralanmalarını takiben deri bütünlüğünün bozulması, derinin fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirememesine yol açarak dehidratasyon, enfeksiyonlar, metabolik bozukluklar ve hatta mortalite ile sonuçlanabilmektedir (42, 44).

Deri yüksek rejeneratif kapasiteye sahip olmakla birlikte, yanığın retiküler dermis tabakasına ulaşması durumunda iyileşme potansiyeli belirgin şekilde azalmaktadır. Yara iyileşmesi; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden düzenlenim olmak üzere dört fazdan oluşmaktadır. İnflamasyon fazında koagülasyon,

sitokin salımı ve kemotaksis gibi olaylar gerçekleşirken, proliferasyon fazı anjiyogenez ve fibroplazinin meydana geldiği yeniden yapılanma sürecini kapsamaktadır. ECM birikimi ise yeniden düzenlenim fazında gerçekleşmektedir. Bu son aşamada meydana gelen bozukluklar, hipertrofik skar oluşumuna yol açabilmektedir (44).

Yanık yaralarının iyileşmesi, fizyolojik ve psikolojik etkileri birlikte barındıran, akut ve uzun dönem sonuçlara sahip, karmaşık bir süreçtir. Yanık hastaları, multidisipliner yaklaşım gerektiren yoğun tıbbi bakıma ihtiyaç duymaktadır. Bunun yanı sıra, rehabilitasyon süreci yüksek maliyetli olup, akut hastaneye yatışı takiben uzun süreli bakım gereksinimi aylar veya yıllar boyunca devam edebilmektedir. Özellikle ileri dereceli yanık yaralanmalarında, hastaların özel yanık merkezlerinde yoğun bakım ve kapsamlı cerrahi müdahalelerle tedavi edilmesi gerekmektedir (44, 45).

2.2.1. Yanık Derecelendirilmesi ve Yanık Türleri

Yanık yaralanmaları; lezyonun derinliği, maruz kalınan sıcaklık düzeyi ve süresi, etiyolojik faktörler, etkilenen vücut yüzey alanı ile deri kalınlığı gibi çok sayıda parametreye bağlı olarak derecelendirilmektedir. Yanık yaralarının iyileşme süresi, hasarın derecesine paralel olarak farklılık göstermektedir (44). Yüzeysel (I. Derece) yanıklarda hasar epidermis ile sınırlı olup, bu tür lezyonlar genellikle skar oluşumu gözlenmeksizin 5–10 gün içerisinde iyileşmektedir. Yüzeysel kısmi kalınlıkta yanıklarda (IIA. Derece) ise hasar dermisin üst tabakalarını içermektedir. Bu yaralar çoğunlukla düşük skar riski ile 2–3 hafta içinde epitelizasyon göstermektedir (43, 46, 47). Derin kısmi kalınlıkta yanıklarda (IIB. Derece) retiküler dermis tabakası etkilenmektedir (43). Bu tip yanık yaralanmaları, hücre dışı matriks bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte uzamış inflamatuvar yanıtla karakterizedir. Bu süreçte proinflamatuvar sitokinler, proteolitik enzimler ve reaktif oksijen türlerinde (ROS) belirgin artış meydana gelmektedir (42, 44). Bu nedenle derin yanıkların yara iyileşme sürecinde hipertrofik skar oluşum riski yüksektir. Yüzeysel yanıklara göre daha uzun sürede iyileşme gözlenir. Tam kalınlıklı yanıklarda (III. Derece) ise epidermis ve dermisin tüm tabakalara ek olarak doku hasarı subkütan dokuya ilerleyebilmektedir. İyileşme süreci genellikle sekiz haftayı aşmaktadır (43, 46). Daha derin dokuları

etkileyen tam kalınlıkta bazı yanıklarda (IV. derece) kas ve kemik tutulumu görülür ve lokal nekroza yol açar (47).

2.2.2. Yanık Morfolojisi

Birinci derece yanıklar eritem ile karakterizedir ve deri yüzeyinde belirgin kızarıklık, ödem ve ağrı izlenir. Tip IIA dereceli yanıklarda ağrı belirgindir. Tip IIB’de deri kıl folikülleri ve ekzokrin bezleri içermemekle birlikte, deri yüzeyi kırmızı, nemli ve hassastır. Epidermal nekroza bağlı olarak epitelizasyon süreci bozulur ve kalıcı skar oluşumu görülebilir. Bazı olgularda cerrahi girişim ve deri greftlemesi gerekebilmektedir. Üçüncü derece yanıklarda deri kuru, sert bir yapı kazanır; lezyonlar kahverengi, bronz veya kırmızı tonlarda gözlemlenebilir. Sinir uçları hasarı nedeniyle ağrı hissi genellikle bulunmaz ve tedavide cerrahi müdahale ve deri transplantasyonu temel yaklaşımı oluşturur. Dördüncü derece yanıklar karma nitelik taşır ve ikinci ile üçüncü derece yanıkların klinik özelliklerini birlikte sergiler (47).

2.2.3. Yanık Patofizyolojisi

Yanık, deri tabakalarında lokal koagülatif nekroza neden olur. Kutanöz yanık yaralanmalarında deri 3 bölgeye ayrılır. Koagülasyon bölgesinde nekroz meydana gelir, geri dönüşsüz doku hasarıyla karakterizedir. Bu bölgeyi çevreleyen orta derecede hasar görmüş bölge staz bölgesinde doku perfüzyonu bozulmuştur. Staz bölgesi iyileşebilir veya nekroza gidebilir. En dışta yer alan hiperemik bölgede ise inflamatuvar yanıtın etkisiyle vazodilatasyon gözlenir (42).

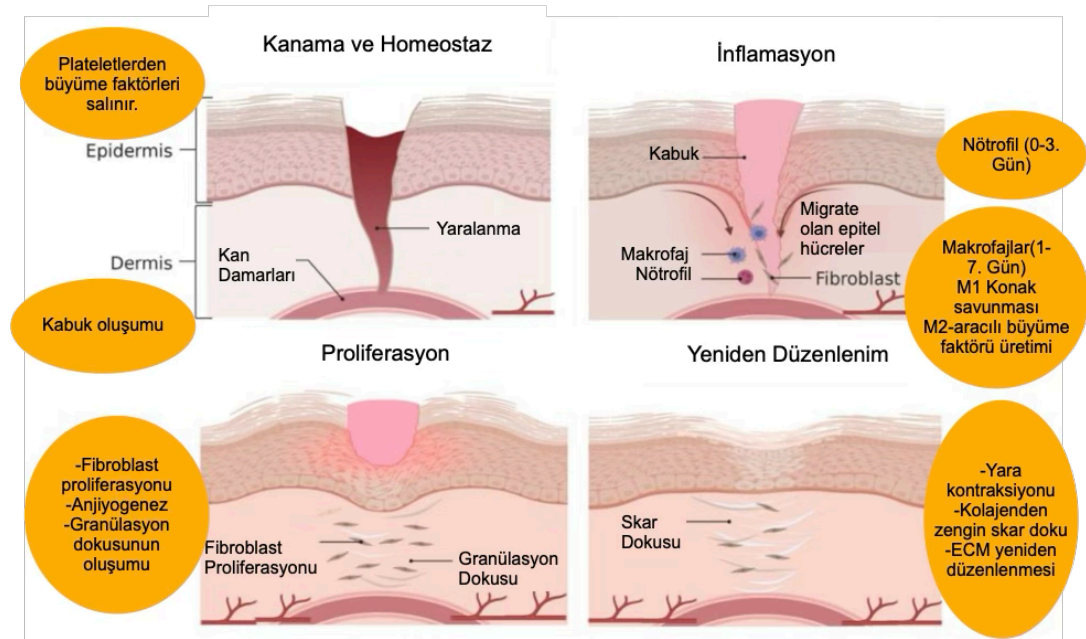
Toplam vücut yüzey alanının %30’undan fazlasını kapsayan yanıklar belirgin sistemik yanıtların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu düzeydeki yanıklar, ciddi sıvı kaybına bağlı hipovolemiye ek olarak inflamatuvar mediyatörlerin aşırı üretimi ve salınımına neden olur. Bu durum “yanık şoku” olarak tanımlanan özgün bir kardiyovasküler disfonksiyon tablosuna yol açmaktadır (42, 48). Yanık şoku; yanık alanı ve çevre dokularda yaygın ödem oluşumu, sistemik dolaşımın ve mikrosirkülasyonun bozulması ile seyreden kompleks patofizyolojik bir durumdur. Yanık yaralanmasına eşlik eden belirgin plazma ekstravazasyonu, intravasküler hacmin azalmasına, sistemik vasküler direncin artmasına ve periferik doku perfüzyonunun belirgin şekilde azalmasına yol açmaktadır. Pulmoner ve sistemik

vasküler dirençteki artışın devam etmesi ve miyokardiyal depresyonun gelişmesi, inflamatuvar yanıtın şiddetlenmesine ve çoklu organ yetmezliği tablosunun ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır (42).

2.3. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, farklı hücre tipleri ve biyokimyasal yolların koordinasyonu ile ilerleyen kompleks ve dinamik bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Yara iyileşmesinin temel basamakları Şekil 2.1’de gösterilmiştir (38, 40).

Hemostaz fazında, yaralanmayı takiben vasküler konstriksiyon ve pıhtı oluşumu ile temel hedef kanamanın durdurulmasıdır. Kan akışının yavaşlatılmasıyla mikroorganizmaların sistemik dolaşıma yayılımı sınırlandırılmaktadır. Aynı zamanda epitel ve endotel hücrelerinden salınan kemotaktik faktörler aracılığıyla inflamatuvar hücrelerin yara bölgesine göçü uyarılmakta ve inflamasyon fazı başlatılmaktadır (40).



Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin 4 fazı (40).

Yaralanmayı takiben ilk 24 saat içerisinde antimikrobiyal savunmanın sağlanması amacıyla nötrofiller yara bölgesine göç etmektedir. Bu süreçte kapiller permeabilitenin artması ve vazodilatasyonun gerçekleşmesi, bağışıklık hücrelerinin hasarlı dokuya geçişini kolaylaştırmaktadır. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin etkisiyle nötrofilleri takiben makrofajlar ve lenfositler de yara bölgesine infiltre olmaktadır.

İnflamasyon fazında temel olay fagositoz olup, hücrel kalıntıların ve patojenlerin uzaklaştırılmasıyla doku rejenerasyonu için uygun bir mikroçevre oluşturulmaktadır. Yaklaşık 1–4 gün süren bu fazın sonunda makrofajlar proinflamatuvar fenotipten antiinflamatuvar fenotipe geçiş yaparken, nötrofiller apoptoza uğramaktadır (40). İnflamasyon fazını proliferasyon fazı izlemektedir. Bu geçişte inflamatuvar hücrelerden salınan büyüme faktörleri fibroblastlar, keratinositler, endotelial hücreler ve kök hücrelerin proliferasyonunu ve aktivasyonunu uyarmaktadır. Fibroblastlar tarafından prokolajen, hiyalüronik asit, proteoglikanlar ve elastin sentezlenerek granülasyon dokusu oluşturulmaktadır. Aynı zamanda endotel hücrelerin proliferasyonu ve migrasyonu ile anjiyogenez gerçekleşmekte ve yeni damar oluşumu sağlanmaktadır. Yeniden epitelizasyon ise keratinositlerin proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşması ile gerçekleşmektedir. Bu faz boyunca ekstraselüler matriks (ECM) sentezi, anjiyogenez ve keratinizasyon süreçleri hücreler arası etkileşimlerle koordine edilmektedir. Proliferasyon fazını yeniden düzenlenme (remodeling) fazı takip etmektedir. Bu aşamada granülasyon dokusunda kolajen tip I sentezi artarken, fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşması sonucunda kolajen tip III kademeli olarak kolajen tip I ile yer değiştirmektedir. Ayrıca yara bölgesinde ter bezleri, yağ bezleri ve kıl folikülleri gibi deri eklerinin yeniden oluşumu gerçekleşerek doku bütünlüğünün yeniden sağlanmasına katkıda bulunmaktadır (38, 40).

Yaralar, iyileşme özelliklerine göre akut ve kronik olarak sınıflandırılmaktadır. Akut yaralarda, derinin rejeneratif kapasitesinin yüksek olması sayesinde iyileşme fazları tamamlanmakta ve genellikle skarsız iyileşme gözlenmektedir (39). Kronik yaralarda ise hipoksi ve değişmiş hücrel fenotipler nedeniyle yaranın farklı bölgelerinde farklı fazların eş zamanlı olarak bulunmasıyla iyileşme süreci düzensiz seyretmektedir (40). Fazlar arasındaki dengenin bozulması, herhangi bir fazın olması gerekenden uzun sürmesi patolojik skarlaşmaya, iyileşmeyen veya kronik yara oluşumuna neden olur (2). Dermal fibroblastlarda kolajen sentezi ve fibroziste önemli rolü olan TGF- β 1 gibi inflamatuvar sitokinler üretilir. Ek olarak yara bölgesindeki fibroblast farklılaşması sonucunda aşırı TGF- β 1 aktivitesi görülebilir. TGF- β 1 varlığında fibroblastlardan farklılaşan miyofibroblastlar, kolajen ve matriks proteinlerini paralel bir düzende salgılar ve anormal ECM organizasyonuna neden olarak skar doku oluşumuna yol açar (4, 5).

Kronik yaralarda inflamatuvar hücrelerden büyüme faktörlerinin aşırı salımı sonucunda kalıcı inflamasyon meydana gelir. Kalıcı inflamatuvar hücreler, özellikle nötrofiller ve makrofajlar, uzun dönemde yara iyileşmesi sürecini olumsuz yönde etkileyerek yara bölgesinde proinflamatuvar sitokinler, proteolitik enzimler ve ROS üretirler (6, 7). Ek olarak yara iyileşmesinin düzgün bir şekilde ilerlemesi ve hücreler ile çözünür faktörlerin yaralı dokuya ulaşması anjiyogeneze bağlıdır. Yanık dokunun nekrotik olması nedeniyle anjiyogenezi tetikleyen trombosit ve makrofajlar yanık dokuda işlev gösteremezler bu nedenle anjiyogenez fizyolojik boyutlarda gerçekleşemez. Yanık yaraları diğer yaralardan ayıran en önemli özellik kılcal geçirgenliğin artışı sonucu damar sızıntısı ve damar hasarı gözlenmesidir. Bu durum normal iyileşme sürecini geciktirir (3).

2.3.1. Yanık Tedavi Stratejileri

Yanık tedavisinde ilk aşamada soğuk uygulaması, sıvı resüsitasyonu, termoregülasyon desteği, debridman ve antimikrobiyal uygulamalar temel yaklaşımlar arasında yer almaktadır (34, 35). Yanık yaralanması sonrası gelişen sıvı kaybının yerine konulması, yanık şokunun azaltılması ve yanığın derinleşmesinin engellenmesi açısından sıvı resüsitasyonu kritik öneme sahiptir. Deri bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak termoregülasyon mekanizmalarının etkilenmesi, hastalarda hipotermi riskini artırmaktadır. Bu nedenle sıvı resüsitasyonu sırasında ısıtma sistemlerinin kullanılması, vücut ısının korunması açısından önem taşımaktadır (44).

Debridman uygulaması ile yara bölgesindeki nekrotik dokunun uzaklaştırılması, enfeksiyon riskini azaltarak yara iyileşme sürecini olumlu yönde etkilemektedir (34). Yanık bölgesinde erken dönemde, normal deri florasında bulunan stafilokoklar, streptokoklar ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* gibi patojenlerin kontaminasyona neden olduğu gösterilmiştir (44). Gelişen ciddi ve kalıcı enfeksiyonların epitel dokuya geri dönüşümsüz hasar vererek yara iyileşme sürecini uzattığı bilinmektedir (35). Bu nedenle yanık yara tedavisinde erken dönemde topikal veya sistemik antibiyotik uygulamaları önem taşımaktadır.

Antibiyotiklerin yanı sıra, geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteleri nedeniyle altın (Au), gümüş (Ag), çinko (Zn) ve bakır (Cu) gibi çeşitli metalik iyonlar da yanık tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında en sık tercih

edilen ajanlardan biri olan gümüş sülfadiazin, özellikle stafilokok ve streptokok türlerine karşı etkili bir antimikrobiyaldir (35). Ancak antibiyotiklerin topikal veya sistemik kullanımında düşük biyoyararlanım, toksisite ve antibiyotik direnci gibi önemli sınırlılıklar bulunmaktadır. Daha etkin antiinflamatuvar yanıt sağlanması ve inflamatuvar fazın kontrol altına alınması amacıyla, yanık yara yüzeyine büyüme faktörlerinin uygulanmasına yönelik çeşitli çalışmalar literatürde yer almaktadır (35, 49, 50).

Yara tedavisinde pansuman uygulamaları; epitel dokunun korunması, bakteriyel kontaminasyonun önlenmesi, ısı ile su kaybının azaltılması açısından gereklidir. Kullanılan pansuman materyallerinin biyouyumlu ve biyoparçalanabilir özellikte olması tercih edilmektedir (44). Bu amaçla organik veya inorganik polimerlerden üretilen film, hidrojel, hidrokolloid ve hidrofiber temelli çeşitli formülasyonlar yanık yara örtüsü olarak kullanılmaktadır (51). Ancak yanık derinliğinin toplam vücut yüzey alanının %30'unu aşması durumunda, yara örtüsü olarak donör bölgeden elde edilen otolog deri greftleri tercih edilmektedir (44). Özellikle üçüncü derece ve üzeri yanıklarda, yara kapanmasının sağlanmasında otogreftler ve deri ikameleri gibi konvansiyonel tedaviler uygulanmaktadır. Bununla birlikte, bu yaklaşımlar sınırlı donör alanı, yetersiz vaskülarizasyon, ek cerrahi travma, enfeksiyon riski, skar oluşumunun tamamen önlenememesi, uzun tedavi süresi ve yüksek maliyet gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir (34, 44).

Günümüzde yanık tedavisinde, doku rejenerasyonunu moleküler düzeyde indükleyen büyüme faktörleri, kök hücre tedavileri ve gen terapileri gibi yenilikçi yaklaşımlar ön plana çıkmıştır. Özellikle nanoterapötik yüklü yara pansumanları ve biyomateriyal temelli sistemler, cerrahi greft ihtiyacını azaltmakta veya cerrahi tedavilere destekleyici olarak kullanılabilir (34). Büyüme faktörleri, inflamatuvar fazın yanı sıra hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve doku rejenerasyonunu uyararak yara iyileşme sürecinde önemli roller üstlenmektedir. Keratinosit büyüme faktörü (KGF), TGF- β , epidermal büyüme faktörü (EGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) yanık yara tedavisinde potansiyel terapötik ajanlar arasında yer almaktadır. Ancak bu büyüme faktörlerinin fizyokimyasal özelliklerine bağlı stabilite ve biyoyararlanım sorunları, klinik

kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle söz konusu terapötiklerin ilaç taşıyıcı sistemlere enkapsüle edilerek uygulanması, etkinliklerinin seçici olarak artırılmasını sağlamaktadır (35).

Büyüme faktörleri arasında yer alan TGF- β ailesinin fibrozis ve skar oluşumunda düzenleyici rolü bulunmaktadır. Bu doğrultuda, TGF- β ailesinde yer alan TGF- β 3, pro-fibrotik yanıtı sınırlaması ve fizyolojik iyileşme sürecini desteklemesi nedeniyle, yanık tedavisinde öne çıkan moleküllerden biri olarak değerlendirilmektedir (4, 5, 52).

Bununla birlikte, yanık yara iyileşmesi çok katmanlı bir biyolojik süreç olarak tanımlanmakta olup, büyüme faktörlerinin etkilerinin yalnızca protein düzeyindeki sinyalle sınırlı olmadığı bildirilmektedir. Bu süreçte gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzeyde düzenlenmesinin, hücresel yanıtların düzenlenmesine katkı sağladığı belirtilmektedir. Bu düzenleyici mekanizmalar arasında mikroRNA'ların (miRNA/miR), yara iyileşmesinde görev alan çeşitli sinyal yolları ile ilişkili olduğu ve bu süreçlerde rol oynadığı gösterilmiştir (38, 53, 54).

2.3.2. TGF- β 'ların Yara İyileşmesindeki Rolü

TGF- β hücre içi iletişimi kontrol eden ve immünolojik reaksiyonlarda yönlendirici rol oynayan büyüme faktörleri grubundaki pluripotent sitokin ailesidir. TGF- β süper ailesi, geniş bir polipeptit grubudur. TGF- β ailesi ve kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), büyüme ve farklılaşma faktörleri (GDF'ler), aktivinler (ACT'ler), inhibinler (INH'ler) ve glial kaynaklı nörotrofik faktörler (GDNF'ler) gibi polipeptitler bu ailede bulunmaktadır (55).

TGF- β ailesi, TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 olmak üzere üç izoformdan oluşmaktadır. En sık bulunan izoform TGF- β 1 bir disülfid bağıyla birbirine bağlı homodimer yapıda 25 kDa moleküler ağırlığında kompleks bir polipeptittir. Her polipeptit zinciri 112 aminoasit kalıntısından oluşmaktadır (55). TGF- β tükürük bezleri, kaslar, böbrekler, karaciğer kalp gibi dokularda yaygın olarak üretilmektedir. Trombositlerin en çok TGF- β salgılayan hücre grubu olduğu bilinmektedir.

Biyosentezinde post-translasyonel modifikasyonlarla latent kompleks olan salgılayıcı formuna dönüşmektedir. Öncü polipeptit olarak sentezlenen TGF- β

monomerleri endoplazmik retikulumda dimer oluşturur. Dimerler golgiye geçer ve küçük latent kompleksler oluşturur (56). Hücre dışı matriksteki latent komplekslerden aktif TGF- β salımı, plazmin, matriks metalloproteinaz (MMP) 2 (Jelatinaz A), MMP 9 (Jelatinaz B), BMP-1 ve diğerleri gibi proteazlar, trombospondin-1, asidik veya bazik koşullarda, ROS ve integrinler gibi faktörlerle gerçekleşebilir. Bu faktörlere TGF- β aktivatörleri denir (55, 57).

Homodimerlerin biyolojik etkileri benzer sinyal yolları ile aktive olur. ECM'den salındıktan sonra TGF- β ligandı, transmembran ikiye adet tip I (TGF β -R1) ve tip II (TGF β -R2) alt birimden oluşan heterotetramerik reseptör kompleksi ile etkileşerek fosforile olur (55, 57).

TGF- β sinyal yolları kanonik (SMAD ailesi transkripsiyon faktörleri (SMAD)-bağımlı) ve non-kanonik olmak üzere ikiye ayrılabilir. Kanonik yolda TGF β -R1 aktivasyonu ile SMAD proteinleri SMAD2 ve SMAD3 fosforile edilir. SMAD2/3 aktivin reseptörü benzeri kinaz 5 (ALK5) ile fosforile olduktan sonra SMAD4 ile kompleks oluşturarak çekirdeğe taşınır. Kompleksin SMAD bağlama elementine bağlanmasıyla hücre proliferasyonu, farklılaşması, ECM sentezi, apoptoz ve inflamasyon ile ilişkili genlerin transkripsiyonu düzenlenir (58). Bu kompleksin defosforilasyonu sonrası SMAD4 sitoplazmaya geri döner. TGF- β 1 negatif geri bildirimiyle SMAD7 TGF β -R'ye bağlanarak SMAD2 ve SMAD3 defosforilasyonu ile yolağı baskılar. Ek olarak reseptörün ubiquitinizasyonuna yol açar (59).

Non kanonik yolda farklı sinyal yolları aktive olmaktadır. Mitogenle aktive olan protein kinaz (MAPK), Ras homolog (Rho) GTPaz/Rho ile ilişkili protein kinaz (ROCK) sinyal yolağı (Rho GTPaz/ROCK), Fosfoinozid 3-kinaz / Protein kinaz B (PI3K/AKT), Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve Janus kinaz / Transkripsiyon sinyal iletili ve aktivatör (JAK/STAT) yolları TGF- β ailesinin non-kanonik sinyal yollarıdır. TGF- β ailesi, hücre göçü, hücre iskeleti yeniden düzenlenmesi, inflamatuvar yanıt, hücre hayatta kalımı ve fibrotik yanıt oluşumu süreçlerinde yer alarak bu yolların düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Yolların çapraz etkileşimleri sonucu hücre tipleri ve çevreye bağımlı olarak TGF- β sinyalizasyonu farklı biyolojik etkilere neden olmaktadır (55, 57). Düzensiz TGF- β sinyalizasyonunun birçok hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir (55).

Yanık İyileşmesinde TGF- β 1 ve TGF- β 3 Roller

İzoformlar doku ve zamansal olarak farklı koşullarda eksprese olmaktadır. TGF- β 1 yara iyileşmesinde baskın rol oynar. Epidermiste stratum granulosum ve stratum corneum'da TGF- β 1, stratum basale'de daha düşük düzeyde diğer izoformlar bulunmaktadır (60). TGF- β izoformları epitel hücrelerin yanı sıra keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreler, monositler ve diğer hücre tiplerinin fonksiyonlarını düzenleyerek yara iyileşmesinin tüm fazlarında önemli bir rol oynarlar (60).

Akut dönemde trombositlerde depolanan TGF- β izoformları yara bölgesine salınmaktadır. TGF- β kemotaktik aktivitesiyle yara bölgesine epitel hücreler, endotel hücreler, fibroblastlar, nötrofiller, makrofajlar ve lenfositlerin göçünü başlatmaktadır. Ek olarak interlökin (IL)-1 α / β , IL-6 ve tümör nekroz faktörü (TNF)- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salımını tetiklemektedir (59, 60). Geç dönemde ise inflamasyonu durdurmaktadır. TGF- β ECM üretimi, kolajen sentezi ve MMP dengesinden sorumludur. VEGF salımını artırarak anjiyogenezi uyarmaktadır (55, 59, 60). Fibroblast hücrelerinde miyofibroblastlara farklılaşmayı tetiklemekte ve Rho aktivasyonunu indükleyerek yara kontraksiyonunu artırmaktadır. Yara kapanmasında keratinosit diferansiyasyonunu, migrasyonunu ve integrin ekspresyonunu uyarak re-epitelizasyonu kolaylaştırır (55, 59-61).

TGF- β izoform dengesine, maruziyet süresi ve konsantrasyonuna bağlı olarak yara iyileşmesi farklı şekillerde düzenlenmektedir (59). Erken dönemde TGF- β 3 izoformu daha baskınken, epitelizasyon sürecinde TGF- β 1 artmaktadır. Yara iyileşmesinde uzamış ve aşırı TGF- β 1 sinyalizasyonu fibrozis ve skar oluşumu ile ilişkilendirilmektedir. TGF- β 2, TGF- β 1'e benzer etkiler göstermektedir (59). TGF- β 3 ise sekans homolojisine rağmen ECM yeniden düzenlenimini iyileştirerek, inflamatuvar yanıtı ve hücre migrasyonunu düzenleyerek antifibrotik etkisiyle skarsız iyileşmeyi sağlamaktadır (59-61).

TGF- β 3 Potansiyel Terapötik Etkileri

TGF- β sinyal yollarının hedeflenmesine yönelik olarak küçük molekül inhibitörleri, monoklonal antikolar, ligand tuzakları ve antisens oligonükleotidler gibi farklı mekanizmalarla TGF- β sinyalizasyonunu modüle eden terapötik ajanlar

geliştirilmiştir. Küçük molekül inhibitörleri genellikle TGF- β reseptörlerini inhibe ederken, monoklonal antikorlar ligand düzeyinde izoform spesifik inhibisyon sağlayabilmektedir. Ligand tuzakları TGF- β 1'in reseptöre bağlanmasını engelleyerek sinyal iletimini baskılamaktadır. Antisens oligonükleotid yaklaşımları, TGF- β ve/veya SMAD gen ekspresyonunun baskılanmasına dayanmaktadır. Ek olarak, doğal ve sentetik bazı bileşiklerin TGF- β sinyalini baskıladığı bildirilmiştir (62).

TGF- β ile ilişkili patolojilerde tedavi yanıtı hücre tipine, TGF- β izoform dengesine, patoloji ile ilişkili diğer bozulmuş biyolojik süreçlere bağlı olarak değişkenlik gösterdiği için doğrudan TGF- β sinyalinin inhibisyonunun uygun bir yaklaşım olmadığı düşünülmektedir (62). Fibrozis ile ilişkili hastalıklarda TGF- β sinyal yolağını hedefleyen çalışmalarda, fibrotik yanıtın TGF- β 1 artışının yanında TGF- β izoformları ve sinyal yollarının dengesinin bozulması sonucunda ortaya çıktığı gösterilmiştir (63).

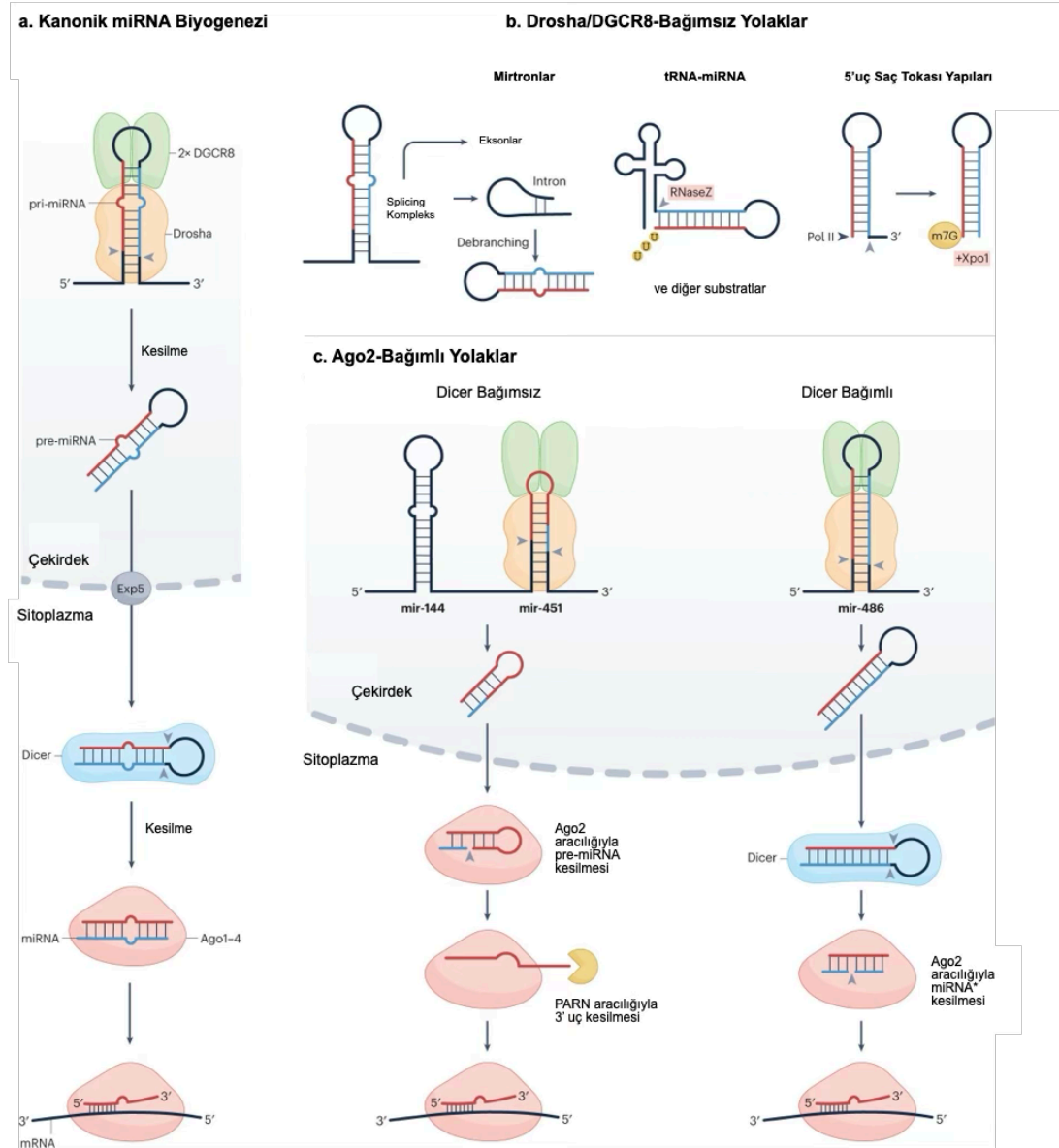
Bu nedenle TGF- β nötralizasyonunun veya sinyalinin inhibisyonu yerine TGF- β 1/TGF- β 3 dengesinin yeniden düzenlenmesi için yara iyileşmesinde TGF- β 1'in izoformu olan rekombinant TGF- β 3'ün antifibrotik etki potansiyeli değerlendirilmiştir. TGF- β 3/TGF- β 1 oranının yüksek olduğu fetal doku ve oral mukoza gibi dokularda skarsız ve hızlı iyileşme gözlenmiştir (4, 5, 59). Rekombinant TGF- β 3 (Avotermin) kontrollü faz 2 çalışmalarında güvenli bulunmuş ve tedavi sonucunda skarsız iyileşmeyi desteklediği gösterilmiştir. Ancak, intravenöz yoldan uygulanan Avotermin faz 3 çalışmalarında başarısız olmuştur (1, 4, 5, 62).

Vücutta hızla metabolize olması nedeniyle rekombinant TGF- β 3'ün biyolojik yarı ömrü kısa ve stabilitesi düşüktür. Bu nedenle özellikle intravenöz uygulama gibi parenteral uygulamalarda tedavi etkinliği sınırlıdır. Biyoyararlanımının ve stabilitesinin artırılması için TGF- β 3'ün aktif ve pasif olarak dokuya hedeflendirilmiş nanoterapötiklere ve lokal uygulamaya olanak sağlayan çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenerek etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalar da literatürde yer almaktadır (64-66). İlaç taşıyıcı sistemlere enkapsüle edilmiş TGF- β 3'ün serbest forma göre terapötik etkinliğinin artırıldığı gösterilmiştir (66-69).

2.3.3. Yara İyileşmesinde miRNA'ların Rolü

miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, bir veya daha fazla saç tokası yapısı içeren, birincil miRNA (pri-miRNA) transkriptlerinden köken alan RNA'lardır. Çoğu miRNA kodlanmayan transkript veya intronlardan türetilir. Geri kalan miRNA'lar protein kodlayan genlerin ekzonlarından işlenmektedir (70, 71). miRNA biyogenezi kanonik ve non-kanonik yollar ile gerçekleştirilmektedir (70) (Şekil 2.2.).

miRNA'ların büyük çoğunluğu 2 farklı RNaz III enziminin görev aldığı kanonik yolak üzerinden üretilmektedir (Şekil 2.2.A). RNA polimeraz II ile transkripte edilen pri-miRNA'nın saç tokası bölgesi, çekirdekte RNaz III enzimi Drosha ve DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8 (DGCR8) proteinlerinden oluşan mikroişlemci (microprocessor) kompleksi tarafından kesilerek, yaklaşık 55-70 nükleotid uzunluğunda bir öncül miRNA (pre-miRNA) oluşturur. Pre-miRNA nükleer taşıyıcı reseptör ailesinin bir üyesi Exportin 5 (Exp5) ile sitoplazmaya taşındıktan sonra RNaz III enzimi Dicer tarafından terminal halkasından kesilir ve bir miRNA duplesi meydana gelir (71). Oluşan miRNA duplesinin 5'uç tarafındaki (5p) veya 3'uç tarafındaki (3p) zincirlerinden biri, Argonaute (Ago) protein ailesinin bir üyesine yüklenerek miRNA-induced silencing complex (miRISC) oluşturur (70, 71).



Şekil 2.2. miRNA biyogenezi (71). **A)** Kanonik miRNA biyogenezi. Çekirdekte Drosha–DGCR8 tarafından pri-miRNA kesilir. pre-miRNA Exp5 ile sitoplazmaya taşındıktan sonra Dicer terminal halkayı keser ve Ago proteinine yüklenen miRNA dupleksleri oluşur. Yolcu zincirin (mavi) uzaklaştırılmasının ardından olgun miRNA (kırmızı) Ago efektör kompleksi ile miRISC oluşturur. Kesilme bölgeleri gri ok ile gösterilmiştir. **B)** Drosha/DGCR8-bağımsız yollar. Mirtronlar pre-miRNA benzeri yapılardır. Kırpılma (splicing) kompleks ve intronları ayıran enzimler tarafından oluşturulur. Mürin Hepatit Virüsü tRNA biyogenezinde RNase Z ile pre-miRNA'lar serbestleştirilir. 5'm7g taşıyan pre-miRNA'lar Exportin-1 (XPO1) ile sitoplazmaya taşınır. **C)** Ago2 bağımlı yollar. pri-miR-451 kesildikten sonra splicing doğrudan Ago2 ile gerçekleşir. Bunu takiben poly(A)-spesifik ribonükleaz (PARN) ile 3' uçtan kesilerek olgun miRNA oluşturulur. miR-486, pre-miRNA gövdesinde tam baz eşleşmesi içerdiğinden, miRNA dupleksinin oluşumu için mikroişlemci kompleksi

tarafından kesildikten sonra, yolcu zincirin (miRNA*) uzaklaştırılması Ago2 tarafından gerçekleştirilir.

Komplekse katılmayan kısım yolcu zincir (passenger strand) olarak adlandırılır ve tamamlayıcılık derecesine bağlı mekanizmalarla ayrıştırılarak yıkıma uğrar. Yolcu zincirler kesilerek yıkılır (70). Yolcu zincirin uzaklaştırılmasının ardından olgun tek zincirli kılavuz zincir (guide strand) miRNA, Ago efektör kompleksini (RNA kaynaklı susturma kompleksi, RISC) komplementer RNA hedeflerini baskılamaya yönlendirir (71) (Şekil 2.2.A).

Non-kanonik yollar ise Drosha/DGCR8-bağımsız ve Dicer-bağımsız yollar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.2.B) (71). Drosha/DGCR8-bağımsız yolda oluşan bazı pre-miRNA'lar Drosha kesimine ihtiyaç duymaksızın doğrudan sitoplazmaya taşınır. Ancak 5' uçta 7-metilguanozin (m7G) kapağı taşıyan pre-miRNA'lar XPO1 aracılığıyla sitoplazmaya taşınır. Pre-miRNA'nın 5' ucunda bulunan m7G kapağı, Ago proteinine yüklenmeyi engellediği için bu yapıdaki pre-miRNA'lardan yalnızca 3p zincirinden olgun miRNA oluşmaktadır (Şekil 2.2.B). Literatürde tanımlanmış farklı non-kanonik yollar bulunmaktadır (70, 71).

Dicer-bağımsız (Ago2 bağımlı) yolda ise kısa saç tokası RNA (shRNA) transkriptlerinden türetilen pre-miRNA'lar sitoplazmada Ago2'ye bağımlı olarak kesilir. Ardından 5p zinciri 3'-5' yönünde kısaltılarak olgun miRNA oluşur (Şekil 2.2.C). Tüm yolların sonucunda hedef mRNA'ları düzenleyen fonksiyonel miRISC kompleksi oluşmaktadır (70, 71).

miRNA-mRNA etkileşiminin etkinliği tohum (seed) bölgesindeki (2-8. Nükleotid) tamamlayıcılığa bağlıdır. Tam tamamlayıcılık durumunda Ago2'ye yüklenen tek zincir, Ago2'nin endonükleaz katalitik aktivitesiyle kesilir. Ancak memeli hücrelerinde kısmi tamamlayıcılık bulunduğundan, baskılama çoğunlukla translasyon inhibisyonu ve mRNA destabilizasyonu yoluyla olur (70, 72).

miRNA'lar gen ekspresyonunu çoğunlukla post-transkripsiyonel düzeyde düzenlemektedir (70). miRISC hedef mRNA'nın 3' çevrilmeyen bölge (UTR) bölgesindeki tamamlayıcı dizilere bağlanması sonucunda translasyon baskılanması, mRNA'da poli(A) kuyruğunun kısaltılması (deadenilasyon) ve mRNA kapağının uzaklaştırılması (decapping) gerçekleştirilir (72). Translasyon baskılanmasında

ribozomal alt biriminin mRNA'ya bağlanması engellenir. Bu aşamaların sonunda Ekzoribonükleaz 1 (XRN1) aracılığıyla mRNA degradasyonu gerçekleşir (70, 72).

miRNA'ların 3'UTR bölgeye bağlanmasının yanında, 5' UTR bölgesine bağlanarak translasyonu baskıladığı ve promotör bölgelere bağlanarak transkripsiyonu artırabildiği rapor edilmiştir (70). Ayrıca miRNA'ların yalnızca sitoplazmada değil, çekirdekte de transkripsiyonel regülasyon, alternatif kesim (splicing) ve kromatin yapı düzenlenmesine katkı sağladığı bilinmektedir (70).

miRNA'ların fonksiyonu, hücresel lokalizasyon, hedef mRNA bolluğu, bağlanma afinitesi ve hücre tipi gibi faktörlere bağlı dinamik özellik göstermektedir (70). miRNA ekspresyonlarındaki bozukluklar birçok patolojik durum ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca miRNA'ların hücre dışı sıvılara salgılandığı da bilinmektedir (70). miRNA'lar hücre dışına hücre hasarı sonucunda pasif sızıntıyla veya mikroveziküller ve taşıyıcı proteinler aracılığıyla aktif sekresyon ile salınmaktadır (73). Hücre dışı miRNA'ların birçok hastalık için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanımları değerlendirilerek rapor edilmiştir. Aktif salgılanan miRNA'ların ise hücreler arası iletişimde sinyal molekülü olarak rol oynadığı bilinmektedir (70, 73). miRNA ekspresyonundaki bozuklukların terapötik olarak düzeltilmesi amacıyla antisens teknolojiler kullanılarak miRNA hedeflemeye yönelik sentetik miRNA'lar (miR-mimiği ve antagomiR) geliştirilmiştir (54).

miR-mimikleri ile hedef miRNA düzeylerinin artırılması veya antagomirler (anti-miR) ile hedef miRNA'nın baskılanması yoluyla miRNA aktivitesi düzenlenmektedir. miR-mimikleri çift zincirli RNA molekülleridir. Hücre içinde hedef miRNA düzeyini artırarak hedef genlerin baskılanmasını desteklemektedir. Anti-miR'ler kimyasal olarak modifiye tek zincirli oligonükleotid yapılı moleküllerdir. miRNA fonksiyonunu hedef mRNA'ya bağlanarak miRNA'nın bağlanmasını engeller. Bu şekilde miRNA aracılı gen baskılanmasını engellemektedir (54).

anti-miR veya miR mimiği uygulamalarıyla aynı anda bir yolaktaki birden fazla gen ekspresyonunun eş zamanlı düzenlenebileceği bilinmektedir. Bununla birlikte genomda benzer dizilere sahip miRNA kümelerinin de hedeflenmesi nedeniyle terapötik etkinin güçlenebileceği gösterilmiştir (54, 74).

miR-mimiği ve anti-miR'lerin modifiye oligonükleotid yapıda olmaları nedeniyle hücre içine girdikten sonra metabolik açıdan oldukça stabil ve eliminasyonları haftalar sürmektedir. Buna karşın miRNA'ların polar yapısı ve negatif yüzey yükleri hücre membranının geçişini sınırlandırarak hücre alım verimini azaltmaktadır. Endozomal yıkım, immünojenisite, dolaşımda degradasyon ve hızlı klirens gibi faktörler nedeniyle miRNA'ların biyoyararlanımı düşüktür. miRNA'ların hedef organda hücre içine aktif formda ulaşması için uygun ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (54, 74).

Yanık İyileşmesinde Önemli miRNA'lar

miRNA'ların yanık sonrası hücresel apoptoz, proliferasyon, migrasyon ve fibroproliferatif yanıtı mRNA üzerindeki düzenleyici etkileriyle modüle ettiği bilinmektedir (75). miRNA'lar, yanık iyileşme sürecinin bütün fazlarında, özgün ekspresyon paterni ve fonksiyon sergileyerek gen ekspresyonlarını koordine etmektedir (76). Yara iyileşmesinin her fazında öne çıkan miRNA'lar, hedefleri ve etkileri Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Yara iyileşmesinde önemli miRNA'lar, hedefleri ve etkileri (76).

Faz	miRNA	Hedef/ mekanizma	Yara iyileşmesindeki etkisi
Hemostaz	miR-143/ miR-145	Vasküler tonus	Vazodilatasyonu ve vasküler dinamiklerin düzenlenmesini destekler.
	miR-409-3p, miR-29 ailesi	Fibrinojen sentezi	Aşırı tromboz oluşumunu sınırlar.
	miR-223 (↓ ekspresyon)	Trombosit reaktivitesi	Pıhtı oluşumunu destekler.
	miR-126 (↑ ekspresyon)	Endotel bütünlüğü	Damar onarımı ve trombüs oluşumunu destekler.

İnflamasyon	miR-142-3p	GTPaz translasyonu	Nötrofil kemotaksisi ve polarizasyonunu artırır; fagositoz kapasitesi ve ROS üretimini düzenler.
	miR-142-3p, miR-451	Endotelyal bütünlük	Bütünlüğü bozar, apoptozu artırır, anjiyogenezi baskılar; IL-6, IL-8, CXCL10, CXCL11 ekspresyonunu artırır.
	miR-223	MEF2C; TRAF6	Nötrofil diferansiyasyonu ve aktivitesini düzenler; TRAF6 yoluyla NF-κB'yi baskılar.
	miR-124a	ICAM-1, CCL2	Monosit migrasyonunu düzenler.
	miR-424	NFI-A	M-CSFR aktivasyonunu destekler.
	miR-21	NF-κB	NF-κB aktivitesini baskılar, IL-10 üretimini artırır.
	miR-146a	IRAK1/2, TRAF6	İnflamasyonu baskılar, VEGF-A üretimini artırır.
	miR-218-5p	SFRP2	Apoptozu artırır.
Proliferasyon	miR-99 ailesi (miR-99a/b/100)	IGF1R, AKT (PI3K/AKT)	Hücre proliferasyonunu destekler.

	miR-203	RAN, RAPH1	Proliferatif ve migratuvar hücre davranışı arasında denge sağlar
Anjiyogenez (pro-anjiyojenik)	miR-126, miR-130a, miR-210, miR-23, miR-27, miR-24	SPRED1, PIK3R2	VEGF/ANGPT-1 sinyalini güçlendirir
Anjiyogenez (anti-anjiyojenik)	miR-92a, miR-217, miR-221/222, miR-199a-5p, miR-200b	VEGFR2, ETS1	Damar oluşumunu sınırlar
	miR-223-3p (↑, yanık hastalarında)	FOXO1	HUVEC proliferasyonunu azaltır
Yeniden düzenlenim/fibrozis	miR-29a	TGF- β /SMAD3	Antifibrotik etki; MMP1 üretimini artırır, kolajen birikimini sınırlar
	miR-145	KLF4	Miyofibroblast diferansiyasyonu ve α -SMA artışını destekler; hipertrofik skarda yüksek eksprese olur

Yara iyileşmesinin inflamatuvar fazında salgılan sitokinler, büyüme faktörleri ve proinflamatuvar mediyatörler miRNA'lar tarafından düzenlenmektedir. miRNA'ların düzenleyici etkisi özellikle TGF- β sinyal yolağı üzerinden gerçekleşmektedir. Yanık sonrası yanık ile ilişkisi olan miRNA'ların çoğu TGF- β sinyal yolağı ile ilişkilidir (75). TGF- β ile indüklenen miR-132 ve miR-31, insan

derisinde inflamatuvar fazdan proliferatif faza geçiş sırasında ekspresyonu artan miRNA'lar olarak tanımlanmaktadır (77). miR-132, çalışmanın hedef moleküllerinden biri olması nedeniyle Bölüm 2.3.3.2'de ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

miR-132'nin Yanık İyileşmesinde Rolü

miR-132'nin insan deri yara iyileşmesi sırasında ekspresyonu en fazla artış gösteren miRNA'lardan biri olduğu bildirilmiştir. miR-132'nin inhibisyonunun hem fare *in vivo* modellerinde hem de insan *ex vivo* yara modellerinde yara kapanmasını geciktirdiği gösterilmiştir (78). Ayrıca yanık hasarında miR-132'nin inflamatuvar yanıtın ve anjiyogenezin düzenlenmesinde rol oynadığı, inflamatuvar ve proliferatif fazlarda yüksek düzeyde eksprese edildiği rapor edilmiştir (6, 7).

miR-132'nin etki mekanizmasının pleiotropik olduğu ve yara onarımında görev alan birden fazla hücre tipini eş zamanlı olarak düzenlediği bildirilmektedir (76). Ayrıca cilt yaralarına lokal olarak uygulanan miR-132 mimiklerinin yara kapanmasını hızlandırdığı, vaskülarizasyonu ve doku yeniden düzenlenimini iyileştirdiği rapor edilmiştir (78, 79).

İnflamasyon fazında miR-132'nin proinflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonunun baskılandığı ve makrofajların pro-reparatif M2 fenotipine polarizasyonunun güçlü biçimde uyarıldığı gösterilmiştir (76). Bununla birlikte keratinositlerde miR-132'nin NF-κB yolunu baskılayarak IL-1β, TNF-α ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin yanı sıra C-X-C motif kemokin ligandı (CXCL) 5, CXCL1 ve CCL20 gibi kemokinlerin sentezini azalttığı gösterilmiştir. NF-κB yolunun inflamasyon ve bağışıklık yanıtının temel düzenleyicilerinden biri olduğu; erken inflamatuvar fazda IL-1β, IL-6 ve TNF-α gibi sitokinlerin ekspresyonunu artırırken, geç fazda IL-10 ve TGF-β gibi antiinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonuna katkı sağladığı bildirilmektedir (80). Ayrıca miR-132'nin keratinositlerde hedefi olan heparin bağlayıcı EGF-benzeri büyüme faktörü (HB-EGF) ile etkileşerek inflamasyonu azalttığı da rapor edilmiştir (81). miR-132 düzeyi artmış keratinositlerden elde edilen süpernatantların endotelial hücrelerde vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM1) ve E-selektin (SELE) ekspresyonunu azalttığı, böylece endotelial aktivasyonu ve lökosit adezyonunu zayıflattığı saptanmıştır (81).

Kemotaksi deneylerinde ise miR-132 düzeyi yüksek keratinosit süpernatantlarının nötrofil ve mononükleer hücre göçünü azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular, miR-132'nin lökosit infiltrasyonunu sınırladığını ortaya koymaktadır (81).

Proliferatif fazda ise miR-132'nin keratinosit büyümesini ve anjiyogenezi uyardığı; dermal fibroblastların göçünü ve proliferasyonunu teşvik ederek yara iyileşmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (78, 81-84). Keratinositlerde miR-132 aşırı ekspresyonunun EGF reseptörü (EGFR), transkripsiyon sinyal iletili ve aktivatörü 3 (STAT3) ve ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) fosforilasyonunu artırdığı ve bunun hücre proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir. miR-132'nin TGF- β 1 tarafından hem epidermal keratinositlerde hem de dermal fibroblastlarda indüklendiği gösterilmiştir (85). Yara bölgesinde artan TGF- β 1 üretiminin miR-132 ekspresyonundaki yükselişten sorumlu olabileceği düşünülmektedir (81). Bununla birlikte miR-132'nin TGF- β /SMAD sinyal yolağını modüle ettiği ve TGF- β 1 3'UTR bölgelerine bağlanarak TGF- β 1 ekspresyonunu düzenlediği çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (16, 81, 86).

Ayrıca artmış miR-132 ekspresyonunun endotelial hücre proliferasyonunu doğrudan artırdığı ve güçlü anjiyogenezi destekleyerek iyileşen dokuda oksijen ve besin desteğinin yeniden sağlanmasına katkı sunduğu bildirilmiştir (76). Literatürde miR-132'nin RAS p21 protein aktivatörü 1 (RASA1)'i hedefleyerek endotelial hücrelerde proliferasyon ve tüp oluşumunu artırdığı bildirilmektedir (87).

RAS proteinlerinin küçük GTPazlar olduğu ve hücre migrasyonu, proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. RAS yoluyla ilişkili genler arasında özellikle miR-132'nin doğrudan hedefi olan RASA1 üzerine odaklanılmış ve bu genin dermal fibroblastlarda miR-132 tarafından anlamlı biçimde baskılandığı gösterilmiştir. RASA1'in RasGAP olarak RAS aktivitesini negatif yönde düzenlediği; ayrıca p190 RhoGAP ile etkileşim yoluyla fibroblast hareketini düzenlediği ve Rab21 ile integrinlere bağlanma konusunda rekabet ederek hücre migrasyonunu baskıladığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada RASA1 ekspresyonunun baskılanmasının fibroblast göçünü artırdığı ve bu etkinin miR-132 aşırı ekspresyonu ile gözlenen pro-migratuvar fenotipi taklit ettiği gösterilmiştir. Bu

bulgular, RASA1–RAS sinyal ekseninin miR-132'nin fibroblastlardaki biyolojik etkilerinin temel mekanizmalarından biri olduğunu düşündürmektedir (78).

İnflamatuvar fazı baskılaması ve hücre proliferasyonu ile migrasyonunu desteklemesi nedeniyle miR-132, yanık iyileşmesinde potansiyel bir terapötik hedef olarak değerlendirilmektedir (78).

2.4. TGF- β 3 veya miRNA Yüklü İlaç Taşıyıcı Sistemler

TGF- β 3'ün dışarıdan uygulanmasıyla yara iyileşmesinde güçlü bir terapötik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte TGF- β 3; proteolitik inaktivasyon, hızlı metabolizma ve buna bağlı kısa yarı ömür gibi kısıtlılıklar nedeniyle düşük biyoyararlanıma sahiptir. Bu nedenle, TGF- β 3'ün terapötik etkisini artırmak amacıyla proteinin stabilitesini sağlayan, lokal uygulamaya olanak sağlayan ve kontrollü salım sunan taşıyıcı sistemlerin kullanımı hedeflenmektedir. Bu bağlamda TGF- β 3'ün, yeni, toksik olmayan ve etkili bir tedavi yaklaşımı geliştirmek üzere uygun ilaç taşıyıcı sistemlere enkapsüle edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (66, 68).

TGF- β 3'ün polimerik nanopartiküllere enkapsüle edilerek tendon iyileşmesi, yara iyileşmesi ve kapsül kontraktüründeki etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda; nanopartiküllerin pasif hedefleme ile hedef dokuya ulaşımının artırıldığı ve kontrollü salım sayesinde serbest uygulamaya kıyasla tedavi etkinliğinin iyileştirildiği gösterilmiştir (66-68).

Moioli ve ark. (88), yara iyileşmesinde uzatılmış salım sağlayan TGF- β 3 yüklü PLGA mikrokürelerin etkinliğini incelemiş; PLGA mikrokürelerden salım kinetiğinin uzatılabildiğini ve büyüme faktörünün biyolojik aktivitesinin korunarak hedef hücrelere ulaştırılabileceği bildirmiştir (88). Benzer şekilde, TGF- β 3 yüklü mikrokürelerin hidrojel temelli ilaç taşıyıcı sistemlere entegre edilmesi ile başlangıçtaki burst-effect ve ani salımın azaltıldığı ve daha kontrollü bir salım profilinin sağlandığı raporlanmıştır (89).

Kronik yaralarda ise taşıyıcı sistemin yalnızca salım kontrolü değil, aynı zamanda yara mikroçevresine katkısı da önem kazanmaktadır. TGF- β 3 yüklü kitosan/poli(etilen glikol) (PEG) hidrojel formülasyonunda, polimerlerin

antibakteriyel etkinliği ve bariyer özelliği sayesinde inflamatuvar yanıtın baskılanmasına katkı sağlandığı bildirilmiştir (37).

TGF- β 3'ün ayrıca elektrospin polikaprolakton (PCL) fiber iskelelere yüklenmesiyle uzatılmış salımın yanı sıra, ECM taklit eden yapı sayesinde hücre adezyonunun desteklendiği gösterilmiştir. Deriye lokal uygulamalarda mekanik dayanım özelliklerinin deri dokusuna benzer olması, yara iyileşmesine katkı sağlayan bir diğer avantaj olarak değerlendirilmektedir (90).

miRNA'ların yara iyileşmesinde uygulamalarında membran geçişi ve hücreyel alımının kısıtlı olması tedavi etkinliğini sınırlanmaktadır. miRNA'ların nükleazlar tarafından enzimatik yıkım, hızlı renal eliminasyon, endozomal hapsolme, hedef dışı gen susturma ve istenmeyen immün aktivasyon gibi kısıtlamaları da bulunmaktadır (91). miRNA ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenerek bu sınırlamalar aşılarak hedef hücrelere yüksek hücreyel alım sağlanabileceği bildirilmiştir (91).

Nükleik asit taşıyıcıları viral ve viral olmayan taşıyıcılar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Viral taşıyıcılar, retrovirüs veya adenovirüs gibi virüslerin genetik materyali hücrelere ulaştırma yeteneklerinden yararlanılarak modifiye edilmiş sistemlerdir. Viral vektör aracılı miRNA taşınmasında viral vektörler miRNA'ları biyogenezlerinin farklı aşamalarında (pri-miRNA ve pre-miRNA gibi) taşıyacak biçimde tasarlanmaktadır (92).

Viral sistemler yüksek transdüksiyon verimliliğine sahiptir. Ancak viral toksisite, immünojenisite gibi çeşitli biyogüvenlik sınırlamaları nedeniyle klinik ağıdan daha az tercih edilmektedir. Viral olmayan taşıyıcılar arasında lipozomlar, polimer nanopartiküller, lipid bazlı nanopartiküller ve inorganik nanopartiküller yer almaktadır. Bu taşıyıcılar, genetik materyali koruyarak hedef dokulara taşınmasını kolaylaştırmaya yardımcı olur (92).

miRNA'nın lipozom veya polimerik nanopartikül formölasyonlarına enkapsüle edilmesi, enzimatik yıkıma karşı korunmayı sağlamaktadır. Formölasyonların yüzey PEGilasyonu ise dolaşım süresini artırmaktadır. Nanopartikül ve lipozom dispersiyonlarının partikül büyüklüğünün 30-150 nm aralığında olmasıyla renal klirens azaltılmaktadır. Ayrıca hedef dokunun por büyüklüğüne uygun partikül büyüklüğüne sahip formölasyonların üretilmesiyle pasif hedefleme yapılmaktadır.

Endozomal kaçış için pH duyarlı polimerlerin kullanımı literatürde yer almaktadır. Hedef dışı gen susturmanın engellenmesi için peptit veya antikor gibi ligandlarla aktif hedeflendirmeye, hedef dokuya özgül bağlanma artırılmaktadır (91).

Lipozomların endositoz ile hücre içine girebilmesi, nükleik asitlerin taşınmasında önemli bir avantaj olarak değerlendirilmektedir. miRNA yüklü lipozomların en az %60–90 aralığında enkapsülasyon verimliliği sağlayabildiği bildirilmektedir. Ayrıca yüzey yükünün optimize edilmesiyle miRNA'nın negatif yükünün maskelenemediği ve hücre membranına transfeksiyonun artırılabilirdiği belirtilmektedir (91).

Dendrimer ve polimerik nanopartiküllere miRNA enkapsülasyonunda ise bazı kısıtlamalar raporlanmıştır. Dendrimerlerin sitotoksikite riski ve üretim karmaşıklığı gibi sınırlamaları vardır. Polimerik nanopartiküllerin aktif hedefleme yapıldığı durumda miRNA enkapsülasyon verimi %40-60 aralığında bulunmuştur. Ancak etkin endozomal kaçışın sağlanmasında polimerik nanopartiküllerin yetersiz olduğu bildirilmiştir. Bu gerekçeler doğrultusunda bu çalışmada lipozomlar; biyoyumlu yapıları hidrofilik ve hidrofobik aktif içerikleri taşıyabilmeleri ve hücre membranına benzer özellikler göstermeleri nedeniyle nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistem olarak tercih edilmiştir (91).

2.4.1. Lipozomlar

Nanometrik ölçekte geliştirilen ilk ilaç taşıyıcı sistemlerin lipozomlar olduğu kabul edilmektedir. Lipozomlar, çeşitli avantajları nedeniyle ilaç taşıma uygulamalarında yaygın biçimde kullanılmaktadır (91). Hidrofilik veya lipofilik ilaçların enkapsüle edilebilmesi, aktif içeriklerin stabilitesini ve biyoyararlanımını artırabilmeleri gibi özellikleri nedeniyle ilaç taşıyıcı sistem olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Lipozomların aktif içeriklerin toksik etkilerini azaltarak terapötik etkinliği iyileştirdiği bildirilmektedir (91, 93).

Lipozomların antikanser, antibiyotik, antifungal, antiinflamatuvar, anestezi ajanlar ve gen tedavisi ürünlerinin taşınmasında çok sayıda klinik çalışmada yer aldığı bildirilmektedir. Lipozomlar, klinik kullanıma başarıyla taşınabilmiş ilk nanomedikal taşıyıcı platformlar arasında yer almakta ve onaylanmış çok sayıda farmasötik dozaj

şekli bulunmaktadır (93). Lipozomal formülasyonların en bilinen örneklerinden biri, FDA onaylı PEG'lenmiş doksorubisin lipozomu olan Doxil®'dir. PEGilasyonun lipozomlara gizli (stealth) özellik kazandırarak opsonizasyonu ve mononükleer fagositik sistem (MPS) tarafından tutulmayı azalttığı; bu yolla dolaşım süresini uzattığı belirtilmektedir. Doxil'in başarısının, miRNA yüklü stealth lipozomlar dahil olmak üzere nükleik asit temelli tedavilere yönelik benzer formülasyonların geliştirilmesine öncülük ettiği ifade edilmektedir (91).

Lipozomların yapısında genellikle fosfatidilkolinler, fosfatidiletanolaminler, fosfatidilserinler ve fosfatidilgliseroller gibi fosfolipidler ile kolesterol gibi stabilize edici maddeler yer almaktadır. Bu yapılar 20 ile yaklaşık 1000 nm arasında değişen partikül büyüklüğünde, tek veya birden fazla lipid çift tabakasından oluşabilmektedir. Hidrofilik ilaçların sulu iç boşlukta taşınabildiği, hidrofobik ilaçların ise lipid çift tabakasının hidrokarbon zincir bölgesinde tutulabildiği belirtilmektedir. Bu özellikler lipozomların çok yönlü bir ilaç taşıma platformu olmasını sağlamaktadır (93).

Lipozom yapısının üretim yöntemine güçlü biçimde bağlı olduğu ve bu nedenle farklı tiplerin elde edilebildiği ifade edilmektedir. Lipozomlar; tek tabakalı veziküller (unilamellar) kapsamında küçük tek tabakalı veziküller (SUV, 20–100 nm), büyük tek tabakalı veziküller (LUV, 100–1000 nm) ve dev tek tabakalı veziküller (GUV, >1000 nm) olarak sınıflandırılabilir. Çok tabakalı veziküller (MLV, >500 nm) ise çok sayıda tabakadan oluşmaktadır. İlaç taşıma uygulamalarında çoğunlukla SUV ve küçük MLV tercih edilirken, GUV'lerin daha çok hücre modelleri olarak kullanıldığı belirtilmektedir. SUV çoğunlukla hidrofilik maddelerin taşınmasında kullanılırken, MLV ise çift tabakalı lipid yapıları nedeniyle hidrofobik bileşikler için tercih edilebildiği belirtilmektedir (93).

Partikül büyüklüğü; lipozomlarda enkapsülasyon verimi ve dolaşımdaki stabilize açısından kritik bir parametredir. Küçük lipozomların fagositik hücreler tarafından tutulmadan kaçma olasılığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Farmasötik amaçlı kullanılan ve özellikle parenteral uygulamaya yönelik nanopartiküllerde partikül büyüklüğünün genellikle ≤ 100 nm olması gerektiği kabul edilmektedir. Ortalama partikül büyüklüğü dinamik ışık saçılımı (DLS), boyut dışlama kromatografisi, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ve mikroskopi gibi

yöntemlerle ölçülmektedir. Partikül büyüklüğü dağılımı (polidispersite indeksi, PDI) ekstrüzyon, sonikasyon ve homojenizasyon gibi yöntemlerle kontrol edilebilmektedir (93).

Lipozomların genellikle lipid baş gruplarına bağlı olarak pozitif, negatif veya zwitter iyonik yüzey yüküne sahip olabilir. Yüzey yükü çoğunlukla zeta potansiyeli ile ifade edilmektedir ve elektroforetik hareketlilikten hesaplanmaktadır. Lipozom formülasyonuna eklenen iyonik lipid oranıyla zeta potansiyeli arasında doğrusal ilişki olduğu bilinmektedir. Zeta potansiyeli, partiküller arası etkileşimleri, karşı iyon adsorpsiyonunu ve nanopartikül stabilitesini belirlemektedir. Zeta potansiyeli düşük partiküller agregasyona eğilimliyken, yüksek partiküller birbirini iterek stabil süspansiyon oluşturmaktadır (93).

Lipozomlar, lipidlerin hidrofilik baş gruplarının yük durumuna göre katyonik (pozitif yüklü), anyonik (negatif yüklü) ve nötr olmak üzere üçe ayrılmaktadır (93). Çok sayıda katyonik lipid nükleik asit taşıyıcısı olarak değerlendirilmiştir. Bu lipidlerin temel farkı baş grubunun iyonize katyonik karakterde olmasıdır. Yapıda hidrofobik kısım (iki alkil zinciri veya kolesterol türevi), pozitif yüklü polar baş grup ve bu iki bölgeyi bağlayan bir bağlayıcı (linker) bulunmaktadır (94).

Negatif yüklü miRNA veya küçük müdahale edici RNA (siRNA) gibi nükleik asitler hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlerle katyonik lipidlerle lipid-nükleik asit kompleksi oluşturmaktadır. Nükleotid taşınmasında görev alan lipid-nükleik asit kompleksi lipopleks olarak adlandırılmaktadır. Bu kompleksleşme sonucunda nükleik asitler stabilize edilerek nükleaz yıkımına karşı korunmaktadır. Lipopleksler katyonik özellikleri nedeniyle hücre membranına daha yüksek afinite göstererek hücre yüzeyine adsorpsiyon, endositoz ve sitoplazmaya salınım basamaklarıyla nükleik asitlerin transfeksiyonunu artırmaktadır. Ek olarak katyonik baş grup proton süngerisi etkisiyle lizozomlardan kaçışı desteklemektedir (91, 93).

Bu çalışma kapsamında, diğer taşıyıcı sistemlere kıyasla daha yüksek transfeksiyon verimliliği sunan katyonik lipid bazlı sistemler kullanılmıştır. Katyonik lipozomların elde edilmesinde, negatif yüklü miRNA ve hücre membranları ile güçlü iyonik etkileşimler kurabilme yeteneği sayesinde miRNA'nın etkin enkapsülasyonunu ve hücre alımını kolaylaştırmak amacıyla formülasyona DOTMA dahil edilmiştir.

Lipozom formülasyonlarında en sık kullanılan katyonik lipidler DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoiloksi)propil]-N,N,N-trimetilamonyum klorür) ve DOTMA'dır. DOTMA iki eter bağı içerirken, DOTAP iki ester bağı içermektedir. Her iki lipid ile de yüksek nükleik asit enkapsülasyon verimi (EE (%)) bildirilmiştir. Ancak, bu lipidlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada, DOTMA ile hazırlanan formülasyonların DOTAP'a göre daha düşük sitotoksikite ve daha yüksek transfeksiyon verimliliği sergilediği gösterilmiştir (95).

Katyonik lipozomlarda yardımcı lipid olarak en sık DOPE (1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin) ve kolesterol (CHOL) tercih edilmektedir. DOPE ve CHOL gibi yardımcı lipidlerin lipid membranı stabilize ettiği, opsonizasyonu ve retikuloendotelial sistem (RES) tarafından tutulmayı azalttığı; bu yolla taşıyıcı verimliliğini ve *in vivo* transfeksiyon etkinliğini artırdığı bildirilmektedir (96). Kolesterol, lipozomal çift tabakanın stabilitesini ve sertliğini (rigidity) artırmak için kullanılmaktadır; bu durum, dolaşım ve membran alımı sırasında lipozom/lipoplekslerin yapısal bütünlüğünün korunmasında kritik rol oynar (95).

Bu çalışmada, zwitter iyonik yardımcı lipid olarak DOPE yerine DOPC seçilmiştir. DOPC, fizyolojik koşullar altında sıvı-kristalin fazda kalarak çift tabaka akışkanlığını sağlamaktadır (97). Zwitteriyonik baş grubu, katyonik DOTMA'nın yüzey yük yoğunluğunu dengeleyerek spesifik olmayan elektrostatik etkileşimleri azaltırken; biyouyumluluğu ve stabil çift tabaka oluşturma özellikleri onu farmasötik uygulamalar için uygun hale getirmektedir. Ayrıca DOPC, enkapsüle edilmiş terapötik ajanların hücre içi iletimini artırmak amacıyla tercih edilmiştir (95). Sonuç olarak DOTMA/DOPC/CHOL bileşimi; yüksek transfeksiyon verimliliği, koloidal stabilite ve biyouyumluluk arasında optimum dengeyi sağlayarak miRNA ve büyüme faktörlerinin eş zamanlı iletimini gerçekleştirmek üzere tasarlanmıştır.

Ayrıca, miRNA'nın kan dolaşımındaki yarı ömrünü uzatmak, nükleaz yıkımından korumak ve RES'ten kaçışını sağlamak amacıyla koruyucu ajan olarak genellikle PEG gibi suda çözünür polimerler kullanılmaktadır. PEGilasyon uygulanmış katyonik lipozomların füzyona uğramadığı bilinmektedir. PEG zincirleri, lipoplekslerin çevre ile olan etkileşimlerini en aza indirerek nükleik asitlerin hedef dışı organ veya dokularda salımını engellemekte ve böylece transfeksiyon etkinliğini

artırmaktadır (94). Bu çalışmada PEGilasyon, lipoplekslere DSPE-mPEG 2000 (1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N-[metoksi(polietilenglikol)-2000]) eklenerek sağlanmıştır. Bu modifikasyon ile lipoplekslerin etrafında sterik bir bariyer oluşturularak opsonizasyonun ve RES tarafından temizlenmenin önlenmesi, böylece dolaşım süresinin uzatılması amaçlanmıştır (95).

Lipozomların nihai fizikokimyasal özelliklerinin, formülasyonda yer alan fosfolipid türünün yanında kullanılan üretim yöntemine doğrudan bağlı olduğu bildirilmektedir (98). Bu doğrultuda lipozom ve lipopleks sistemlerinin hazırlanmasında konvansiyonel ve modern üretim yaklaşımlarından yararlanılmaktadır.

Konvansiyonel yöntemler arasında ince film hidrasyonu, ters faz buharlaştırma, çözücü enjeksiyonu, deterjan diyalizi ve yüksek basınçlı homojenizasyon yer almaktadır (98). Her bir yöntemin tekrarlanabilirliği, maliyet etkinliği ve ölçeklenebilirliği farklılık göstermektedir. Laboratuvar ölçeğinde bu sınırlılıklar çoğu zaman göz ardı edilebilse de klinik uygulamaya geçiş sürecinde sürekli üretime uygun, otomasyona elverişli ve yüksek tekrarlanabilirlik sağlayan yöntemlere gereksinim duyulmuştur. Bu gereksinim doğrultusunda, konvansiyonel yaklaşımların yanında modern üretim yöntemleri geliştirilmiştir (99).

Modern yöntemler arasında mikroakışkan karıştırma yöntemi, Fransız basınç hücresi yöntemi, dehidrasyon-rehidrasyon yöntemi, ısıtma yöntemi, sprej kurutma yöntemi, dondurarak kurutma yöntemi, dondurarak sprej kurutma yöntemi, çapraz akış enjeksiyon yöntemi, membran kontaktör yöntemi ve pH değişimi yöntemi bulunmaktadır (98). Bu yöntemler içerisinde özellikle mikroakışkan karıştırma yaklaşımı, yalnızca lipozom üretiminde değil, aynı zamanda farklı nano ve mikropartikül sistemlerinin hazırlanmasında da yaygın biçimde kullanılan modern yöntemlerden biri olarak öne çıkmaktadır (98, 99).

Mikroakışkan karıştırma yaklaşımı mikro-hidrodinamik odaklama (MHF) lipidlerin çözündüğü organik fazla, sulu fazın mikroakışkan kanalda hızlı biçimde karıştırılması esasına dayanmaktadır. MHF yönteminde, ortamda kayma gerilimi ve bileşim dalgalanmaları olmadığı için konvansiyonel lipozomlara kıyasla yüksek miktarda, tüm parçacıkların aynı özellikte ve büyüklükte olduğu

lipozom/lipoplekslerin oluşumu sağlanmaktadır (96, 100). MHF’de, etanolde çözülmüş lipid tek bir merkezden gelirken, iki sulu akım tarafından hidrodinamik olarak sıkıştırılır (96, 101). Karıştırma esnasında ortam polaritesinin artmasıyla lipidlerin çözünürlüğü azalmaktadır. Bunun sonucunda lipidler hidrofobik alkil zincirlerinin su ile temasını en aza indirmek üzere kendiliğinden veziküler yapılar halinde organize olmaktadır. Hidrofilik aktif içerikler sulu faza, hidrofobik aktif içerikler organik faza dahil edilerek oluşan veziküllere enkapsülasyonu sağlanmaktadır (99).

Mikroakışkan karıştırmada şırınga pompalarının kullanımı ile akış dinamiğini belirleyen toplam akış hızı (TFR) ve akış hızı oranı (su/organik) (FRR) parametreleri kontrol edilebilmektedir. TFR, birim zamanda elde edilen formülasyon hacmini ifade ederken; FRR, sulu ve organik fazlar arasındaki hacimsel oranı tanımlamaktadır (99). TFR ve FRR değişiklikleri ile lipozomların ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerleri optimize edilmektedir. TFR lipozom boyutları üzerinde sınırlı etki gösterirken, FRR arttıkça daha küçük boyutlu ve daha düşük PDI değerine sahip formülasyonlar elde edilebilmektedir (99).

2.5. Yara İyileşmesinde 3 Boyutlu Biyobaskı Yaklaşımları

Son yıllarda 3B biyobaskı, rejeneratif tıp alanında yara iyileşmesine yönelik hızlı, hassas ve yüksek verimli otomasyon sağlayan yenilikçi bir teknoloji olarak öne çıkmıştır. 3B biyobaskı, canlı hücrelerin, biyomalzemelerin, biyomoleküllerin ve büyüme faktörlerinin katman katman ve kontrollü şekilde biriktirilmesine dayanan bir eklemeli üretim yöntemi olup, biyouyumlu yapay deri üretimi açısından umut vadeden bir strateji sunmaktadır (40). Bu kapsamda biyobaskı ile oluşturulan deri yapıları, donör doku gereksinimini azaltması ve cerrahi girişimleri sınırlandırabilmesi nedeniyle, klasik deri greftlerine alternatif bir yöntem olarak değerlendirilmektedir (40).

Biyobaskı teknolojisinin; yanıklar, bası yaraları, venöz ülserler ve diyabetik ayak ülserleri gibi farklı kronik yara tiplerinde deneysel olarak uygulandığı bildirilmektedir. Epidermis–dermis–hipodermisi içeren 3B biyobaskı ile çok katmanlı deri yapılarının başarıyla üretilbildiği rapor edilmiştir (40). Buna ek olarak, biyomürekkep içerisine anjiyogenezi destekleyen peptitlerin veya biyolojik faktörlerin

dahil edilmesi gibi yeni stratejilerin damarlaşmayı artırdığı; böylece yara kapanmasını hızlandırarak re-epitelizasyonu desteklediği gösterilmiştir (40).

Biyobaskı ile üretilen iskeleler, biyomürekkep içerisindeki farklı hücre tipleri ve biyomalzemelerin spesifik tasarımlarda basılmasıyla doğal derinin mimarisi ve heterojen yapısını önemli ölçüde taklit edebilmektedir (40). Bu iskeleler, hücre adezyonu, proliferasyonu, farklılaşması ve göçü için uygun bir ortam sağlamaktadır. Aynı zamanda doku rejenerasyonu süresince yapısal bütünlüğün korunmasında temel rol üstlenmektedir (102). İskelenin gözeneklilik düzeyi besin ve oksijen difüzyonu, atık uzaklaştırılması, hücre infiltrasyonu ve vaskülarizasyon gibi süreçleri doğrudan etkilemektedir. Ancak optimal gözenek boyutunun hedef dokuya göre değişebileceği, ayrıca porozitenin damarlaşmayı ve yapısal stabiliteyi olumsuz etkilemeyecek şekilde dengelenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (102).

İskele tasarımında biyomalzemenin biyouyumluluk ve kontrollü biyobozunurluk özellikleri önem taşımaktadır. Biyouyumlu iskeleler, istenmeyen bağışıklık yanıtlarını sınırlayarak doku ile bütünleşmeyi desteklerken; kontrollü biyobozunurluk, iskelenin zamanla yerini yeni oluşan dokuya bırakmasına ve bozunma ürünlerinin toksik etki oluşturmadan uzaklaştırılmasına katkı sağlamaktadır. Ayrıca yüzey özellikleri hücresel yanıtların belirlenmesinde belirleyicidir. İslanabilirlik, yüzey yükü ve fonksiyonel grupların hücre adezyonu ve yayılımını etkileyebileceği bildirilmiştir (102). Son olarak, iskelelerin mekanik özelliklerinin de hedef dokunun gereksinimlerine göre optimize edilmesi gerekmektedir (102).

Deri rejenerasyonu ve yara iyileşmesi uygulamalarında kullanılan biyobaskı yöntemleri genel olarak ekstrüzyon temelli, damlacık (inkjet) temelli, lazer temelli ve stereolitografi temelli sistemler olarak sınıflandırılmaktadır (40). Bu yöntemler arasında en yaygın yaklaşım, biyomürekkebin mekanik ya da pnömatik sistemlerle nozülünden sürekli filamentler halinde itildiği ekstrüzyon biyobaskı tekniğidir (103). Bu tekniğin; yüksek baskı hızı ve hassasiyetinde çok sayıda biyomalzeme ile uyumlu olduğu ve genellikle ısıtma gerektirmediği bilinmektedir. Bu nedenle bu yöntem hücrelerin ve biyoaktif bileşiklerin iskeleye entegrasyonunun sağlanması için tercih edilmektedir. Ancak stabil 3B yapıların elde edilebilmesi için biyomürekkebin baskı sırasında ve sonrasında şekil bütünlüğünü koruyacak viskoziteye ve uygun çapraz

bağlanma özelliklerine sahip olması gerekmektedir. Öte yandan, nozül tıkanması gibi teknik sınırlamalar yöntemin geliştirilmesi gereken yönleri arasında yer almaktadır (40, 103).

Başarılı 3B biyobaskı için biyomürekkep seçimi kritik bir basamaktır. Biyomürekkep çoğunlukla biyomalzeme, hücreler ve sıklıkla büyüme faktörlerinin bir kombinasyonundan oluşur. Bu bağlamda, hidrojel bazlı polimerik ağlar; yüksek su tutma kapasitesi, şişebilme ve mekanik stabiliteyi belirli ölçüde koruyabilme özellikleriyle biyobaskı uygulamalarında öne çıkmaktadır (103). Kitosan, jelatin, kolajen, alginat ve hyaluronik asit gibi doğal hidrojel bazlı biyopolimerler; çoğu zaman mekanik özellikleri güçlendirmek amacıyla sentetik polimerlerle birlikte kullanılmaktadır. İdeal bir biyomürekkebin biyoyumlu, biyobozunur, kolay basılabilir, şekil bütünlüğünü koruyabilen ve mekanik olarak stabil olması beklenmektedir (40). Biyomürekkebin reolojik ve viskoelastik özellikleri; hücre göçü, proliferasyonu ve hücre dışı matriksin yeniden yapılanması üzerinde doğrudan belirleyicidir (40).

Biyomürekkep bileşeni olarak kitosanın kullanımı önemli avantajlar sunmaktadır (40). Kitosan; kolay temin edilebilir olması, biyobozunurluğu, immünojen olmaması, hidrofilik yapısı, hemostatik özellikleri ve biyoyumluluğu gibi pek çok kritik niteliği bir arada taşıması nedeniyle iskele tasarımında sık tercih edilmektedir. Katyonik karakteri sayesinde glikozaminoglikanlar gibi negatif yüklü biyomoleküllerle elektrostatik etkileşim kurarak hücre adezyonunu ve proliferasyonunu desteklemektedir. Ayrıca ECM’de bulunan bazı glikozaminoglikanlara yapısal benzerliğiyle yabancı cisim yanıtını azaltmaya katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (103). Bununla birlikte kitosan temelli biyomalzemelerin mekanik ve fiziksel özelliklerinin, bazı biyomedikal uygulamalar için yetersiz kalabildiği belirtilmektedir. Bu nedenle lif takviyesi, kompozit yapı oluşturma, yüzey modifikasyonu ve biyolojik olarak aktif moleküllerin eklenmesi gibi stratejilerle kitosan iskelelerin özelliklerinin iyileştirilebileceği, ayrıca üretim yöntemleri ve süreç parametrelerinin optimize edilmesiyle mekanik özelliklerin ayarlanabildiği vurgulanmaktadır (103).

Kitosan, kabuklular, mantarlar ve böceklerde bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen doğrusal bir polisakkarittir. Deasetilasyon sırasında kitin zincirindeki N-asetil grupları uzaklaştırılarak amino grupları kazandırılır ve böylece kitosan glukozamin birimlerince zengin hale gelir. Yapısında glukozamin ve N-asetilglukozamin kalıntıları $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidik bağlarla birbirine bağlanmıştır (102). Kitosanın moleküler ağırlığı ve deasetilasyon derecesi (DD), 3B biyobaskıda basılabilirliği belirleyen temel parametrelerdir. Bunun nedeni kitosan hidrojel dispersiyonunun viskozite, çözünürlük, mekanik mukavemet, kristallik ve biyoyumluluk gibi özelliklerinin bu faktörlerden etkilenmesidir. Daha yüksek moleküler ağırlık viskoziteyi artırarak ekstrüzyon tabanlı baskıda basılabilirliği ve yapısal doğruluğu güçlendirmektedir. Ancak çok yüksek düzeylerde iğne ucu tıkanması ve akışkanlık kaybı gibi sorunlara yol açmaktadır. Deasetilasyon derecesi ise çözünürlük, yük yoğunluğu, çapraz bağlanma kapasitesi ve hücre-biyomalzeme etkileşimleri üzerinde etkilidir. Bu nedenle viskozite, mekanik dayanım ve biyoyumluluk arasında denge kuracak şekilde uygun moleküler ağırlık-DD kombinasyonunun seçilmesi gerektiği; ekstrüzyon biyobaskı için genellikle orta moleküler ağırlık ve orta-yüksek DD'nin tercih edildiği belirtilmektedir (102, 103).

Kitosan hidrojel iskelelerinin mekanik özelliklerinin iyileştirilmesi için fiziksel veya kimyasal yöntemlerle çapraz bağlanabileceği bildirilmiştir. Fiziksel hidrojellerde hidrofobik etkileşimler, elektrostatik/iyonik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi geri dönüşlü etkileşimler rol oynarken; pH, sıcaklık veya karşı iyon değişimi ile sol-jel geçişi gözlenmektedir. Fiziksel jellerin düşük toksisite ve ek çapraz bağlayıcı gerektirmeme avantajına karşın, polimerik yapı kusurları ve mikrohomojenlik nedeniyle mekanik mukavemetinin sınırlı kalabildiği; ayrıca gözenek boyutu, çözünme oranı ve fonksiyonelleştirme tekrarlanabilirliğinin kısıtlı olabileceği bildirilmektedir. Bu sınırlılıklar ise kimyasal çapraz bağlayıcılarla geri dönüşsüz kovalent bağların oluşturulmasıyla azaltılabilmektedir. Çapraz bağlanma yoğunluğu ağ yapısını, şişme davranışını, su içeriğini, gevşeme sürelerini ve ilaç salımını etkilerken; kompozit biyomalzeme eklenmesi fiziksel ve kimyasal özellikleri iyileştirebilmektedir (103). Bununla birlikte RF aracılı UV çapraz bağlamanın, klasik karbodiimid temelli kimyasal çapraz bağlamaya alternatif bir yaklaşım olarak kullanılabildiği rapor edilmiştir. Literatürde, kitosan polimerinin elektron verici

kapasitesi sayesinde UV fotobaşlatıcı RF ile etkileşime girerek UV ile çapraz bağlama süreçlerinde yardımcı başlatıcı (co-initiator) rolü üstlenebildiği bildirilmiştir. RF, doğal vitamin B2'nin suda çözünebilen bir türevi olup, ışığa duyarlılığı nedeniyle fotosensitizer ve fotobaşlatıcı (photoinitiator) gibi işlevler gösterebilmektedir. Bu bağlamda RF, doku mühendisliği ve yara iyileşmesi uygulamalarında özellikle kolajenin etkin biçimde çapraz bağlanmasını sağlamak amacıyla yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir (33).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

Çalışmada kullanılan DOTMA, DOPC ve 3 β -hidroksi-5-kolesten (kolesterol, CHOL) Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, ABD) firmasından temin edilmiştir. DSPE-mPEG2000 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, ABD) firmasından satın alınmıştır. Rekombinant insan TGF- β 3 ve TGF- β 1 proteinleri ProSpec (Ness Ziona, İsrail) firmasından, miR-132 mimiği (5'-ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU-3') ise MyBioSource (San Diego, CA, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Lipozom ve lipopleks üretiminde kullanılan mikroakışkan çip (HDF3, 300 μ m, Z100) uFluidic (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Diyaliz işlemlerinde selüloz membran diyaliz tüpü (molekül ağırlığı kesme değeri (MWCO) 10–12 kDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ile Spectra/Por® 6 diyaliz membranı (MWCO 25 kDa, Repligen, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Lipozomların saflaştırılmasında Amicon® ultrafiltrasyon üniteleri (Millipore, Burlington, MA, ABD) kullanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal sıgır serumu (FBS), penisilin-streptomisin ve tripsin-EDTA Capricorn Scientific (Ebsdorfergrund, Almanya) firmasından temin edilmiştir. L929 fare fibroblast hücre hattı (NCTC clone 929; CCL-1™) ATCC (Manassas, VA, ABD) firmasından sağlanmış ve düşük pasaj numaralarında kullanılmıştır. Hücre hattı deneylerde kullanılmadan önce mikoplazma kontaminasyonu açısından test edilmiş ve negatif olduğu doğrulanmıştır.

Hücre canlılık testlerinde kullanılan MTT reaktifi [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] SERVA (Heidelberg, Almanya) firmasından, Transwell® 6 kuyucuklu hücre kültürü insertleri ise Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

TGF- β 3 sandviç enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) kiti CK-Bio (Çin) firmasından; fare kolajen tip 1 α 1 zinciri (COL1A1), kolajen tip 3 α 1 zinciri

(COL3A1), MMP13 ve MMP9 ELISA kitleri Elabscience (Houston, TX, ABD) firmasından; fare ki67 proliferasyon belirteci (MKI67) ve RASA1 ELISA kitleri FineTest (Wuhan, Çin) firmasından; bicinkoninik asit (BCA) protein analiz kiti ise Elabscience (Houston, TX, ABD) firmasından temin edilmiştir. Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Assay Kit Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, ABD) firmasından satın alınmıştır.

siGLO Green Transfection Indicator Horizon Discovery (Cambridge, Birleşik Krallık) firmasından; 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ABT Laboratory Industry (Ankara, Türkiye) firmasından; Hybrid-R RNA Isolation Reagent GeneAll (Seul, Güney Kore) firmasından; 2× qPCR SYBR Green Master Mix (ROX içeren) ABT Laboratory Industry (Ankara, Türkiye) firmasından; SuperScript™ II Reverse Transcriptase Invitrogen (Carlsbad, CA, ABD) firmasından; PureLink™ formalinle fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) RNA Isolation Kit Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Hidrojel hazırlanmasında yaklaşık 272 kDa molekül ağırlığına ve yaklaşık %86 deasetilasyon derecesine sahip orta molekül ağırlıklı kitosan, RF ve %90 laktik asit Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hidrojel iskelelerinin üretiminde kullanılan baskı şırıngaları, iğne uçları ve baskı kafaları Axo A1 3B Biyobaskı Sistemi kitinin (Axolotl Biosystems, İstanbul, Türkiye) bileşenleri olarak sağlanmıştır.

Histolojik analizlerde kullanılan Masson trikrom boyama kiti, hematoksilin çözeltisi ve Eozin Y çözeltisi Merck firmasından; immünohistokimyasal (İHK) analizlerde kullanılan UltraVision™ Detection System (yaban turpu peroksidazı (HRP), diaminobenzidin (DAB) substratı, DAB kromojeni ve Mayer hematoksilin içeren) Thermo Fisher Scientific firmasından temin edilmiştir. Kolajen tip I α 2 zinciri (COL1A2) (tavşan poliklonal; E-AB-10155), COL3A1 (fare monoklonal; E-AB-22071) ve α -SMA (tavşan rekombinant monoklonal, E-AB-81457) antikorları Elabscience firmasından; RASA1 (tavşan poliklonal; bs-13281R) antikoruna ise Bioss Antibodies (Woburn, MA, ABD) firmasından temin edilmiştir.

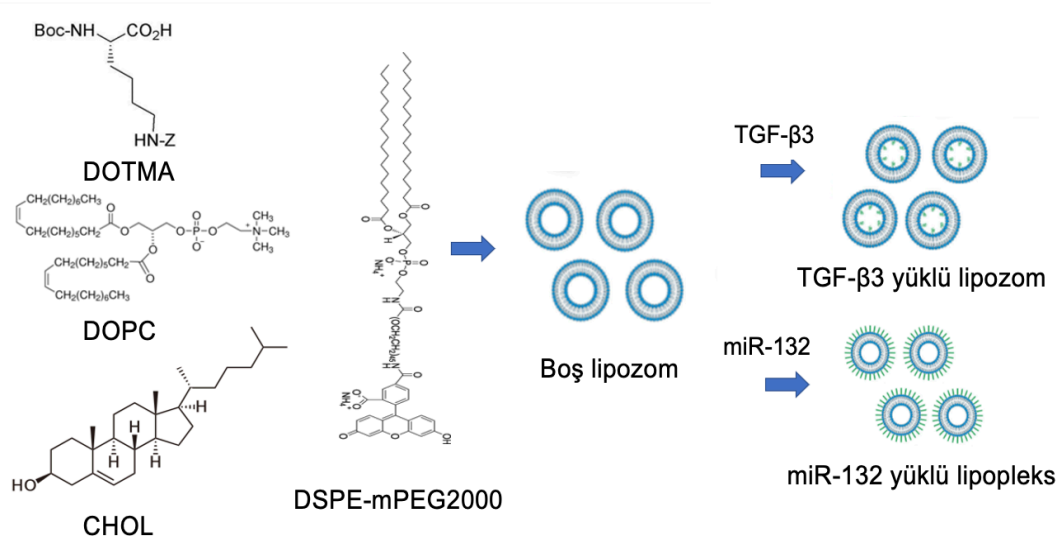
in vivo çalışmalarda ortalama 24–35 g ağırlığında, 15 haftalık toplam 30 adet erkek C57BL/6 fare kullanılmıştır. Deney hayvanları Kobay DHL AŞ (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Lipozom/Lipopleks Formülasyonu, Hazırlanması ve Optimizasyonu

Lipozom/lipopleks formülasyonlarında katyonik özellikte lipid olarak DOTMA; nötral özellikte lipid olarak DOPC, stabilite artırıcı lipid olarak CHOL ve yüzey modifikasyonu ile stabilite artırıcı ajan olarak DSPE-mPEG2000 kullanılmıştır (Şekil 3.1.). İstenen terapötik etkiyi elde etmek için rekombinant insan TGF- β 3 ve miR-132 yerine koyma amacıyla miR-132 mimiği (5'-ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU-3') kullanılmıştır. Formülasyonlar mikroakışkan karıştırma yöntemiyle hazırlanmıştır.

Lipozomların başlangıç yükleme oranı TGF- β 3 için, yara iyileşmesini konu alan literatür bilgisi doğrultusunda 0,5-2 μ g/mL aralığında 3 doz (0,5-1-2 μ g/mL) denenmiştir (4, 52, 66, 67, 104-106).

Lipoplekslerin başlangıç yükleme oranı miR-132 için, literatür bilgisi doğrultusunda sunulan miRNA dozu lipid/miR-132 kütle oranı 1 mg/ 25 μ g ve pozitif yüklü azot grupları (N)/ negatif yüklü fosfat grupları (P) oranı 4 olacak şekilde denenmiştir (101, 107-111). miRNA yüklü lipoplekslerin hazırlanması için farklı bir yöntem olan N/P oranı, katyonik lipid DOTMA'daki pozitif yüklü azot grupları (N) ile miRNA'daki negatif yüklü fosfat grupları (P) arasındaki molar oranı ifade etmektedir.



Şekil 3.1. Lipozom/ lipopleks formülasyonlarının hazırlanışının şematik gösterimi.

3.2.1. Lipozom/Lipopleks Formülasyonlarının Mikroakışkan Karıştırma Yöntemiyle Hazırlanması

Lipozom/lipopleks formülasyonları mikroakışkan karıştırma yönteminde akış ve karıştırma sağlayan 2 girişli-1 çıkışlı mikroakışkanlaştırıcı çip (HDF3 300umZ100 Two Inlet Hydrodynamic Focusing Chip, uFluidic) kullanılarak üretilmiştir.



Şekil 3.2. Mikroakışkan karıştırma yönteminde kullanılan çipin yapısını gösteren modellere ilişkin örnek fotoğraflar (uFluidic).

Şekil 3.2.'de gösterilen çipin üst girişinden su fazı (inorganik fazın), orta girişinden ise farklı oranda lipid içeren etanol (organik faz) akışı sağlanmıştır.

Katyonik lipozomların fizikokimyasal özelliklerini belirleyen en önemli parametre olarak lipid bileşimi (DOTMA/DOPC/CHOL mol oranları) seçilmiştir. Bu kapsamda, lipid türleri ve mol oranlarının sistematik olarak taranması amacıyla 3^3 faktöriyel tasarım ile optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Lipozom/lipopleks formülasyonlarının hazırlanmasında bağımsız değişken olarak seçilen lipidlerin molar oranı Tablo 3.1’de verilmiştir. Tüm formülasyonlarda DSPE-mPEG2000 0,375 μ M, toplam lipid ise 15 μ mol/mL konsantrasyonda sabit tutulmuştur (112). DOTMA/DOPC/CHOL molar oranları 3^3 faktöriyel tasarıma göre değiştirilerek (Tablo 3.1) 27 formülasyon üretilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları boyunca TFR 2 mL.dk⁻¹’da sabit tutulmuştur. Bu değer, test edilen aralıkta TFR’nin lipozomların ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerleri üzerinde önemli bir etkisi olmadığını gösteren önceki verilere dayanarak seçilmiştir (112). Bu nedenle, deneysel modelde gereksiz karmaşıklığı önlemek ve formülasyonla ilgili değişkenlere odaklanmak için TFR faktöriyel tasarımdan çıkarılmıştır.

Su-organik faz akış hızı oranı olarak tanımlanan FRR, başlangıçta 3 olarak sabitlenmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda en uygun FRR değerini belirlemek amacıyla seçilen formülasyon (F22), FRR oranları 4 ve 5 olacak şekilde üretilmiştir.

İstenen yanıtlar Y1 (ortalama partikül büyüklüğü (nm); hedef aralık: 100–200 nm), Y2 (PDI; hedef: <0,3) ve Y3 (zeta potansiyeli (mV); hedef: >40 mV) olarak tanımlanmıştır.

Tablo 3.1. 3^3 faktöriyel tasarımında kullanılan faktörlere ilişkin tablo.

<i>FAKTÖR</i>	<i>DÜZEY</i>		
	<i>Düşük</i>	<i>Orta</i>	<i>Yüksek</i>
DOTMA	6	9	12
DOPC	1	2	3
CHOL	4	7	10

TGF- β 3 su fazına eklenerek formülasyona dahil edilmiş ve mikroakışkan karıştırma yöntemiyle TGF- β 3 yüklü lipozom (TGF- β 3 LP) formülasyonları elde edilmiştir. miR-132 mimiği ise RNaz içermeyen suda hazırlanan Tris/HCl tamponunda (pH=7,4) çözülmüştür. Takiben lipid/miR-132 kütle oranı veya N/P oranına göre tampon içerisindeki miR-132 lipozom dispersiyonuna gerekli miktarda eklenmiş ve oda sıcaklığında 20-30 dakika inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon işlemi sonucunda miR-132 içeren lipopleks (miR-132 LPX) formülasyonları elde edilmiştir (101).

3.2.2. Lipozom/Lipopleks Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Partikül Büyüklüğü/Dağılımı ve Zeta Potansiyel Analizi

Hazırlanan formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli, Zetasizer NanoZS (Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye) cihazı kullanılarak DLS ve elektroforetik ışık saçılımı (ELS) yöntemiyle belirlenmiştir (96). Örnekler formülasyonların saf su ile 10 kat seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Ölçümler 25°C’de 3 tekrarlı gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak sunulmuştur.

Morfoloji ve Yüzey Özellikleri Analizi

Lipozomların ve lipoplekslerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde, bir örnek içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesine dayanan, 20-120 kV aralığında hızlandırıcı voltaj altında çalışan Konvansiyonel Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM, FEI, Hillsboro, OR, ABD) kullanılmıştır (113, 114). Analizler, ODTÜ MERLAB (Ankara, Türkiye) bünyesinde hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme işlemi, örnekler taşıyıcı sistem formülasyonları (lipozom/lipopleks) saf su ile 10 kat seyreltildikten sonra karbon kaplı filmler üzerine damlatılıp kurutulduktan sonra gerçekleştirilmiştir.

TGF- β 3 LP ve miR-132 LPX Formülasyonlarının Enkapsülasyonu ve Miktar Tayini

TGF- β 3 doz optimizasyonu kapsamında, 0,5, 1 ve 2 μ g/mL derişimlerindeki TGF- β 3 LP formülasyonlarında miktar tayini için sandviç ELISA yöntemi

kullanılmıştır. TGF- β 3 ELISA kiti üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda kullanılmıştır. Yüklü lipozom formülasyonlarının 14 000 x g'de 20 dakika santrifüjleme adımından sonra elde edilen süpernatant, 0,22 μ m gözenek boyutlu filtrelerden süzölmüştür. Süpernatant, TGF- β 3'ü ölçmek için kullanılmıştır (52). TGF- β 3'ün EE (%) aşağıda verilen Eşitlik 3.1. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{TGF-}\beta\text{3 EE (\%)} = [(m1 - m2) / m1] \times 100 \quad (3.1.)$$

m1= Başlangıçtaki (formülasyona eklenen) TGF- β 3 miktarı (μ g)

m2= Süpernatandaki (enkapsüle edilmemiş) TGF- β 3 miktarı (μ g)

miR-132 LPX formülasyonlarında lipid/miR-132 kütle oranı 1 mg/ 25 μ g veya N/P oranı 4 olacak şekilde yüklenerek her bir formülasyon için EE (%) belirlenmiştir. En yüksek EE (%) sahip formülasyonun belirlenmesi için hazırlanan miR-132 yüklü lipopleksler 4°C'de 10 000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir (101, 115, 116). Süpernatandaki serbest miR-132'nin RiboGreen RNA kiti ile reaksiyona sokulması ile elde edilen parlak yeşil floresans, floresans spektrofotometri (480 nm eksitasyon /520 nm emisyon) ile ölçölerek miRNA miktarı belirlenmiştir (117-119). miR-132 EE (%) aşağıda verilen Eşitlik 3.2. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{miR-132 EE (\%)} = [(m1 - m2) / m1] \times 100 \quad (3.2.)$$

m1= Başlangıçtaki (formülasyona eklenen) miR-132 miktarı (μ g)

m2= Süpernatandaki (enkapsüle edilmemiş) miR-132 miktarı (μ g)

Deneyler 3 kere tekrar edilmiştir. EE (%) analizi sonucunda lipozom/lipopleks formülasyonlarındaki optimum TGF- β 3 ve miR-132 mimiği konsantrasyonu belirlenmiştir. İlerleyen dönem çalışmaları bu optimum formülasyon ile yürütölmüştür.

Formülasyonların yükleme kapasitesi (LD(%)) aşağıda verilen Eşitlik 3.3. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{LD (\%)} = [m1 / (m1 + m2)] \times 100 \quad (3.3.)$$

m1= Enkapsüle edilen TGF- β 3 veya miR-132 miktarı (μ g)

m2= Toplam lipid (μ g)

3.2.3. Stabilité Çalışmaları

Optimum miR-132 ve TGF- β 3 yüklü lipozom/lipopleks formülasyonlarında stabilité çalışmaları yürütölmüştür.

Formülasyon içeriğindeki biyolojik ve biyoteknolojik ürünlerin saklama koşulu olan 4 °C ile formülasyonun nihai uygulama sıcaklığı olan 37 °C, termal ve sızma stabilitesi deneyleri için sıcaklık noktaları olarak belirlenmiştir. Örnek alma noktaları olarak, ilk 12 saat süresince saat başı ve 1., 3., 5., 7. ve 14. Günler belirlenmiştir (120-122).

İdeal olarak seçilen yüklü formülasyonlarda süpernatant yerine, aynı deney düzeneğinden (4°C'de ve aynı zaman noktaları kullanılarak) lipozom/lipopleks numuneleri alınmış ve pH 7,4 tampon çözeltisi ile 10 kat seyreltilmiştir. Ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli değerleri analiz edilmiştir (120-122). Lipozom/lipopleks formülasyonlarının EE (%) değeri de belirlenmiştir.

3.2.4. Lipozom Formülasyonlarının Saflaştırılması

Lipozom formülasyonlarının saflaştırılması ve konsantre edilmesi, liyofilizasyon, ultrasantrifüjleme ve ultrafiltrasyon yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (123-126). Lipozom/lipopleks formülasyonlarındaki serbest aktif içeriğin (miR-132 mimiği ve TGF-β3) ve organik çözücülerin uzaklaştırılması amacıyla formülasyonlar saflaştırılmıştır.

Liyofilizasyon çalışmaları için, kriyoprotektan olarak trehaloz ve sükroz Tris tamponunda (pH 7,4) %3-25 (a/h) konsantrasyon aralığında hazırlanmış ve lipozom formülasyonlarına eklenmiştir (113). Dondurarak kurutma işleminden sonra, formülasyonlar 1 mL fosfat tamponlu salin (PBS) (pH 7,4) içinde yeniden çözülmüştür. Kriyoprotektan konsantrasyonunun membran bütünlüğü ve partikül büyüklüğü üzerindeki etkisi, yeniden çözündürme sonrası partikül büyüklüğü ve PDI ölçülerek değerlendirilmiştir (127).

Ultrasantrifüj yöntemiyle saflaştırmada iki protokol değerlendirilmiştir. İlk protokolde, dispersiyonlar 60 000 × g'de 1 saat süreyle, ikinci protokolde ise 30 000 × g'de 2 saat süreyle santrifüjlenmiştir. Elde edilen pellet PBS (pH 7,0) içinde yeniden dispersiyon haline getirilmiştir (125, 126).

Lipozom dispersiyonları, ultrafiltrasyon yoluyla konsantre edilmiştir (123). Ultrafiltrasyon yönteminde, formülasyonlar üreticinin talimatlarına uygun olarak ultrafiltrasyon tüpleri (MWCO 100 kDa) kullanılarak 3 000 × g'de 30 dakika

santrifüjlenmiştir. Süzüntü (flow-through) atılmış, retentat PBS (pH 7,4) ile bir kez yıkandıktan sonra pipet yardımıyla toplanmıştır. Bu adımın temel amacı partikül geri kazanımını en üst düzeye çıkarmak değil, artık çözücüler ve serbest aktif bileşenleri uzaklaştırmak olduğundan, geri kazanım nicel olarak değerlendirilmemiştir. Bununla birlikte, ultrafiltrasyona dayalı saflaştırmanın partikül bütünlüğünü koruyarak yüksek lipozomal geri kazanım sağladığı bildirilmiştir (128, 129).

3.2.5. Lipozom/Lipoplekslerdeki TGF- β 3 ve miR-132'nin *in vitro* Salım Çalışmaları

in vitro salım profili belirlenirken diyaliz membran yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde TGF- β 3 yüklü lipozom dispersiyonu veya miR-132 yüklü lipopleks formülasyonu diyaliz membranı (TGF- β 3 için MWCO 25 kDa ve miR-132 için MWCO 10-12 kDa) içerisine uygun miktarda yerleştirilmiştir. *in vitro* salım çalışmaları PBS (pH=7,4) salım ortamında $37\pm0,5$ °C'de sürekli manyetik karıştırma altında (100 rpm) gerçekleştirilmiştir.

Örnekler belirlenen zaman noktalarında üst fazdan toplanmıştır. Salınan etkin madde miktarı (TGF- β 3 or miR-132) belirlenmiştir. Her zaman noktası için üst fazın tamamı alınıp ve aynı miktarda yeni PBS eklenerek bir sonraki zaman noktasına geçilmiştir (17, 96, 130).

ELISA yöntemi ile hesaplanan TGF- β 3 miktarları ve Ribogreen kiti kullanılarak hesaplanan miR-132 miktarları her zaman noktası için toplanarak *in vitro* salım profilleri elde edilmiştir (117-119). Deneyler 3 tekrar üzerinden yapılmıştır.

3.3. *in vitro* Hücresel Alım (Transfeksiyon) Çalışmaları

in vitro deneyler, fare dermal fibroblast hücre hattı (L929) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon verimliliğini belirlemek için hücreler, yaklaşık 10^5 hücre/kuyucuk yoğunluğunda 24 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve tek tabaka halinde çoğaltılmıştır. Serbest miR-132 ve miR-132 LPX, 1:1 oranında siGLO Green Transfeksiyon Göstergesi (6-FAM, 6- Karboksifloresin) ile işaretlenmiştir. Serbest 6-FAM-miR-132 ve 6-FAM-miR-132 LPX, 50 nM konsantrasyonda L929 hücrelerine uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler PBS ile

yıkanmış ve hücre çekirdekleri DAPI ile boyanmıştır. Transfeksiyon verimliliği, floresan mikroskobu ile gösterilmiştir (131).

3.4. Lipozom/Lipopleks Formülasyonlarının *in vitro* Hücre Canlılık Testi

TGF- β 3 LP ve miR-132 LPX'in L929 hücreleri üzerindeki sitotoksitesini belirlemek amacıyla MTT testi gerçekleştirilmiştir (132). Her bir kuyucuğa, %10 FBS içeren DMEM besiyerinde yaklaşık 4×10^4 – 6×10^4 hücre ekilmiştir. Hücreler, plaka tasarımına göre TGF- β 3 LP ve miR-132 LPX ile muamele edilmiştir. Her kuyucuğa 10 μ L 5 mg/mL MTT çözeltisi eklendikten sonra hücreler 37 °C'de sırasıyla 4, 12 ve 24 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon süresinin sonunda hücre kültürü besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerde oluşan formazan kristalleri kuyucuk başına 100 μ L DMSO'da çözülmüş ve plaka 630 nm'de plaka okuyucuda (Fluostar Omega, BMG LABTECH, Almanya) okunmuştur. Sonuçlar kontrol grup değerleri kullanılarak standardize edilmiştir. MTT deneyi en az n=3 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.5. Optimize Edilen Lipozom/Lipopleksler ile Hücre Kültürü

Çalışmaları

Dermal fibroblast hücre hattı kültüründe hücreler, %10 FBS ile desteklenmiş ve 100 U/mL penisilin ile 100 μ g/mL streptomisin içeren DMEM besiyerinde süspanse edilerek deneysel plana uygun şekilde 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekilmiştir. Hücreler, %5 CO₂ içeren nemli atmosfer koşullarında 37 °C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyonu takiben, yüzeye tutunmayan hücreler uzaklaştırılıp tutunmuş olan hücreler antibiyotiklerle desteklenen %10 oranında FBS içeren DMEM içinde büyümeye bırakılmıştır. Bu koşullarda hücreler genellikle 3-4 gün içinde deney yapmaya hazır şekilde üremektedir ve hücre kültürü plakalarında istenilen doluluğa ulaşılmaktadır.

3.5.1. Hücre Kültüründe Fibrozis Modeli Oluşturma

L929 hücre hattında fibrozis modeli oluşturmak için, hücreler 20 ng/mL konsantrasyonundaki TGF- β 1 ile 96 saat boyunca inkübe edilmiştir (131). Dermal fibroblast hücre hattında fibrozis sürecinin başladığı, süreçte rol oynayan COL1A1 ve

COL3A1 genlerinin ekspresyon düzeylerinin kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) kullanılarak belirlenmesi ile doğrulanmıştır. Bu genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin protein düzeylerine ne ölçüde yansıdığını belirlemek için, bu genler tarafından eksprese edilen proteinlerin düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

TGF- β 3 dozu 2,5 ng/mL ve 5 ng/mL olarak seçilmiştir (133). miR-132 dozu literatür doğrultusunda 100 nM olarak belirlenmiştir (134).

Kontrol, Fibrozis, Boş Lipozom, TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL), TGF- β 3 LP (5 ng/mL), miR-132 LPX, TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX olmak üzere deney grupları belirlenmiştir. Fibrozis modeli oluşturulan hücrelere boş lipozomlar, TGF- β 3 LP, miR-132 LPX ve TGF- β 3 LP+ miR-132 LPX uygulanmıştır. Uygulama sonrasında deney gruplarındaki gen ekspresyonu RT-qPCR ile analiz edilmiş ve takiben protein düzeyleri ELISA ile belirlenmiştir.

3.5.2. Dermal Fibroblast Hücrelerinden RNA İzolasyonu

Primer kültür hücrelerinin 24 saatlik uyarmı süreleri bittiği zaman, besiyerleri toplandıktan sonra hücreler lizis tamponu ile kazınmış ve Hybrid-R RNA İzolasyon Kit (GeneAll, Güney Kore) kullanılarak, üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.5.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Tek zincirli cDNA sentezi 1 μ g total RNA'dan SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen by Life Technologies, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlem Superscript II üreticisinin yönergeleri doğrultusunda, son hacim 20 μ L olacak şekilde, steril mikrosantrifüj tüpü içerisindeki total RNA üzerine 3 μ g/mL random primer ve 1 μ L deoksinükleotid fosfat (dNTP) karışımı (her birinden 10 mM olacak şekilde) eklenerek 65°C'de 5 dakika ısıtılarak buz üzerine alınmıştır. Üzerine 5X First-Strand tamponu, 0,1 M ditiyotritol (DTT) ve 40 U/ μ L RNaseOUT eklenerek 25 °C'de 2 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra karışıma 1 μ L (200 U) SuperScript II RT eklenmiş ve 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 50 dakika ve 70°C'de 15 dakika döngüsü

kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Örneklerde kontaminasyon olmadığı, SuperScript II kullanılmadan hazırlanmış negatif kontrol örnekleri ile doğrulanmıştır.

3.5.4. RT-qPCR Analizi

TGF- β 1 ile veya formülasyonlarla uyarım sürelerinin bitiminde, fare fibroblastlarında COL1A1, COL3A1, MMP13, MMP9, mKi67, RASA1 ve CXCL1 gen ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. RT-qPCR analizlerinden elde edilen eşik döngüsü (Ct) değerleri, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) referans genine göre normalize edilmiş ve bağıl gen ekspresyonları $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

RT-qPCR analizleri 96 kuyucuklu plakalarda SYBR Green PCR Master Mix kullanılarak ABI ViiA™ 7 (Applied Biosystems) sekans deteksiyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon reaksiyonları (25 μ l), 1:5 oranında seyreltilmiş 5 μ L cDNA örneği varlığında üçlü kontrol sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primer çiftleri Tablo 3.2’de verilmiştir. Her deneyde araştırılan genin değeri, referans genin (housekeeping gene, GAPDH) değerine oranlanarak normalize edilmiştir.

Tablo 3.2. *in vitro* çalışmalarda RT-qPCR analizlerinde kullanılan olan primer dizileri (F: İleri primerin sekansı, R: Revers primerin sekansı).

	Gen	Sekans (5'...3')	Tm (°C)
Referans gen	GAPDH	F: TGTTCCTACCCCCAATGTGT	58,55
		R: ATTGTCATACCAGAAATGAGCTT	58,49
Proliferatif Faz	Kolajen Tip I α 1 zinciri	F: CCTCAGGGTATTGCTGGACAAC	60,94
	COL1A1	R: CAGAAGGACCTTGTTTGCCAGG	61,65
	Kolajen Tip III	F: GACCAAAAGGTGATGCTGGACAG	61,92
	COL3A1	R: CAAGACCTCGTGCTCCAGTTAG	60,67

	Ki67	F: GAGGAGAAACGCCAACCAAGAG	61,44
	Mki67	R: TTTGTCCTCGGTGGCGTTATCC	62,87
	Kolajenaz -3	F: GATGACCTGTCTGAGGAAGACC	59,83
	MMP13	R: GCATTTCTCGGAGCCTGTCAAC	62,07
	Jelatinaz B	F: GCTGACTACGATAAGGACGGCA	62,15
	MMP9	R: TAGTGGTGCAGGCAGAGTAGGA	62,56
İnflamatuvar Faz	Cxcl1	F: TCCAGAGCTTGAAGGTGTTGCC	63,03
	CXCL1	R: AACCAAGGGAGCTTCAGGGTCA	63,59
Pro- anjyogenez	RAS p21 protein aktivatörü 1	F: GCAAAACCCAGTATGGTCAGAGG	61,43
	RASA1	R: CCTGCTCAACTGGCAACGCATA	63,69

3.5.5. ELISA

TGF- β 1 ile veya formülasyonlarla uyarım sürelerinin bitiminde, hücrelerin besiyerleri toplanmış ve bu besiyerlerinde ekspresyonlarının değişmesi ya da sabit kalması beklenen COL1A1, COL3A1, Mki67, MMP13, MMP9, RASA1 protein düzeyleri ELISA kitleri ile tayini, üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Protein konsantrasyonlarını normalize edilmesi amacıyla, numunelerdeki toplam protein miktarı, üreticinin talimatlarına uygun olarak bir BCA kiti kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5.6. Transwell Hücre Migrasyon Testi

L929 hücrelerinin migrasyonu, gözenekli membran insertleri içeren 6 kuyucuklu plakalarda Transwell hücre migrasyon testi ile değerlendirilmiştir. Kısaca,

L929 hücreleri %80–90 konfluense ulaşınca kadar kültüre edilmiş ve deney öncesinde 24 saat boyunca serumsuz besiyerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler serumsuz DMEM içerisinde süspanse edilmiş ve her bir Transwell insertinin üst kısmına toplam 2×10^5 hücre ekilmiştir (135). Hücrelere TGF- β 3 LP ve/veya miR-132 LPX uygulanmıştır. Kemotaktik gradyanın oluşturulması amacıyla alt hazneye %10 FBS içeren 2 mL DMEM eklenmiştir (135). Plakalar, hücre göçünün gerçekleşmesi için 37 °C’de %5 CO₂ ile nemlendirilmiş atmosferde 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, membranın üst yüzeyindeki göç etmemiş hücreler pamuk uçlu aplikatör yardımıyla nazikçe uzaklaştırılmıştır (135). Membranın bazal tarafındaki göç etmiş hücreler %4 paraformaldehit (PFA) içinde 15 dakika sabitlenmiş ve ardından %0,1 kristal violet çözeltisinde 20 dakika boyunca boyanmıştır (135). Aşırı boyayı uzaklaştırmak amacıyla PBS ile yıkamanın ardından membranlar kurumaya bırakılmıştır.

Migrasyon gösteren hücreler, ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir. Her membran için rastgele seçilen beş farklı görüş alanının 10× büyütmede görüntüsü alınmış ve göç eden hücreler sayılmıştır. Sonuçlar, görüş alanı başına düşen ortalama göç eden hücre sayısı $\pm$ SS olarak ifade edilmiştir.

3.6. Kitosan Hidrojel Dispersiyonlarının Hazırlanması

Hidrojel formülasyonlarının hazırlanmasında yaklaşık 272 kDa molekül ağırlığına ve yaklaşık %86 deasetilasyon derecesine sahip orta molekül ağırlıklı kitosan kullanılmıştır (136-139). Literatürde, laktik asidin yüksek ıslanabilirlik, uygun viskozite ve hızlı jelleşme özellikleri nedeniyle kitosan hidrojel formülasyonlarının hazırlanmasında diğer organik asitlere kıyasla daha üstün olduğu bildirilmiştir (67, 140-142). Bu doğrultuda, laktik asit konsantrasyonu %1–8 (a/h) aralığında değerlendirilmiş ve formülasyon optimizasyonu kapsamında kitosan konsantrasyonu da %1–8 (a/h) aralığında incelenmiştir. Elde edilen hidrojel dispersiyonlarının reolojik özellikleri ve 3B biyobaskıya uygunluğu değerlendirilmiştir (67, 140). Giriş bölümünde açıklandığı üzere (33), UV ile çapraz bağlanmanın sağlanması amacıyla fotobaşlatıcı olarak RF kullanılmıştır.

Kitosan hidrojel dispersiyonları, hassas terazide tartılan kitosanın %1–8 (a/h) laktik asit çözeltisi içerisinde disperse edilmesiyle hazırlanmıştır. Karışım, kitosan

tamamen disperse olana kadar oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Almanya) kullanılarak karıştırılmıştır (27, 143, 144). RF çözeltisi, %50 etanol içerisinde 98,3 μ M konsantrasyonda hazırlanmıştır. RF çözeltisi kitosan hidrojel dispersiyonuna 1/10 (h/h) oranında eklenmiştir. Karanlıkta homojenize edilmiştir (33).

Optimum lipozom veya lipopleks formülasyonları, hidrojel dispersiyonlarına toplam hidrojel ağırlığının %10–20'si (a/a) oranında ilave edilmiş ve homojen bir dağılım sağlanıncaya kadar karıştırılmıştır (122, 145). Hidrojel dispersiyonları baskı cihazındaki şırıngaya dökülmeden önce 10 dk 3000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

3.6.1. Reolojik Karakterizasyon

Hidrojel dispersiyonlarının reolojik özellikleri, paralel plaka geometrisine sahip rotasyonel bir reometre (ARES Reometre, TA Instruments, ABD) kullanılarak, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı (ODTÜ MERLAB, Ankara, Türkiye) bünyesinde hizmet alımı yoluyla değerlendirilmiştir. Kayma hızı 0,01–1000 s^{-1} aralığında değiştirilmiştir. Gerinim taraması analizleri %0,01–100 gerinim aralığında, frekans taraması analizleri ise 1–100 rad/s açısal frekans aralığında gerçekleştirilmiştir. Analizler, Farklı polimer konsantrasyonlarına (%2–7 (a/h)) sahip kitosan–RF hidrojel dispersiyonlarının viskozite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Tüm analizler üç bağımsız tekrar halinde yapılmış ve sonuçlar ortalama $\pm$ SS olarak sunulmuştur (146, 147).

Lipozom/lipopleks taşıyıcı sistemlerinin kitosan hidrojel dispersiyonlarına ilavesinin reolojik özellikleri etkileyebileceği bildirilmiştir (122). Bu nedenle, optimize edilen formülasyonlar olan %7 (a/h) kitosan hidrojel dispersiyonu ile lipozom/lipopleks yüklü %8 (a/h) kitosan hidrojel dispersiyonunun viskozite, gerinim taraması ve frekans taraması analizleri gerçekleştirilmiş; elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

3.6.2. Hidrojel İskelelerin 3B Biyobaskı Optimizasyon Çalışmaları

Hazırlanan hidrojel dispersiyonlarından Axo A1 3B Biyobaskı Sistemi (Axolotl Biosystems, Türkiye) kullanılarak ekstrüzyon tabanlı biyobaskı yöntemi ile

3B hidrojel iskeleleri üretilmiştir. Hidrojel dispersiyonları, hava basıncı kontrollü ekstrüzyon sistemine ait baskı şırıngalarına yüklenmiş ve üretici tarafından sağlanan biyobaskı kitleri kullanılarak basılmıştır (148, 149). Biyobaskı sürecinde iğne ucu çapı, ekstrüzyon basıncı ve baskı hızı gibi temel işlem parametreleri sistematik olarak optimize edilmiştir. Bu optimizasyon sonucunda, homojen katman birikimi gösteren ve iyi tanımlanmış ağ yapısına sahip hidrojel iskeleleri elde edilmiştir.

İğne ucu optimizasyonu, hidrojel dispersiyonlarının farklı çaplara sahip 14G–25G iğneler kullanılarak uygun basınç koşullarında ekstrüde edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Baskı hızının etkisi ise, belirlenen optimum iğne ucu ve basınç koşulları altında $15\text{--}25\text{ mm.s}^{-1}$ aralığında değerlendirilmiştir (31, 148, 150). Hidrojel iskeleleri, ardışık katmanların birbirine 90° açı yapacak şekilde yerleştirildiği dört katmanlı dikdörtgen yapılar ($2 \times 4\text{ cm}^2$) olarak tasarlanmıştır (151).

Filament oluşumu ve baskı doğruluğu, sürekli ve doğrusal filament ekstrüzyonunun doğrulanması amacıyla görsel olarak değerlendirilmiştir. Filament sürekliliği ve kopma eğilimi, hidrojel dispersiyonunun baskı yüzeyinden 10 cm yükseklikten dikey olarak ekstrüde edilmesiyle incelenmiştir (149).

Tek katmanlı doğrusal filamentlerin basılmasının ardından filament yayılması ve çap homojenliği değerlendirilmiştir. Filament çapı, elde edilen görüntüler üzerinden farklı noktalarda ölçülmüş veya filamentler arasındaki mesafeye dayalı olarak dolaylı şekilde hesaplanmıştır. Yayılma oranı, ölçülen filament çapının iğnenin iç çapına oranlanmasıyla belirlenmiştir (149).

Ekstrüde edilen filamentlerin yerçekimi altında şekil kararlılığı, filament çökme (filament collapse) testi ile değerlendirilmiştir. Bu yöntemde filamentler, aralarında giderek artan boşluklar bulunan destekler üzerine ekstrüde edilmiş ve oluşan çökme açısı (θ) ölçülmüştür (149).

Yerçekimine bağlı deformasyonun yanı sıra, zamana bağlı akış ve yüzey geriliminin etkisiyle bitişik filamentler arasında oluşabilecek filament füzyonu da değerlendirilmiştir. Bu amaçla, optimize edilen baskı parametreleri kullanılarak ardışık katmanları 90° yönelimli dört katmanlı hidrojel iskeleleri üretilmiştir. Baskı sonrasında teorik iskele yüksekliğinin deneysel olarak ölçülen iskele yüksekliğine oranı hesaplanmıştır. Bu oranın 1,0 değerine yaklaşması, katmanlar arasındaki

filament füzyonunun minimum düzeyde olduğunu ve baskı doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir (149).

3.7. Hidrojel İskelelerin Karakterizasyonu

3.7.1. pH Değerlerinin Belirlenmesi

Hidrojellerin pH'sının belirlenmesi için 1'er g kitosan hidrojel tartılmış ve 20'şer mL saf su içinde çözülmüştür. Dispersiyonlar 2 saat saklanmıştır. Hidrojellerin pH'ı, pH metrenin elektrotu (Orion Star Series, Thermo Scientific, ABD) hidrojel ile temas ettirilerek ölçülmüştür (27).

3.7.2. FTIR Analizi

Hidrojel formülasyonlarının kimyasal yapı analizi, Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrometresi (Shimadzu IRTracer™-100, Japonya) kullanılarak, ODTÜ MERLAB (Ankara, Türkiye) bünyesinde hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlardan alınan örnekler bir gece etüvde kurutulduktan sonra havanda dövülerek toz haline getirilmiştir. Boş hidrojel dispersiyonu, lipozom/lipopleks yüklü hidrojel dispersiyonu ve UV ile çapraz bağlanmış hidrojel iskelesinin ana fosfolipid bölgelerinin titreşim frekansları, 400–4000 cm⁻¹ dalga sayı aralığında yorumlanmıştır (152).

3.7.3. Termal Analiz

Termal analizler Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Q100 aparatı (TA Instruments, ABD) kullanılarak, ODTÜ MERLAB (Ankara, Türkiye) bünyesinde hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Hidrojel dispersiyonlarından alınan numuneler, alüminyum standart DSC kaplarına tartılmış (5-10 mg) ve kapatılmıştır. Tüm numuneler, nitrojen atmosferinde 10 °C/dk'lık bir ısıtma hızında (akış hızı 50 mL/dk) 25 ila 350 °C arasında ısıtılmıştır (143).

3.7.4. Şişme, Degradasyon ve Mekanik Dayanım Testi

Hidrojel sıvı alım kapasitesini değerlendirmek için yapılan şişme testleri, pH 7,4 ve 37°C sıcaklıkta PBS içinde yapılmıştır. Kurutulmuş hidrojel iskeleler tartılıp 2

mL PBS (pH 7,0) içeren şişelere yerleştirilmiştir. Şişeler kapatılıp 37° C'de bir inkübatörde bekletilmiştir. Hidrojeller, 15 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat olmak üzere farklı zaman aralıklarında tartılarak sıvı alım kapasiteleri belirlenmiştir (144, 153, 154). Şişme yüzdesini bulmak için Eşitlik 3.4. kullanılmıştır:

$$\text{Şişme \%} = (W - W_d) / W_d \times 100 \quad (3.4.)$$

W_d: Hidrojel iskenenin kuru ağırlığı

W: Hidrojel iskenenin ıslak ağırlığı

Degradasyon testinde, hidrojel iskeleler lizozim ilavesiyle pH 7,4 ve 37°C'de PBS içinde 24 saat çalkalayıcıda (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Almanya) bekletilmiştir. Sonunda hidrojeller liyofilize edildikten sonra kuru ağırlıkları tartılmış ve ilk ağırlıklarına göre degradasyon yüzdeleri belirlenmiştir.

Degradasyon yüzdesini bulmak için Eşitlik 3.5. kullanılmıştır:

$$\text{Degradasyon \%} = (W_0 - W_g) / W_0 \times 100 \quad (3.5.)$$

W_g: Hidrojel iskenenin kuru ağırlığı

W₀: Hidrojel iskenenin başlangıç ağırlığı

Hidrojel iskelelerin çekme dayanımı testinde evrensel test cihazı kullanılmıştır. Analizler, Labiotech (Ankara, Türkiye) bünyesinde hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Testten önce iskelelerin kalınlıkları dijital mikrometre ile ölçülerek cihaz yazılımına girilmiştir. Takiben iskelelerin her bir numunesinin üst ve alt kısımları cihazın ilgili bölümüne yatay olarak yerleştirilerek tek eksenli çekme testi yapılmıştır. Testler, 0,1–1000 N kapasiteli yük hücresi ve 5 mm.dk⁻¹ test hızı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (150, 155, 156). Testler 3 kez tekrarlanmıştır. Analizler TOBB ODTÜ MERLAB (Ankara, Türkiye) bünyesinde hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

3.7.5. Çok Katmanda Por Geometrisi Tayini

Boş ve lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelelerin morfolojik karakterizasyonu, Taramalı Elektron Mikroskobu (QUANTA 400F Field Emission SEM, FEI, ABD) kullanılarak, ODTÜ MERLAB (Ankara, Türkiye) bünyesinde

hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Buna göre 3B hidrojel iskelelerin 1., 2., 3. ve 4. Katmanlarında 20kV'da zaman bağlı SEM görüntüleme analizleri gerçekleştirilmiştir (157). Analiz öncesi hidrojel iskeleleri püskürtmeli kaplama cihazında 90 saniye altın ile kaplanmıştır (143).

3.8. Lipozom/Lipopleks Yüklü Hidrojel İskelelerdeki TGF- β 3 ve miR-132'nin *in vitro* Salım Çalışmaları

TGF- β 3 lipozom ve miR-132 lipopleks yüklü hidrojel iskelesinin (HS) *in vitro* etkin madde salımı incelenmiştir. Bu amaçla 4 g hidrojel iskelesi diyaliz membranına (MWCO 25 kDa) yerleştirilmiştir. Daha sonra “sink” koşulların sağlanması için diyaliz membran 50 mL fosfat tamponu içerisine (pH 7,4) yerleştirilmiştir. Ortam, 37°C ve 110 rpm'ye ayarlanmış bir çalkalamalı inkübatöre (SHEL LAB, Sheldon Manufacturing Inc., ABD) alınıp 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48 ve 72 saatlik zaman noktalarında 1 mL'ik örnek alınmış ve aynı miktarda taze tampon eklenmiştir. Numunelerdeki TGF- β 3 miktarı bir sandviç-ELISA kiti kullanılarak (67, 68) ve miR-132 miktarı ise Quant-It RiboGreen RNA kiti kullanılarak (117-119) belirlenmiştir. Formülasyonların *in vitro* salım profillerini elde etmek için numunelerdeki miR-132 ve TGF- β 3 miktarları kümülatif olarak toplanmıştır. Deneyler 3 tekrar üzerinden yapılmıştır (67, 158).

3.9. Lipozom/Lipopleks Yüklü Hidrojel İskelelerin *in vitro* Hücre Canlılık Testi

L929 hücre hattı üzerinde boş lipozom (LP) yüklü hidrojel iskelelerin (Boş LP-HS) ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX yüklü hidrojel iskelelerin (TGF- β 3 LP + miR-132 LPX -HS) sitotoksitesini belirlemek için MTT testi gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 4×10^4 – 6×10^4 hücre, DMEM besiyerinde 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğuna ekilmiştir (132). Boş LP-HS ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS, 37 °C'de 6 saat süreyle PBS (pH 7,4) tamponunda dağıtılmış, ardından plaka tasarımına uygun dozlarda hücrelere muamele edildikten sonra MTT testi Bölüm 3.4'te açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.10. *in vivo* Hayvan Deneyleri

Bu çalışma, hayvan araştırmalarına yönelik ARRIVE 2.0 kılavuzlarına uygun olarak tasarlanmış ve raporlanmıştır. Hayvan sayısı, 5 grup için kaynak eşitliği (resource equation) metoduna göre tek yönlü varyans analizi (ANOVA) tasarımında grup başına en az 5 olarak belirlenmiştir (159). Ek olarak, örneklem büyüklüğü $\alpha=0,05$, $1-\beta=0,90$ ve $f=0,8$ varsayımları altında G*Power kullanılarak hesaplanmış; toplam örneklem büyüklüğü 30 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan 30 hayvan için etik kurula yapılan başvuru, 18 Ekim 2022 tarihinde 639 numaralı belge (KOBAY DHL A.Ş. Yerel Kurulu) ile onaylanmıştır (Şekil 3.3.).




KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
BAŞVURU BİLGİLERİ	Protokol Numarası	639
	Protokol Adı	Kişiselleştirilmiş Tedaviye Yönelik 3 Boyutlu Yazıcı aracıyla Hazırlanan miR-132 ve TGF- β 3 Yüklü Lipopleks İçeren Dual Etiklil Kitosan Hidrojel İskeletlerinin Tedavi Etkinliğinin Yanık Yarasında Değerlendirilmesi: Bir <i>in vivo</i> Deneyel Çalışma
	Başvuru Tarihi	04.10.2022
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi
	Yardımcı Araştırmacılar	Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN Dr. Öğr. Üyesi İpek BAYSAL Ecz. Aysima SEZER Ecz. Ceren DURALOĞLU
KARAR BİLGİLERİ	Onay Numarası	639
	Onay Tarihi	18.10.2022
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı	35 adet, Erkek, C57BL/6 fare
	Onay Bilgileri	Proje amaç, gereke, yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş, çalışmanın gerçekeşmesinde etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.
KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ	Etik Kurul Başkanı A.Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL	e- imzalı
	Etik Kurul Başkan Yardımcısı Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Doç. Dr. M. Kuşat DERİCİ	e- imzalı
	Sorumlu Veteriner Hekim Orkun TARKUN	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Biyolog Fatma Nur İNÇEH	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Hekim Murat Okan HATİPOĞLU	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Biyolog Canan ÇAKIR ÇOBAN	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Zeynep AYDIN TARAKÇI	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Adil KİŞ	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Uzman Diğdem YÖYEN ERMİŞ	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Ali VAROL	e- imzalı

Etikimza Belge No : kolon2h06ud4ac80260c Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır

Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.
 Merkez Ofis : Uzun Çarşı Caddesi, 1308. Sokak No:6 (Odtü Teknokent) Yenimahalle - Ankara
 Şube Ofis : I.O.5.B 21.Cadde 520.Sokak No:2/2 Yenimahalle - Ankara
 Telefon : 0 (312) 394 70 94 | Faks : 0(312) 995 06 94
www.kobay.com.tr - [bilgi@kobay.com.tr](mailto: bilgi@kobay.com.tr)

Şekil 3.3. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen hayvan deneylerine ilişkin etik kurul onay belgesi.

Hayvanlar, ortalama ağırlığı 24-35 g olan 15 haftalık erkek C57BL/6 farelerden seçilmiştir. Her deney grubuna, tarafsız bir veteriner hekim tarafından rastgele altı hayvan dağıtılmıştır (160).

Yanık yara modeli oluşturulmadan önce, 50-100 mg/kg ketamin ve 5-10 mg.kg⁻¹ ksilazin intramüsküler uygulanarak farelere genel anestezi uygulanmıştır. Her fareye yanık modeli oluşturma işlemi öncesinde intraperitoneal bolus salin (%0,9 NaCl) 0,08 mL.g⁻¹ uygulanmıştır. Farenin sırtı tıraş edildikten sonra %70 (h/h)'lik alkolle dezenfekte edilmiştir.

Meeh formülüne göre, 3,8 cm²'lik bir alan, 28 g'lık bir fare için toplam vücut yüzey alanının yaklaşık %4,2'üne karşılık gelir. Tüm hayvanlarda yanık modelleri oluşturulmuştur (161, 162). Farelerde 3,8 cm²'lik bir yanık yarası oluşturmak için, 2,2 cm çapında bir pirinç metal şablon 100°C'ye ısıtılmıştır. Standart bir yanık yarası oluşturmak için sıcaklık bir termometre ile izlenmiştir. Isıtılmış pirinç şablonun farelerin sırt bölgesinde 8 saniye boyunca tutulmasıyla ikinci derece yanık modeli oluşturulmuştur (163, 164).

Yanık kontrol grubuna herhangi bir tedavi uygulanmamış olup bu grup pozitif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Deney gruplarında ise yanık bölgesine hidrojel iskeleleri uygulanmış, ardından yara bölgesi pansumanla kapatılarak hayvanlar kafeslerine alınmıştır (160-162). Hidrojel iskelelerinin yara bölgesinde stabilitesini sağlamak amacıyla yapışkan bant ve/veya cerrahi bant kullanılmıştır. Deney grupları Tablo 3.3'te sunulmuştur.

Tablo 3.3. *in vivo* deney grupları.

Grup	Tanım
Kontrol	<i>in vivo</i> yanık modeli (pozitif kontrol)
Boş LP-HS	<i>in vivo</i> yanık modeli + Boş LP yüklü hidrojel iskele
TGF-β3 LP-HS	<i>in vivo</i> yanık modeli + TGF-β3 LP yüklü hidrojel iskele

miR-132 LPX-HS	<i>in vivo</i> yanık modeli + miR-132 LPX yüklü hidrojel iskele
TGF-β3 LP + miR-132 LPX-HS	<i>in vivo</i> yanık modeli + TGF-β3 LP ve miR-132 LPX yüklü hidrojel iskele

in vivo çalışma süresince hayvanlarda yara kapanma yüzdesi düzenli olarak takip edilmiştir. Deney süresince uygun yara bakımı uygulanmış; yara bölgesinde kızarıklık, ödem ve enfeksiyon bulguları ile hayvanların genel sağlık durumu düzenli olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca tedavi süresince hayvanlar ağrı, yetersiz beslenme, hareketsizlik, dehidrasyon ve genel halsizlik açısından izlenmiştir. Hayvanlara su ve yem ad libitum olarak sağlanmıştır. Günlük yem ve su tüketimi takip edilmiş, ilk 72 saat boyunca günde iki kez ağrı değerlendirmesi yapılmış ve bu değerlendirmeler doğrultusunda gerekli görülen hayvanlara ek sıvı desteği uygulanmıştır.

Hayvanlar, görsel değerlendirme sonucunda yara kapanmasının yaklaşık %100'e ulaştığı belirlendikten sonra sakrifiye edilmiştir. Her gruptan altı hayvana ait yanık yara dokuları RT-qPCR, histolojik inceleme ve İHK analizler için toplanmıştır. RT-qPCR analizlerinde α-SMA, kolajen tip I, kolajen tip III, RASA1 ve IL-1α gen ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir.

3.10.1. Yara Kapanmasının Görsel Gözlemi

Tedavi sürecinin tamamlanmasının ardından yaraların dijital fotoğrafları çekilmiştir. Her fotoğraf, yaranın altına bir cetvel yerleştirilerek aynı pozisyonda çekilmiştir. Her bir hayvanın yanık yara alanı, ImageJ yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Yara kapanma yüzdesi, eşitlik 3.6. kullanılarak hesaplanmıştır (165).

$$\text{Yara kapanma (\%)} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100 \quad (3.6.)$$

A₀: Başlangıç yara yüzey alanı (cm²)

A_t: Gözlemlenen yara yüzey alanı (cm²)

3.10.2. Doku RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve RT-qPCR Analizi

Ekspresyon düzeyi analizleri için FFPE doku örneklerinden RNA izolasyonu, üretici firmanın talimatları doğrultusunda PureLink FFPE RNA İzolasyon Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

cDNA sentezi, Bölüm 3.5.4'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri doğrudan RT-qPCR analizlerinde kullanılmış veya daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20°C 'de saklanmıştır.

RT-qPCR analizleri, Bölüm 3.5.5'te açıklanan yöntem doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primer çiftleri Tablo 3.4'te verilmiştir. Hedef genlerin ekspresyon düzeyleri, referans geni olarak kullanılan GAPDH genine normalize edilerek değerlendirilmiştir.

Tablo 3.4. *in vivo* çalışmalarda RT-qPCR analizlerinde kullanılan olan primer dizileri (F: İleri primerin sekansı, R: Revers primerin sekansı).

	Gen	Sekans (5'...3')	Tm (°C)
Referans gen	GAPDH	F: TGTTCTACCCCAATGTGT	58,55
		R: ATTGTCATACCAGAAATGAGCTT	58,49
Proliferatif Faz	Kolajen Tip 1 α 1 zinciri	F: CCTCAGGGTATTGCTGGACAAC	60,94
	COL1A1	R: CAGAAGGACCTTGTTTGCCAGG	61,65
	Kolajen tip III	F: GACCAAAAGGTGATGCTGGACAG	61,92
	COL3A1	R: CAAGACCTCGTGCTCCAGTTAG	60,67
	IL-1 α	F: ACGGCTGAGTTTCAGTGAGACC	62,49

İnflamatuvar Faz	IL1A	R: CACTCTGGTAGGTGTAAGGTGC	60,35
Pro-anjiyogenez	RAS p21 protein aktivatörü 1	F: GCAAAACCCAGTATGGTCAGAGG	61,43
	RASA1	R: CCTGCTCAACTGGCAACGCATA	63,69
Fibroblast Farklılaşması	α -SMA	F: TGCTGACAGAGGCACCACTGAA	64,11
	ACTA2	R: CAGTTGTACGTCCAGAGGCATAG	60,74

3.10.3. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler

Histolojik ve İHK analizler için dokular, ilk olarak 20 mL %10'luk formalin çözeltisine konulmuş, gerekli transport sağlandıktan ve 24 saat beklendikten sonra dehidrate edilmiş, parafin uygulanmış ve numunelerden 4 μ m kesitler alınmıştır. Histolojik ve İHK değerlendirmeler, tedavi gruplarına ilişkin bilgiye körlenmiş bir patoloji asistanı ile bir öğretim üyesi patoloji uzmanı tarafından, önceden tanımlanmış objektif yarı kantitatif değerlendirme kriterleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değerlendirmeler tüm örneklerle aynı kriterler doğrultusunda tutarlı bir şekilde uygulanmıştır. Puanlamalar arasında görüş ayrılığı olması durumunda preparatlar birlikte yeniden değerlendirilmiş ve ortak bir karara varılarak nihai skor belirlenmiştir. Bu yaklaşım, gözlemci kaynaklı yanlılığı ve gözlemciler arası değişkenliği en aza indirmek amacıyla uygulanmıştır.

Histolojik analiz için, preparatlar hematoksilin-eozin (H&E) ile boyandıktan sonra skorumla kriterleri ile değerlendirilmiştir (166, 167). Her preparata 1 ila 12 arasında değişen bir histolojik puan verilmiştir. 1–3 arası, fibroblast birikimi yok veya granülasyon dokusu yok veya epitel migrasyonu yok; 4–6 arası, az sayıda fibroblast, kılcal damar veya kolajen birikimine sahip, inflamatuvar hücrelerin baskın olduğu ince ve olgunlaşmamış granülasyon, düşük miktarda epitel migrasyonu; 7–9 arası, orta derecede kalın granülasyon dokusu, baskın inflamatuvar hücreler, daha fazla fibroblast

ve kolajen birikimi, yaygın neovaskülarizasyon ve minimal ila orta derecede epitel migrasyonu; 10–12 arası, fibroblastların baskın olduğu kalın, vasküler granülasyon dokusu ve yaygın kolajen birikimi ve yarayı kısmen veya tamamen kaplayan epitel doku varlığı; şeklinde skorelama yapılmıştır (166, 167).

İHK analizler için kesitler deparafinize ve rehidratize edildikten sonra İHK yöntemine Ultra Vision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU) (TP-125-HP, Thermo Fisher Scientific, ABD) kiti kullanılarak devam edilmiş ve üretici firmanın yönergesi uygulanmıştır. Kesitler, uygun dilüsyonlarda hazırlanmış COL1A2 (E-AB-10155), COL3A1 (E-AB-22071), RASA1 (bs-13281R), IL-1 α (E-AB-10391) ve α -SMA (E-AB-81457) primer antikorları ile +4°C'de bir gece inkübe edilmiştir. DAB substratı içeren kromojen DAB (TA-125-HD, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) ile gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandıktan sonra zemin boyası olarak Mayer'in Hematoksilen'i (TA-125-MH, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) kullanılmıştır. DAB ile boyanan lamalar azalan alkol serilerinden geçirilmiştir. Ardından kesitler 20 dakika ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatılan kesitlerin İHK analizler için görüntülemesi, DM 4000B (Leica, Mannheim, Almanya) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda ve LAS V4.9 (Leica, Mannheim, Almanya) programında gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarına ait doku kesitlerinde Tip I ve Tip III kolajen, α -SMA, IL-1 α , RASA1 skorlaması Tablo 3.5'e göre yapılmıştır.

Tablo 3.5. İHK analizlerde kullanılan belirteçlerin skorelama kriterleri.

Belirteç	Ana hedef biyolojik süreç	Değerlendirilen kompartman	Değerlendirme kriteri	Skorelama yaklaşımı	Yoruma esas ana nokta
α -SMA	Miyofibroblast aktivasyonu / fibrozis	Stroma (damar duvarı hariç)	Stromal SMA+ hücrelerin yaygınlığı	Yaygınlık (1-az, 2-orta, 3-yaygın)	Damar düz kası internal kontrol kabul edilerek stromal ekspresyon esas alınmıştır.

COL1A2	Olgun kolajen (skar matriksi)	ECM	Lif yoğunluğu ve organizasyonu	Düşük (1)/ Orta(2) / Yüksek(3)	Kalın, paralel lifler skar paterni lehine değerlendirilmiştir.
COL3A1	Erken / yeniden düzenlenen matriks	ECM	Lif dağılımı ve düzeni	Düşük(1) / Orta(2) / Yüksek(3)	İnce ve dağınık lif paterni rejeneratif iyileşme lehine yorumlanmıştır.
RASA1	Anjiyogenez ilişkili sinyal	Endotel stroma +	Hücrel lokalizasyon paterni	Endotel ağırlıklı (1) / Diffüz stromal(2)/ Yaygın (3)	Boyanma yoğunluğundan çok hücre tipi ve dağılım dikkate alınmıştır.
IL1A	İnflamasyon	Epidermis ve inflamatuvar hücreler	Ekspresyon paterni	Odaksal (1)/ Yamasal (2)/ Yaygın (3)	Diffüz zemin boyanmasından ziyade inflamatuvar hücre kümeleri esas alınmıştır.

3.11. İstatistiksel Analiz

in vitro ve *in vivo* deneylerdeki sonuçlar Ortalama $\pm$ SS olarak raporlanmıştır. Tüm deneyler en az üç bağımsız tekrarda gerçekleştirilmiştir. Formülasyonları karakterize etmek için (partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli sonuçlarını karşılaştırmak amacıyla) tek yönlü ANOVA kullanılmıştır. Deney grupları, Student t-testi, tek yönlü ANOVA ve iki yönlü tekrarlanan ölçümler (RM) ANOVA testleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Histoloji ve İHK sonuçları için Kruskal–Wallis ve Dunn testleri yapılmıştır. P değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Hesaplamalar için GraphPad Prism® ver.5 yazılımı (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Lipozom/Lipopleks Formülasyonlarının Karakterizasyonu

4.1.1. Partikül Büyüklüğü/Dağılımı ve Zeta Potansiyel Analizi

Boş lipozom formülasyonlarının (27 formülasyon) ortalama partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyelinin 3 tekrarlı ölçüm sonuçları Tablo 4.1’de yer almaktadır. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (ort. $\pm$ SS) şeklinde sunulmuştur.

Tablo 4.1. Formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli sonuçları (ort. $\pm$ SS).

Formülasyon No.	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm) Y1	PDI Y2	Zeta Potansiyeli (mV), Y3
F1	247,5 $\pm$ 22,69	0,343 $\pm$ 0,036	39,9 $\pm$ 1,67
F2	148,3 $\pm$ 8,215	0,365 $\pm$ 0,1	42,6 $\pm$ 2,29
F3	84,47 $\pm$ 6,25	0,371 $\pm$ 0,05	40,6 $\pm$ 0,643
F4	152,3 $\pm$ 0,93	0,27 $\pm$ 0,012	42,7 $\pm$ 0,8
F5	92,51 $\pm$ 8,565	0,252 $\pm$ 0,019	38,4 $\pm$ 1,08
F6	199,0 $\pm$ 9,258	0,259 $\pm$ 0,019	38,3 $\pm$ 3,19
F7	208,4 $\pm$ 13,63	0,335 $\pm$ 0,024	49,7 $\pm$ 3,06
F8	169,6 $\pm$ 2,892	0,265 $\pm$ 0,02	41,2 $\pm$ 3,67
F9	119,5 $\pm$ 4,24	0,396 $\pm$ 0,011	16,5 $\pm$ 0,551
F10	176 $\pm$ 30,51	0,307 $\pm$ 0,018	38,6 $\pm$ 2,31
F11	154,1 $\pm$ 1,587	0,296 $\pm$ 0,011	37,6 $\pm$ 1,45

F12	144,6 ± 22,57	0,386 ± 0,137	31,2 ± 1,37
F13	119,5 ± 2,39	0,361 ± 0,025	39,4 ± 0,351
F14	103,5 ± 0,9238	0,313 ± 0,023	39,8 ± 0,361
F15	182,7 ± 16,58	0,284 ± 0,051	38,5 ± 1,55
F16	133,7 ± 3,585	0,525 ± 0,051	45 ± 3,81
F17	156,3 ± 2,779	0,289 ± 0,014	38,8 ± 2,54
F18	110,7 ± 1,908	0,306 ± 0,015	35,3 ± 1,16
F19	128,7 ± 1,735	0,393 ± 0,004	43,2 ± 1,85
F20	229,3 ± 44,12	0,383 ± 0,096	42,30 ± 2,73
F21	124,5 ± 26,31	0,327 ± 0,051	35,8 ± 2,63
F22	99,63 ± 0,458	0,233 ± 0,007	39,8 ± 0,896
F23	138,4 ± 5,354	0,362 ± 0,058	38,6 ± 2,51
F24	160,2 ± 8,637	0,249 ± 0,02	14,5 ± 0,643
F25	98,72 ± 6,336	0,541 ± 0,107	39 ± 8,48
F26	164,8 ± 23,94	0,306 ± 0,018	38,5 ± 8,81
F27	127 ± 6,684	0,248 ± 0,042	23,2 ± 3,41

F2, F4, F5, F8 ve F22 formülasyonları hedeflenen aralıkta partikül büyüklüğü (100-200 nm), zeta potansiyeli (>40 mV) ve PDI (<0,3) değerine sahip formülasyonlar olduğu için üretimleri tekrar edilmiştir. F26 formülasyonun partikül büyüklüğü istenen aralıktadır, ancak 200 nm'ye çok yakın (186,1 nm) olması nedeniyle etkin madde yüklendikten sonra partikül büyüklüğünün istenen aralığın dışına çıkma riski göz önüne alınarak çıkarılmıştır. F1, F3, F14 ve F19 formülasyonları ortalama partikül büyüklüğü 150 nm'nin altında ve zeta potansiyeli yaklaşık 40 mV olduğu için bu

formülasyonların 0,3'ten büyük olan PDI değerlerinin üretim hatasından kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi için üretimleri tekrar edilmiştir.

Formülasyonların 2. Üretim sonrası ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyelinin 3 tekrarlı ölçüm sonuçları Tablo 4.2'de sunulmuştur (ort. $\pm$ SS).

Tablo 4.2. 2. Üretim sonrası formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli sonuçları (ort. $\pm$ SS).

Formülasyon No.	Ortalama Partikül Büyükülüğü (nm) Y1	PDI Y2	Zeta Potansiyeli (mV), Y3
F1	153,9 $\pm$ 4,285	0,24 $\pm$ 0,032	31,1 $\pm$ 5,35
F2	127,9 $\pm$ 0,8544	0,396 $\pm$ 0,399	18,8 $\pm$ 5,8
F3	110,8 $\pm$ 9,251	0,537 $\pm$ 0,104	31,7 $\pm$ 1,88
F4	103,4 $\pm$ 2,479	0,25 $\pm$ 0,008	31,6 $\pm$ 1,02
F5	132,2 $\pm$ 2,722	0,319 $\pm$ 0,04	39,8 $\pm$ 0,67
F8	159,3 $\pm$ 68,19	0,313 $\pm$ 0,06	44,4 $\pm$ 8,61
F19	110,0 $\pm$ 3,564	0,424 $\pm$ 0,011	41,2 $\pm$ 2,78
F22	133,7 $\pm$ 1,401	0,269 $\pm$ 0,024	40,7 $\pm$ 1,88

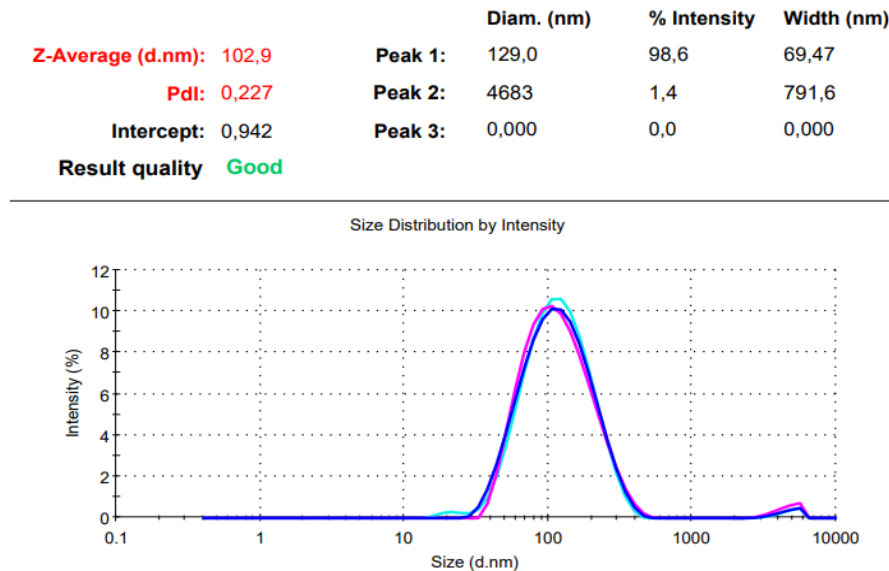
Bu sonuçlar doğrultusunda, üçüncü üretimde kullanılmak üzere F5 ve F22 formülasyonları seçilmiştir. F5 formülasyonu, uygun partikül büyüklüğü ve 0,319 $\pm$ 0,04 PDI değeri; F22 formülasyonu ise uygun partikül büyüklüğü ve PDI değerinin yanı sıra 40,7 $\pm$ 1,88 mV zeta potansiyeli dikkate alınarak belirlenmiştir. Formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeline ilişkin üç tekrarlı ölçüm sonuçları Tablo 4.3'te sunulmuştur (ort. $\pm$ SS).

Tablo 4.3. 3. Üretim sonrası formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli sonuçları (ort. $\pm$ SS).

Formülasyon No.	Ortalama Partikül Büyükliği (nm) Y1	PDI Y2	Zeta Potansiyeli (mV), Y3
F5	102,8 ± 0,33	0,221 ± 0,005	31,2 ± 0,57
F22	96,59 ± 3,48	0,154 ± 0,003	38,4 ± 2,02

F5 ve F22 formülasyonlarının 3. üretiminin karakterizasyon sonuçlarında, F5'in ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerinin istenen aralıkta olduğu, ancak zeta potansiyelinin 31 mV olduğu bulunmuştur. Optimum partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeline sahip olduğu için F22 formülasyonu ileri dönemdeki çalışmalar için seçilmiştir.

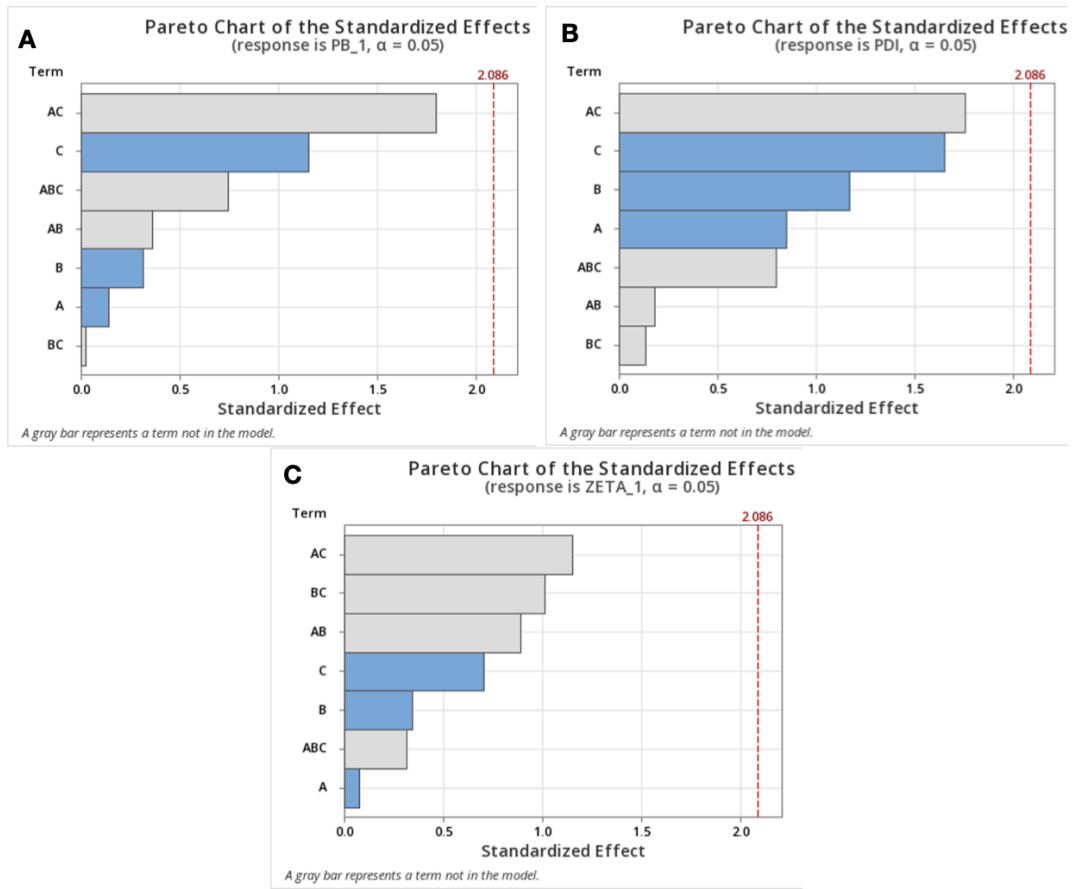
Optimum formülasyon F22'nin 5 üretiminden elde edilen ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları (ort. ± SS) sırasıyla şu şekildedir: 102,9 ± 13,43 nm, 0,227 ± 0,049 ve 37,38 ± 2,29 mV. Optimum formülasyon F22'nin 5. üretiminden elde edilen karakterizasyon sonuçları Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Optimum formülasyonun (F22) ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değeri.

Tüm formülasyonların istatistiksel değerlendirmesi, 3³ faktöriyel deneysel tasarım kapsamında Minitab® yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DOTMA, DOPC ve CHOL'ün molar oranlarının ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta

potansiyeli üzerindeki etkileri, ANOVA varyans analizi kullanılarak incelenmiştir. Model, ana etkileri (doğrusal), iki yönlü etkileşimleri ve üç yönlü etkileşimleri içerecek şekilde tanımlanmıştır. Etkilerin anlamlılığı, katsayı tabloları ve Pareto etki grafikleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli için Pareto etki grafikleri Şekil 4.2.'de sunulmuştur. Pareto etki grafiklerindeki kırmızı kesikli çizgi (2.086), istatistiksel anlamlılık eşliğini ($\alpha = 0,05$) temsil etmektedir.



Şekil 4.2. Standartlaştırılmış etkilerin pareto grafiği. **A)** Ortalama Partikül Büyüklüğü. **B)** PDI. **C)** Zeta Potansiyeli. (A: DOTMA, B: DOPC, C: CHOL, AB: DOTMA-DOPC etkileşimi, BC: DOPC-CHOL etkileşimi, AC: DOTMA-CHOL etkileşimi, ABC: DOTMA-DOPC-CHOL üçlü etkileşimi).

Ortalama partikül büyüklüğü için Standartlaştırılmış Etkilerin Pareto grafiği incelendiğinde (Şekil 4.2.A), en baskın etkinin DOTMA-CHOL ikili etkileşimi olduğu görülmektedir. CHOL faktörünün de ortalama partikül büyüklüğü üzerinde anlamlı bir

ana etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir, ancak bu etki DOTMA ile birlikte değerlendirildiğinde önemli ölçüde artmıştır.

ANOVA sonuçlarına göre, toplam açıklanan varyans (Adj SS) 44304,8 olarak hesaplanmıştır. Bu toplamın %15,5'inin ana etkilerden, %50,7'sinin ikili etkileşimlerden ve %33,8'inin üçlü etkileşimden kaynaklandığı belirlenmiştir. Ana etkiler arasında yanıt değişkenindeki varyasyona en yüksek katkıyı CHOL faktörü sağlamıştır (Adj SS = 5 351,4; %12,08). İkili etkileşimler arasında en yüksek katkı ise DOTMA $\times$ CHOL etkileşiminde gözlenmiştir (Adj SS = 17 708,2; %39,97). Bu bulgu, yanıt değişkenindeki değişimin önemli bir bölümünün DOTMA $\times$ CHOL etkileşimiyle ilişkili olduğunu göstermektedir.

Bu varyans dağılımı, ortalama partikül büyüklüğü yanıtının faktörlerin ana etkilerinin yanı sıra faktörler arası etkileşimler tarafından şekillendiğini göstermektedir. Üçlü etkileşimler incelendiğinde, DOTMA(6)–DOPC(1)–CHOL(10) kombinasyonunun regresyon katsayısı değeriyle ortalama partikül büyüklüğünü azaltıcı yönde güçlü bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu kombinasyonda gözlenen düşük ortalama partikül büyüklüğü, yalnızca CHOL'ün yüksek molar oranından değil, aynı zamanda DOTMA ve DOPC'nin CHOL ile oluşturduğu ikili ve üçlü etkileşimlerden de kaynaklanmaktadır. Üçlü etkileşimlerin toplam varyansın yaklaşık %33,8'ini açıklaması, uygun üçlü kombinasyonun seçilmesinin ortalama partikül büyüklüğü üzerinde kritik bir rol oynadığını göstermektedir.

DOTMA $\times$ CHOL ikili etkileşimine ve ilgili üçlü etkileşim terimine ait negatif katsayılar, söz konusu kombinasyonun ortalama partikül büyüklüğünü azaltma bakımından uygun olduğunu göstermiştir. Modelin sabit terimi (kesişim) yaklaşık 147 nm olarak hesaplanmıştır. Ortalama partikül büyüklüğüne ilişkin katsayı tablosunda varyans şişirme faktörü (VIF) değerlerinin 1,33 ile 2,37 arasında değiştiği görülmüştür. Bu değerler, modelde belirgin bir çoklu doğrusal bağlantı (multikolinearite) sorunu bulunmadığını göstermektedir. CHOL faktörünün yanıt üzerindeki etkisinin yüksek olduğu belirlenmiştir; CHOL'ün molar oranı 4 olduğunda partikül büyüklüğü artarken, molar oranın 10'a yükseltilmesiyle partikül büyüklüğünde belirgin bir azalma gözlenmiştir. DOPC'nin etkisi orta düzeyde, DOTMA'nın ana etkisi ise düşük düzeyde kalmıştır. Buna göre partikül büyüklüğünün

esas olarak CHOL faktörü ile DOTMA $\times$ CHOL etkileşimi tarafından belirlendiği, DOTMA ve DOPC'nin ana etkilerinin ise sınırlı olduğu değerlendirilmiştir. Ortalama partikül büyüklüğüne ilişkin yüksek katsayılı etkileşimler Tablo 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4.4. Ortalama partikül büyüklüğü için katsayı tablosundaki temel etkileşimlerin katsayıları.

Etkileşim	Katsayı
DOTMA6-DOPC1	+17,84
DOTMA6-CHOL10	-31,49
DOPC1-CHOL10	-1,739
DOTMA6-DOPC1-CHOL10	-20,76

DOTMA6–DOPC1 etkileşimi partikül büyüklüğünü artırırken, DOTMA6–CHOL10 etkileşimi ise önemli ölçüde azaltır. DOPC1–CHOL10 etkileşimi de partikül büyüklüğünün azalmasına katkıda bulunur. Ortalama partikül büyüklüğü için regresyon denklemi aşağıda verilmiştir

Ortalama partikül büyüklüğü

$$\begin{aligned}
 &= 147.18 + 5.8(\text{DOTMA}_6) - 3.0(\text{DOTMA}_9) - 2.8(\text{DOTMA}_{12}) \\
 &- 6.7(\text{DOPC}_1) - 1.7(\text{DOPC}_2) + 8.4(\text{DOPC}_3) + 16.9(\text{CHOL}_4) \\
 &+ 0.7(\text{CHOL}_7) - 17.6(\text{CHOL}_{10})
 \end{aligned}$$

Ortalama partikül büyüklüğü için regresyon denkleminde, pozitif katsayılar partikül büyüklüğünde artışı, negatif katsayılar ise azalmayı temsil eder. Ortalama partikül büyüklüğünü azaltan en etkili seviyeler sırasıyla CHOL10, DOPC1, DOPC2 ve DOTMA9–12 iken, artıran seviyeler ise CHOL4, DOPC3 ve DOTMA6'dır. DOTMA6–DOPC1–CHOL10 kombinasyonu için tahmini ortalama partikül büyüklüğü yaklaşık 92,5 nm'dir. Bu değer, CHOL10'un negatif ana etkisine ek olarak DOTMA6-CHOL10 ve DOTMA6-DOPC1-CHOL10 etkileşimlerinin negatif katkılarıyla açıklanmaktadır.

PDI için Standartlaştırılmış Etkilerin Pareto Grafiği (Şekil 4.2.B) incelendiğinde, en baskın etkinin DOTMA-CHOL ikili etkileşiminde olduğu görülmektedir. Ana etkiler değerlendirildiğinde, CHOL, DOPC ve DOTMA faktörlerinin PDI üzerinde orta düzeyde bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer ikili ve üçlü etkileşimlerin PDI yanıtı üzerindeki etkisinin zayıf olduğu bulunmuştur. Model sabiti yaklaşık 0,39 olarak hesaplanmıştır. PDI için katsayı tablosundaki 1,33 ile 2,37 arasında değişen VIF değerleri, modelde çoklu doğrusal bağlantı olmadığını göstermektedir. Ana faktörler arasında CHOL, PDI üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. CHOL molar oranı 4 olduğunda PDI'nin arttığı, 10 olduğunda ise azaldığı belirlenmiştir. DOPC'nin orta düzeyde bir etkisi varken, DOTMA'nın düşük bir etkisi vardır. Etkileşim terimleri incelendiğinde, DOTMA-CHOL etkileşiminin PDI'da baskın bir rol oynadığı, DOTMA-DOPC ve DOPC-CHOL etkileşimlerinin ise düşük ila orta düzeyde katkıda bulunduğu görülmektedir.

PDI regresyon denklemi aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{PDI} = & 0.3320 - 0.0197 (\text{DOTMA}_6) + 0.0254 (\text{DOTMA}_9) - 0.0057 (\text{DOTMA}_{12}) \\ & - 0.0237 (\text{DOPC}_1) - 0.0081 (\text{DOPC}_2) + 0.0319 (\text{DOPC}_3) \\ & + 0.0424 (\text{CHOL}_4) - 0.0176 (\text{CHOL}_7) - 0.0248 (\text{CHOL}_{10}) \end{aligned}$$

Denklemden pozitif katsayılar PDI'da artışı, negatif katsayılar ise PDI'da azalmayı temsil etmektedir. Buna göre, PDI'yı azaltan seviyeler CHOL 7-10, DOPC 1-2 ve DOTMA 6-12 olarak belirlenmiştir. PDI'yı artıran seviyeler ise etki büyüklüğü sırasına göre CHOL 4, DOPC 3 ve DOTMA 9'dur. CHOL 4 seviyesi PDI'yı artırırken, CHOL 7-10 ve düşük DOPC seviyeleri PDI'da azalma ile ilişkilidir. DOTMA'nın etkisi sınırlı olup seviyeye bağlıdır.

Zeta potansiyeli yanıtının istatistiksel değerlendirmesinde, ana etkiler düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki bulunmamıştır ($P > 0,05$). Zeta potansiyeli için standartlaştırılmış etkilerin Pareto grafiği (Şekil 4.2.C) incelendiğinde, en baskın etkinin DOTMA $\times$ CHOL ikili etkileşiminden kaynaklandığı görülmektedir. Bunu sırasıyla DOPC $\times$ CHOL ve DOTMA $\times$ DOPC etkileşimleri izlemektedir. Ana etkiler (DOTMA, DOPC ve CHOL) ayrı ayrı değerlendirildiğinde, zeta potansiyeli üzerinde düşük düzeyde etki gösterdikleri görülmektedir. Bu durum, zeta potansiyelinin

formülasyon bileşenleri arasındaki etkileşimlere daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

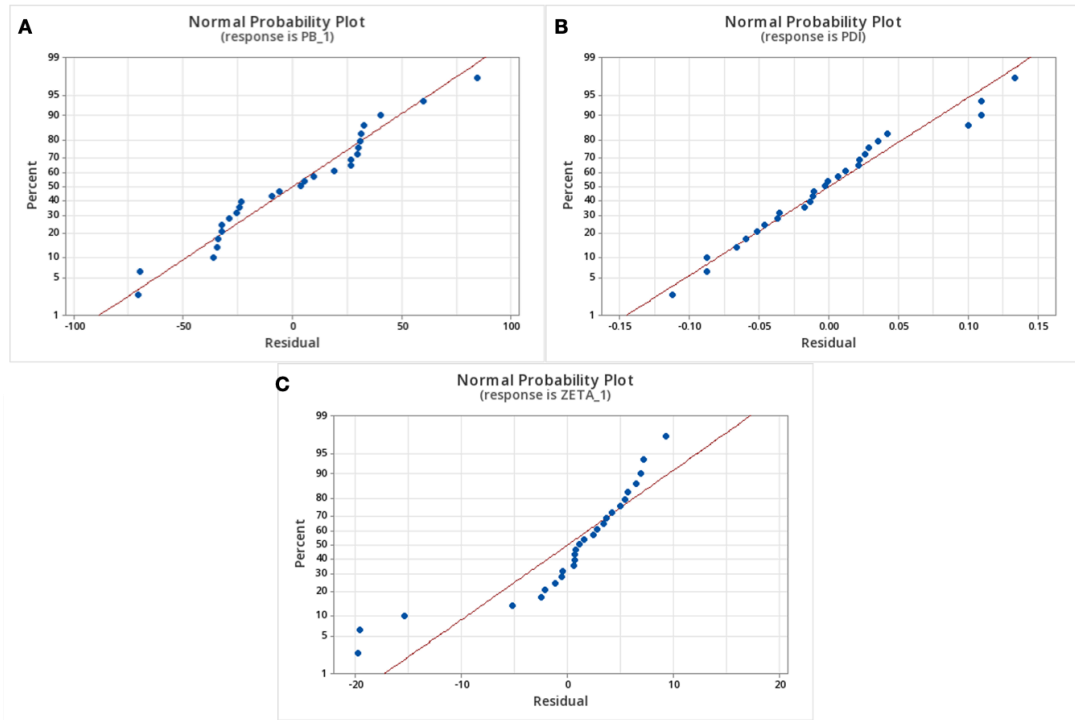
Zeta potansiyeli regresyon denklemi aşağıda verilmiştir.

Zeta Potansiyeli

$$= 37.46 + 0.94(\text{DOTMA}_6) - 0.72(\text{DOTMA}_9) - 0.22(\text{DOTMA}_{12}) \\ - 0.28(\text{DOPC}_1) - 1.39(\text{DOPC}_2) + 1.67(\text{DOPC}_3) + 2.61(\text{CHOL}_4) \\ - 0.77(\text{CHOL}_7) - 1.84(\text{CHOL}_{10})$$

Denklemden pozitif katsayılar zeta potansiyelinde artışı, negatif katsayılar ise azalmayı temsil etmektedir. Buna göre, zeta potansiyelini azaltan seviyeler öncelikle CHOL 10 ve DOPC 2'dir. Zeta potansiyelini artıran seviyeler ise etki büyüklüğü sırasına göre CHOL 4, DOPC 3 ve DOTMA 6'dır. Ana etkiler düzeyinde değerlendirildiğinde, zeta potansiyelinin en çok CHOL faktörü tarafından şekillendirildiği görülmektedir. Düşük CHOL oranının zeta potansiyelini artırdığı, yüksek CHOL oranının ise zeta potansiyelini azalttığı belirlenmiştir. Bu bulgular, zeta potansiyelinin formülasyondaki CHOL seviyesine ve bileşenler arası etkileşimlere duyarlı olduğunu göstermektedir.

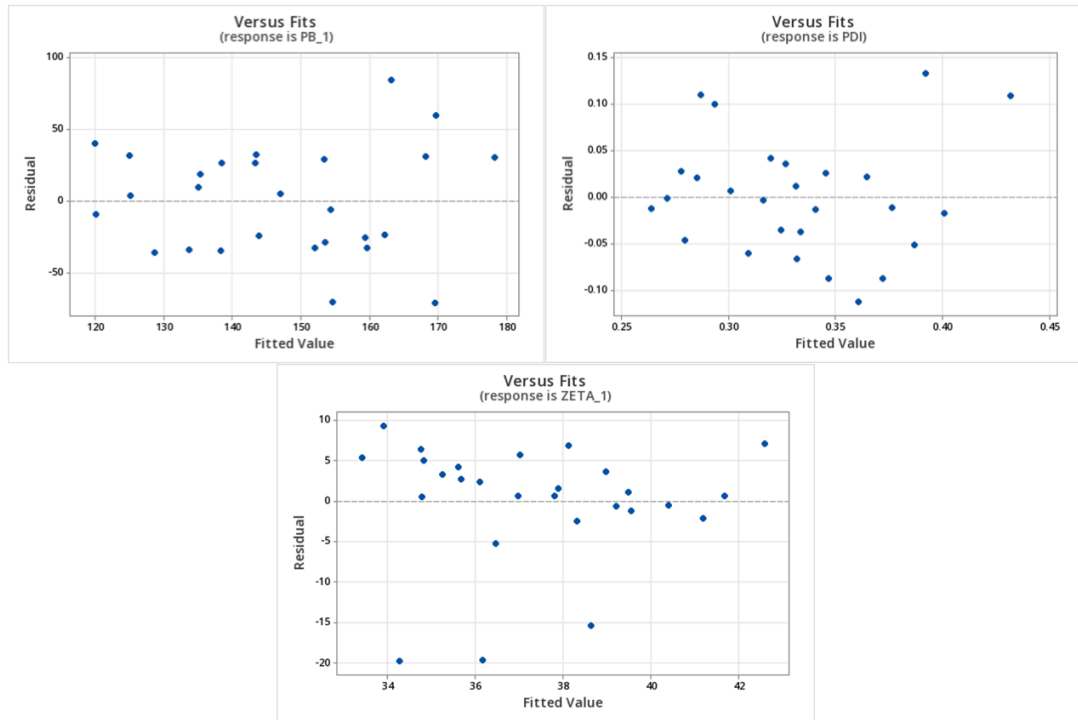
Modelin istatistiksel yeterliliğini ve uygunluğunu değerlendirmek amacıyla normal olasılık grafikleri ile artıklar-tahmin edilen değerler grafikleri oluşturulmuştur. Ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeline ait normal olasılık grafikleri Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Normal olasılık grafikleri. **A)** Ortalama partikül büyüklüğü. **B)** PDI. **C)** Zeta potansiyeli.

Artıkların yaklaşık doğrusal bir dağılım sergilemesi, model hatalarının normal dağılıma yakın olduğunu göstermektedir. Bu bulgu, Deney Tasarımı (DOE) modeli kapsamında uygulanan parametrik istatistiksel analizlerin geçerliliğini doğrulamakta ve elde edilen model sonuçlarının güvenilir bir şekilde yorumlanabileceğini ortaya koymaktadır.

Ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeline ilişkin artık-tahmin değerleri grafikleri Şekil 4.4.'te sunulmuştur.



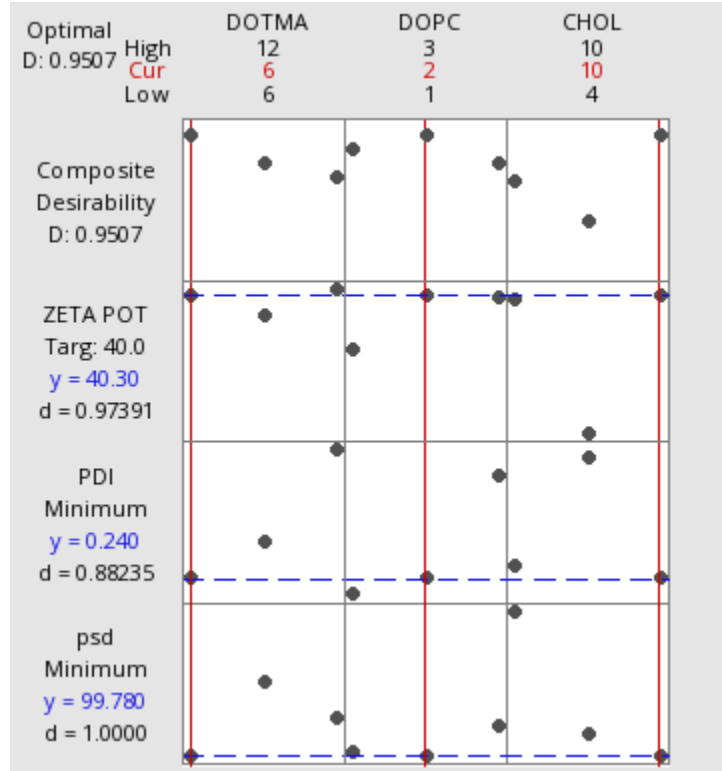
Şekil 4.4. Artıklar-tahmin edilen değerler grafikleri. **A)** Ortalama partikül büyüklüğü. **B)** PDI. **C)** Zeta potansiyeli.

Artıkların sıfır etrafında rastgele dağılması ve artıklar ile tahmin edilen değerler grafiklerinde belirgin bir örüntü gözlenmemesi, modelde sistematik bir hata bulunmadığını ve DOE modeli için sabit varyans (homoskedastisite) varsayımının sağlandığını göstermektedir. PDI yanıtına ilişkin artık analizleri, model varsayımlarının genel olarak karşılandığını ve regresyon modelinin PDI'daki değişkenliği yeterli düzeyde temsil ettiğini ortaya koymuştur.

Zeta potansiyeli yanıtına ilişkin artık analizleri genel olarak kabul edilebilir bulunmuştur. Bununla birlikte, özellikle düşük değerler bölgesinde gözlenen sapmalar ve aykırı değerler nedeniyle modelin açıklayıcılığının sınırlı olduğu değerlendirilmiştir. Bu durum, incelenen deneysel tasarım aralığında zeta potansiyelinin DOE faktörlerine görece zayıf bir yanıt verdiğini düşündürmektedir. Varyans analizi, F5 formülasyonunun minimum ortalama partikül büyüklüğü ile sonuçlanacağını öngörmüştür.

Optimum formülasyonu (F22) doğrulamak amacıyla Minitab® yazılımı kullanılarak tarama tasarımı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, F22 formülasyonunun (6:2:10) optimum formülasyon olduğunu doğrulamıştır. Optimum formülasyona ait uygunluk oranı Tablo 4.5'te gösterilmiştir. DOTMA, DOPC ve

CHOL bileşenlerine ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli yanıtları için çoklu yanıt optimizasyonu ve bileşik uygunluk grafiği Şekil 4.5.'te sunulmuştur.



Şekil 4.5. DOTMA, DOPC ve CHOL bileşenlerinin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli yanıtları için çoklu yanıt optimizasyonu ve bileşik uygunluk grafiği.

Tablo 4.5. Formülasyondaki optimal lipid oranları ve bileşimin hedeflenen parametreleri karşılama derecesi.

Parametreler		Minimum	Hedef	Maksimum	Ağırlık	Önem	
Zeta potansiyeli	Hedef	14	40,00	51,50	1	1	
PDI	Minimum		0,204	0,51	1	1	
Partikül Büyüklüğü	Minimum		99,780	255,90	1	1	
				Zeta Potansiyeli	PDI	Partikül Büyüklüğü	Bileşen Uygunluk
Çözüm	DOTMA	DOPC	CHOL	Fit	Fit	Fit	
	6	2	10	40.3	0.24	99.78	0.950723

Üretim üzerinde FRR etkisini belirlemek amacıyla seçilen optimum formülasyon farklı FRR değerlerinde üretilmiştir. Literatür doğrultusunda (112), TFR 2 mL/dk ve başlangıç FRR değeri su/etanol oranı 3:1 olacak şekilde belirlenmiş ve optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. F22 formülasyonu, FRR değerleri 4:1 ve 5:1 olacak şekilde yeniden üretilmiştir. F22 optimum formülasyonunun FRR 4:1 ve 5:1 koşullarında üretilmesiyle elde edilen sonuçlar, Tablo 4.6'da sunulmuştur (ort. $\pm$ SS).

Tablo 4.6. Farklı akış hızı oranlarında üretilmiş F22 formülasyonunun ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları (ort. $\pm$ SS).

FRR	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
3:1	109,5 $\pm$ 13,43	0,237 $\pm$ 0,049	37,38 $\pm$ 2,29
4:1	133,2 $\pm$ 22,17	0,328 $\pm$ 0,055	40,83 $\pm$ 2,1
5:1	167,4 $\pm$ 8,42	0,297 $\pm$ 0,032	25,7 $\pm$ 2,65

Bu sonuçlar, F22 formülasyonunun üretimi için optimum FRR'nin 3:1 olduğunu doğrulamıştır.

TGF- β 3 LP formülasyonlarının 0,5, 1 ve 2 μ g/mL derişimlerdeki ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları (ort. $\pm$ SS) Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7. TGF- β 3 LP formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları (ort. $\pm$ SS).

TGF- β 3 Derişimi (μ g/mL)	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
0.5	108,1 $\pm$ 7	0,201 $\pm$ 0,047	34,65 $\pm$ 1,85
1	109,9 $\pm$ 14,36	0,318 $\pm$ 0,027	49,9 $\pm$ 1,1
2	101,1 $\pm$ 4,23	0,248 $\pm$ 0,022	36,5 $\pm$ 2,49

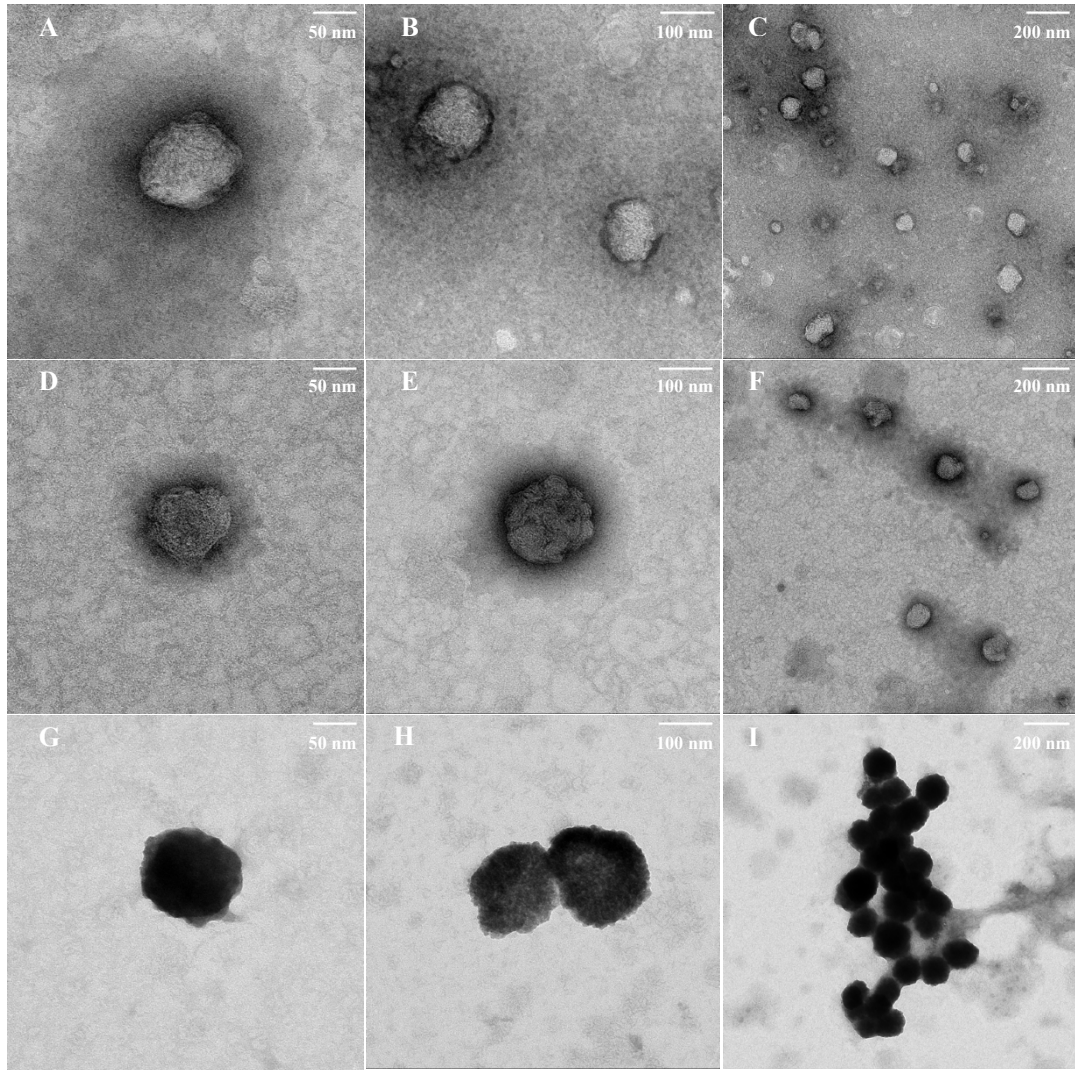
miR-132 LPX başlangıçta 1 mg/25 µg lipid/miR oranında hazırlanmıştır. Daha sonra EE'yi (%) artırmak için, literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak en yüksek verimliliği sağlayan N/P 4 oranı (101), yükleme oranı olarak denenmiştir. miR-132 LPX formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları Tablo 4.8'de (ort. $\pm$ SS) gösterilmiştir.

Tablo 4.8. miR-132 LPX formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları (ort. $\pm$ SS).

miRNA Dozu	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
Lipid/miR 1 mg/25 µg	143,1 $\pm$ 9	0,279 $\pm$ 0,003	33,7 $\pm$ 1,6
N/P 4	97,6 $\pm$ 5,1	0,211 $\pm$ 0,03	33,16 $\pm$ 2,87

4.1.2. Morfoloji ve Yüzey Özellikleri Analizi

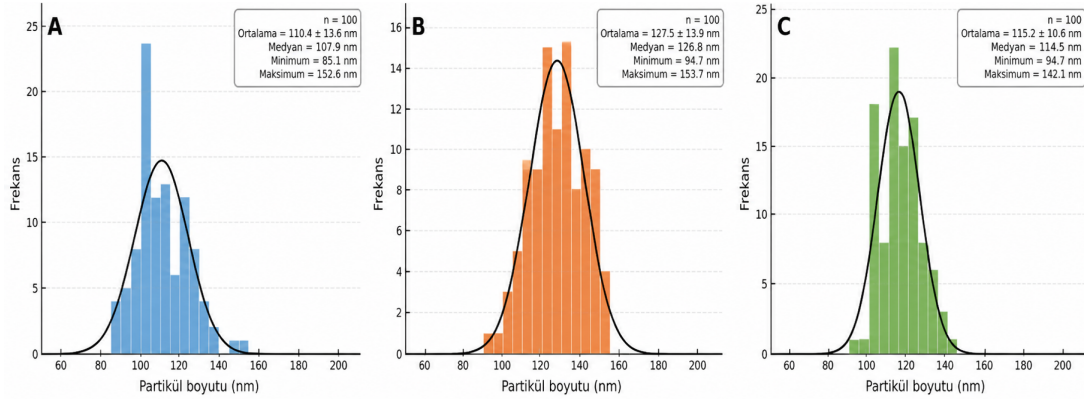
Formülasyonların (boş lipozomlar, TGF- β 3 LP ve miR-132 LPX) TEM sonuçları Şekil 4.6.'da gösterilmiştir. Boş lipozomların, TGF- β 3 LP'nin ve miR-132 LPX'in TEM görüntülerinin yaklaşık 100 nm büyüklüğünde olduğu ve miR-132'nin lipozom ile başarılı bir şekilde kompleks oluşturduğu doğrulanmıştır.



Şekil 4.6. Lipozom/lipopleks formülasyonlarının TEM görüntüleri. **A-B-C)** Boş Lipozom. **D-E-F)** TGF- β 3 LP. **G-H-I)** miR-132 LPX. A-D-G) 50 nm ölçek, B-E-H) 100 nm ölçek, C-F-I) 200 nm ölçek.

Her bir formülasyon için toplam 100 partikülün büyüklüğü ImageJ yazılımı kullanılarak ölçülmüştür. Boş lipozomların ortalama partikül büyüklüğü $106,0 \pm 32,7$ nm olarak belirlenmiş; medyan partikül büyüklüğü 105,5 nm, partikül büyüklüğü aralığı ise 55,4–198,7 nm olarak hesaplanmıştır. TGF- β 3 LP formülasyonunun ortalama partikül büyüklüğü $123,4 \pm 32,2$ nm, medyan partikül büyüklüğü 117,4 nm ve partikül büyüklüğü aralığı 74,4–208,6 nm olarak bulunmuştur. miR-132 LPX formülasyonunun ise ortalama partikül büyüklüğü $112,9 \pm 30,7$ nm, medyan partikül büyüklüğü 107,2 nm ve partikül büyüklüğü aralığı 58,0–199,6 nm olarak

belirlenmiştir. Üç formülasyona ait partikül büyüklüğü dağılımları Şekil 4.7.'de sunulmuştur.



Şekil 4.7. Lipozomal formülasyonların TEM analizi ile partikül büyüklüğü dağılımı. **A)** Boş LP (Ortalama = 110,4 ± 13,6 nm, n = 100), **B)** TGF-β3 LP (Ortalama = 127,3 ± 13,9 nm, n = 100), **C)** miR-132- LPX (Ortalama = 115,2 ± 10,8 nm, n = 100). Eşdeğer çap, ImageJ kullanılarak TEM mikrograflarından hesaplanmıştır. Siyah eğriler, partikül büyüklüğü dağılımının Gauss dağılımına uyumunu temsil etmektedir.

TEM görüntülerinin (n=100) nicel analizi, DLS tabanlı partikül büyüklüğü analizini doğrulamıştır. TEM ve DLS ölçümleri arasındaki korelasyon, formülasyonların monodispers olduğunu ve kompleksleşme süreci boyunca yapısal özelliklerini koruduğunu göstermiştir.

4.1.3. TGF-β3 LP ve miR-132 LPX Formülasyonlarının EE (%)

Değerleri

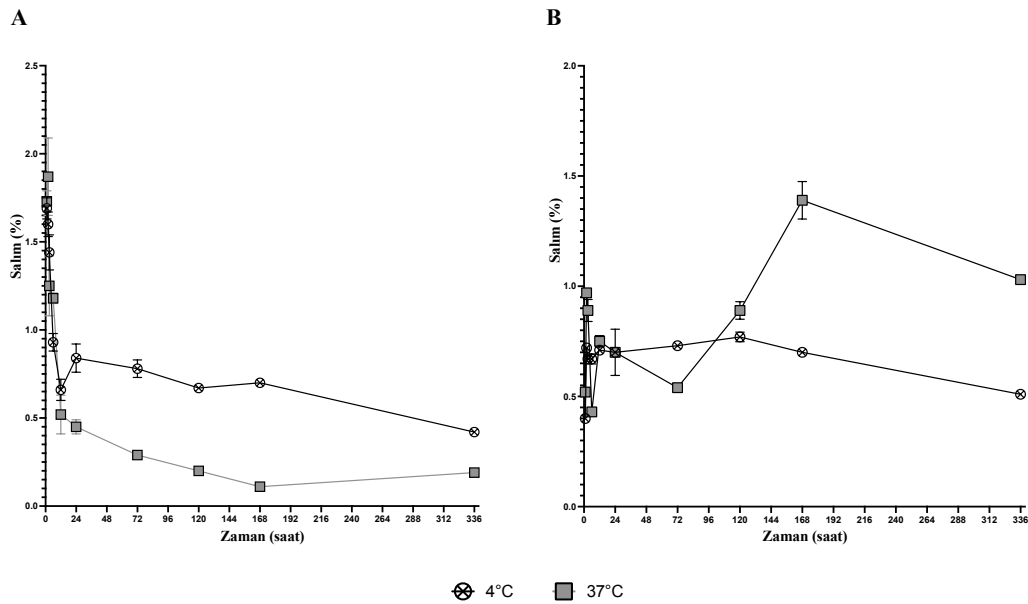
TGF-β3, 0,5, 1 ve 2 µg/mL derişimlerinde lipozomlara yüklenmiş ve bu derişimlerde elde edilen EE (%) değerleri sırasıyla %57,6±3,78, %53,3±0,14 ve %50,69±0,87 olarak hesaplanmıştır. Buna karşılık, LD (%) değerleri sırasıyla %0,013±0,0007, %0,024±0,0004 ve %0,046±0,0006 olarak belirlenmiştir. Artan TGF-β3 derişimiyle birlikte EE (%) değerinin azaldığı görülmüştür. En yüksek EE (%) değeri 0,5 µg/mL TGF-β3 derişiminde elde edildiğinden, sonraki çalışmalar için TGF-β3 derişimi 0,5 µg/mL olarak seçilmiştir.

miR-132 için lipid/miRNA kütle oranı 1 mg/25 µg olarak belirlendiğinde, lipoplekslerin EE (%) değeri %95,52 ve LD (%) değeri %2,28±0,07 olarak hesaplanmıştır. Literatürde, miR-132 lipopleksleri için EE (%) değerlerinin %100'e

yakın olduğu bildirilmiştir (101). Bu doğrultuda, EE (%) değerini artırmak amacıyla miR-132 lipopleksleri N/P oranı 4 olacak şekilde hazırlanmıştır (101). Bu koşulda EE (%) değeri $99,29 \pm 0,021$, LD (%) değeri ise $0,180 \pm 0,003$ olarak belirlenmiştir. En yüksek EE (%) değeri N/P oranı 4'te elde edildiğinden, sonraki çalışmalar için miR-132 yükleme koşulu N/P oranı 4 olarak seçilmiştir.

4.2. Stabilité Çalışmaları

Saklama sırasındaki stabilite, sızıntı oranları belirlenerek değerlendirilmiştir. TGF- β 3 LP ve miR-132 LPX formülasyonları için termal stabilite ve sızıntı çalışmaları sonuçları Şekil 4.8.'de verilmiştir. Sonuçlar, 3 bağımsız deneyin ortalaması (ort. $\pm$ SS) olarak sunulmuştur.

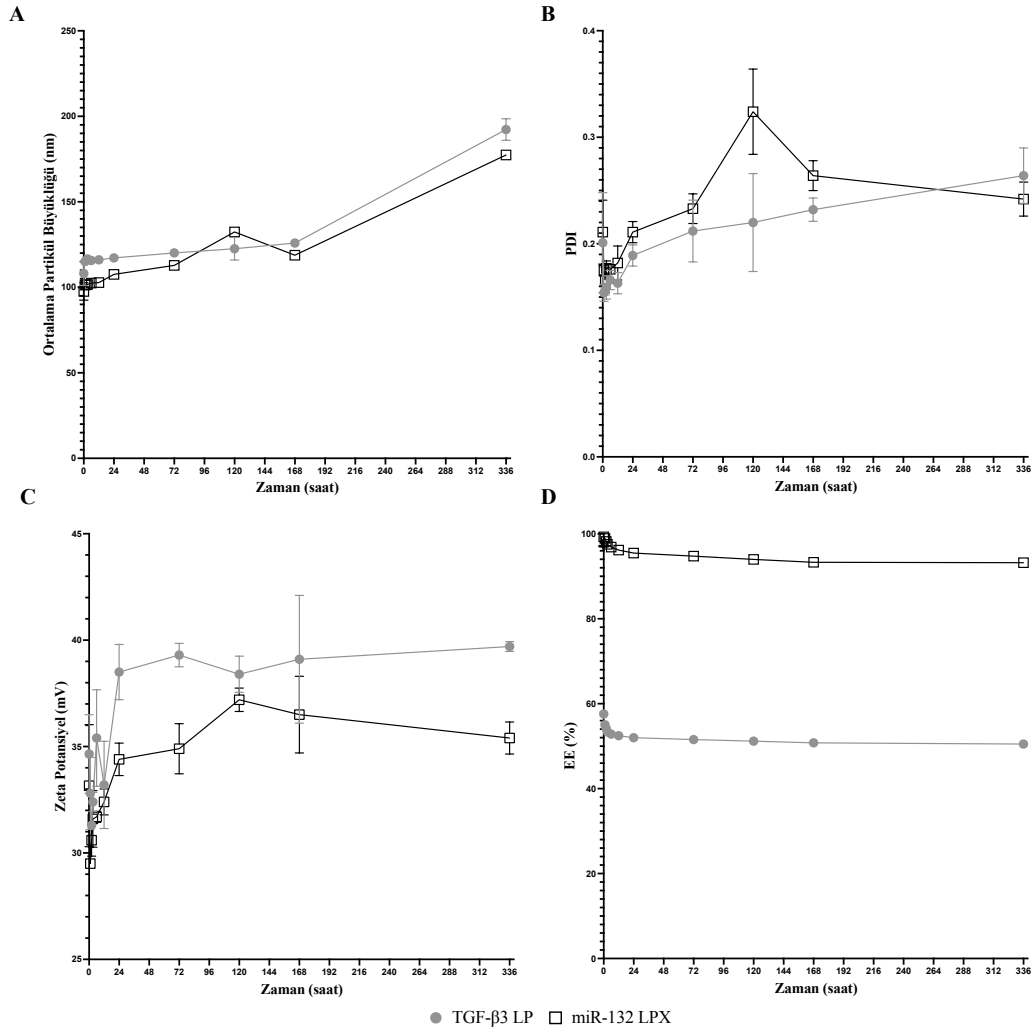


Şekil 4.8. Termal stabilite ve sızıntı çalışmaları sonuçları. **A)** TGF- β 3 LP ve **B)** miR-132 LPX (ort. $\pm$ SS).

Her iki formülasyonun 336 saat boyunca 4°C ve 37°C'deki sızıntı oranları, Şidák çoklu karşılaştırma testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. TGF- β 3 LP formülasyonunda kümülatif salım oranı 4°C'de $0,42 \pm 0,001$, 37 °C'de ise $0,19 \pm 0,002$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda TGF- β 3 LP formülasyonunun her iki sıcaklıkta da stabil olduğu değerlendirilmiştir. miR-132 LPX formülasyonunda ise kümülatif salım oranı 4°C'de $0,51 \pm 0,0001$, 37°C'de

$1,03 \pm 0,003$ olarak hesaplanmıştır. miR-132 LPX formülasyonunun da 4°C ve 37°C 'de stabil olduğu sonucuna varılmıştır.

Formülasyonların *in vitro* salım çalışması süresince, yani 336 saat boyunca, fiziksel stabilitelerini değerlendirmek amacıyla her iki formülasyonun stabilitesi 4°C 'de izlenmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. TGF-β3 LP ve miR-132 LPX'in 4°C 'de 336 saat boyunca zamana bağlı olarak **A)** ortalama partikül büyüklüğü, **B)** PDI, **C)** zeta potansiyeli ve **D)** EE (%) değerleri. Veriler ort. $\pm$ SS olarak sunulmuştur (n=3).

İstatistiksel analiz, her bir zaman noktasındaki değerlerin başlangıç değeriyle (0 saat) karşılaştırılması ve Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılmıştır. TGF-β3 LP formülasyonunun başlangıçtaki partikül büyüklüğü $108,1 \pm 2,1$

nm, PDI değeri ise $0,201 \pm 0,01$ olarak belirlenmiştir. Partikül büyüklüğünde, 336 saat boyunca istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiş ve partikül büyüklüğü son zaman noktasında $192,3 \pm 6,2$ nm'ye ulaşmıştır (Ortalama Fark = 84,2 nm, $P < 0,0001$). Bununla birlikte, PDI değeri çalışma süresince anlamlı değişiklik göstermemiş ve 336. saatte $0,264 \pm 0,02$ olarak belirlenmiştir ($P > 0,05$). Bu bulgu ortalama partikül büyüklüğündeki artışa rağmen formülasyonun homojenliğini koruduğunu göstermektedir. Zeta potansiyeli pozitifliğini korumuş ve $34,6 \pm 2,5$ mV'den $39,7 \pm 0,3$ mV'ye hafif bir artış göstermiştir (Ortalama Fark = 5,05 mV, $P < 0,05$). Bu sonuç, elektrostatik itme yoluyla kolloidal stabilitenin korunduğunu düşündürmektedir. TGF- $\beta 3$ için EE (%) değeri, $57,6 \pm 2,5$ 'ten $50,5 \pm 0,4$ 'e düşmüştür. Bu azalma istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,001$). Bununla birlikte, bu sonuç TGF- $\beta 3$ yükünün büyük bölümünün 14 günlük çalışma süresi boyunca lipozomlar içerisinde korunduğunu göstermektedir.

miR-132 LPX formülasyonunun başlangıçtaki partikül büyüklüğü $97,6 \pm 2,3$ nm, PDI değeri ise $0,211 \pm 0,02$ olarak belirlenmiştir. TGF- $\beta 3$ LP formülasyonuna benzer şekilde, partikül büyüklüğünde kademeli bir artış gözlenmiş ve partikül büyüklüğü 336. saatte $177,4 \pm 5,8$ nm'ye ulaşmıştır (Ortalama Fark = 79,8 nm, $P < 0,0001$). PDI değerinde hiçbir zaman noktasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiş ve bu değer 336. saatte $0,242 \pm 0,03$ olarak ölçülmüştür. Bu bulgu partikül popülasyonunun homojenliğini koruduğunu göstermektedir. Zeta potansiyeli pozitifliğini korumuş ve çalışma süresince istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. 336. saatte zeta potansiyeli $35,4 \pm 0,8$ mV olarak belirlenmiştir ($P > 0,05$). Özellikle, miR-132 LPX formülasyonunun EE (%) değeri, TGF- $\beta 3$ LP formülasyonuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. miR-132 LPX'in başlangıçtaki EE (%) değeri $99,2 \pm 0,5$ iken, bu değer 336. saatte $93,2 \pm 0,3$ 'e düşmüştür (Ortalama Fark = $6,09$, $P < 0,0001$). Bu sonuç, nükleik asitlerin katyonik lipid çift tabakasıyla güçlü bir şekilde kompleksleştiğini göstermektedir.

4.3. Lipozom Formülasyonlarının Saflaştırılması

Liyofilizasyondan sonra %3-25 (a/h) trehaloz veya sükroz içeren formülasyonların partikül büyüklüğü ve PDI değerleri Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Liyofilizasyondan sonra %3-25 (a/h) trehaloz veya süktroz içeren lipozom formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değeri (ort. $\pm$ SS).

Kriyoprotektan	Trehaloz		Süktroz	
Derişim (a/h)	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI
%3	245,8 $\pm$ 10,85	0,454 $\pm$ 0,005	441,7 $\pm$ 29,35	0,504 $\pm$ 0,087
%5	224,8 $\pm$ 47,03	0,476 $\pm$ 0,092	201 $\pm$ 12,71	0,505 $\pm$ 0,034
%7,5	288,2 $\pm$ 14,45	0,457 $\pm$ 0,089	271,2 $\pm$ 10,06	0,37 $\pm$ 0,047
%10	363,1 $\pm$ 8,32	0,57 $\pm$ 0,069	162,1 $\pm$ 6,37	0,355 $\pm$ 0,015
%15	271 $\pm$ 3,67	0,464 $\pm$ 0,014	123,6 $\pm$ 0,46	0,317 $\pm$ 0,039
%20	684,6 $\pm$ 106,3	0,608 $\pm$ 0,045	140,8 $\pm$ 3,568	0,329 $\pm$ 0,01
%25	892,7 $\pm$ 114,2	0,866 $\pm$ 0,015	179,2 $\pm$ 6,864	0,48 $\pm$ 0,049

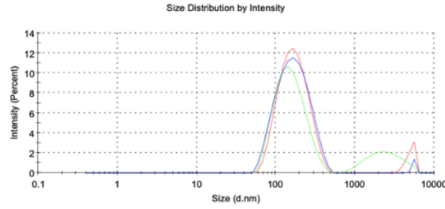
Optimizasyon sonuçlarına göre, lipozomların liyofilizasyonu için en uygun kriyoprotektan, minimum PDI ve partikül büyüklüğü değeri (ort. $\pm$ SS) olarak belirlenmiştir.

Liyofilizasyon sırasında lipozom stabilitesini korumak için yüksek süktroz derişimlerinin kullanılması, süktrozun uzaklaştırılması için uygulanan diyaliz adımları sırasında protein ve gen yüklü lipozom formülasyonlarının stabilitesini olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle, bu formülasyonların yapısal bütünlüğünü korumak için ultrasantrifüj ve ultrafiltrasyon gibi alternatif saflaştırma yöntemleri değerlendirilmiştir (127).

Ultrasantrifüjden sonra pelet içinde elde edilen lipozomların ortalama partikül büyüklüğü ve PDI sonuçları Tablo 4.10'da sunulmuştur. Ultrasantrifüjden sonra pelet içindeki lipozomların ortalama partikül büyüklüğü ve PDI sonuçları Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

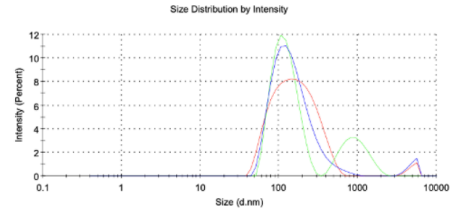
A

	Size (d.n.m)	% Intensity	St Dev (d.n.m)
Z-Average (d.n.m): 178,1	Peak 1: 178,2	93,6	73,60
Pdl: 0,350	Peak 2: 5012	6,4	603,2
Intercept: 0,812	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Refer to quality report			



B

	Size (d.n.m)	% Intensity	St Dev (d.n.m)
Z-Average (d.n.m): 140,8	Peak 1: 178,9	97,3	107,4
Pdl: 0,282	Peak 2: 4891	2,7	676,9
Intercept: 0,959	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



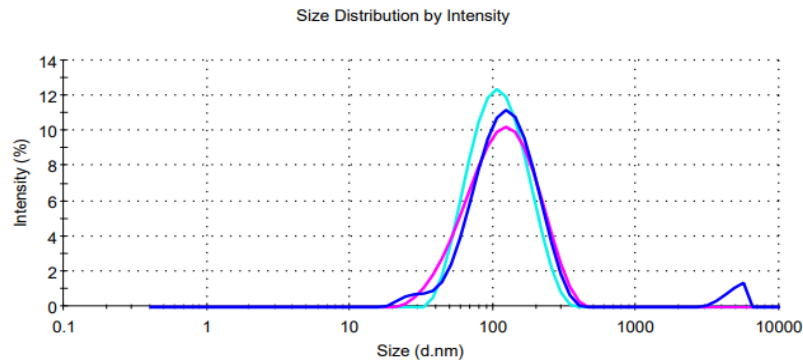
Şekil 4.10. Farklı koşullar altında ultrasantrifüjleme sonrası peletten elde edilen lipozomların ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerleri **A)** Seyreltme faktörü (SF) 100, 60 000 × g, 1 saat; **B)** SF 10, 30 000 × g, 2 saat.

Tablo 4.10. Ultrasantrifüjleme sonrasında peletten elde edilen lipozomların ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerleri (ort. ± SS).

	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI
60 000 x g, 1 saat	175,3 ± 4,592	0,346 ± 0,004
30 000 x g, 2 saat	137,5 ± 3,208	0,302 ± 0,024

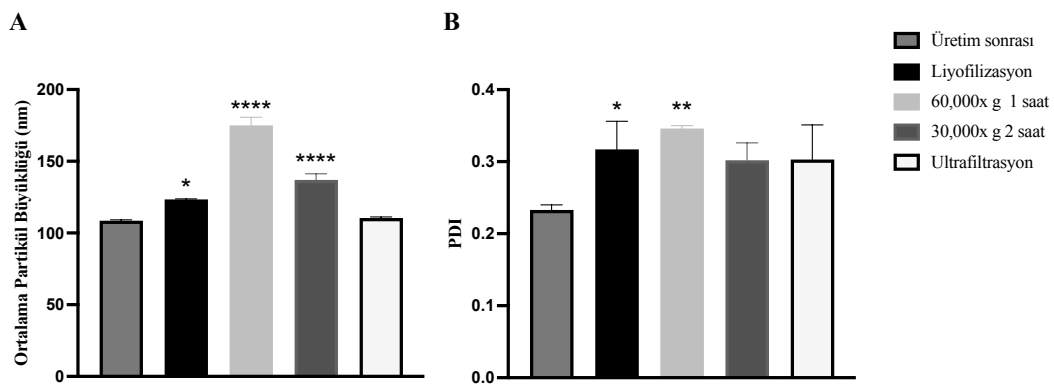
Ultrafiltrasyondan sonra lipozom dispersiyonunun ortalama partikül büyüklüğü ve PDI sonuçları sırasıyla 110,1 ± 5,97 nm ve 0,303 ± 0,048 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11.).

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.n.m): 110,1	Peak 1: 129,7	96,4	62,51
Pdl: 0,303	Peak 2: 4802	3,6	723,7
Intercept: 0,934	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Şekil 4.11. Ultrafiltrasyondan sonra lipozom dispersiyonunun ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerleri.

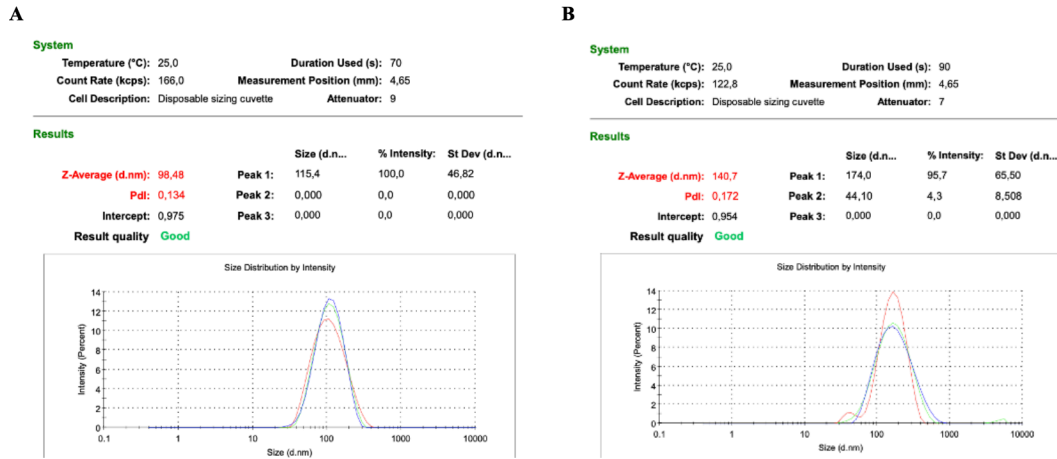
Üretim sonrasına kıyasla, %15 sükröz ile liyofilizasyon (*), 60 000 × g'de 1 saatlik ultrasantrifüj (****) ve 30 000 × g'de 2 saatlik ultrasantrifüj (***) sonrasında ortalama partikül büyüklüğünde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Buna karşılık, ultrafiltrasyon yöntemiyle saflaştırılan lipozomların ortalama partikül büyüklüğünde üretim sonrasına göre istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.12.A).



Şekil 4.12. Üretim sonrası ve saflaştırma sonrasında elde edilen **A)** ortalama partikül büyüklüğü ve **B)** PDI değerlerinin karşılaştırması. İstatistiksel anlamlılık, her bir koşulun üretim sonrası elde edilen değerlerle karşılaştırılmasıyla, tek yönlü ANOVA ve ardından Dunnett testi kullanılarak belirlenmiştir. (* $P<0,05$, *** $P<0,001$, **** $P<0,0001$). Veriler ortalama $\pm$ SS ($n=3$) olarak sunulmuştur.

Sükröz (%15 (a/h)) ile liyofilizasyon (*) ve 60 000×g'de 1 saatlik ultra santrifüjleme (**) sonrasında PDI değerlerinde üretim sonrasına kıyasla anlamlı artış gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, 30 000×g'de 2 saatlik ultrasantrifüjleme ve ultrafiltrasyon sonrası elde edilen PDI, üretim sonrasına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.12.B).

Ultrasantrifüj sonrasında süpernatantın DLS analizi, her iki koşulda da süpernatant içerisinde artık partiküllerin bulunduğunu doğrulamıştır. Z-ortalama partikül büyüklüğü 30 000 × g ve 60 000 × g koşulları için sırasıyla 140,7 nm ve 98,48 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13.). Bu sonuç, partiküllerin tamamen pellete dönüşmediğini göstermektedir. Ayrıca, daha yüksek santrifüj kuvvetinin süpernatanttan daha büyük partiküllerin uzaklaştırılmasını sağladığı görülmüştür.

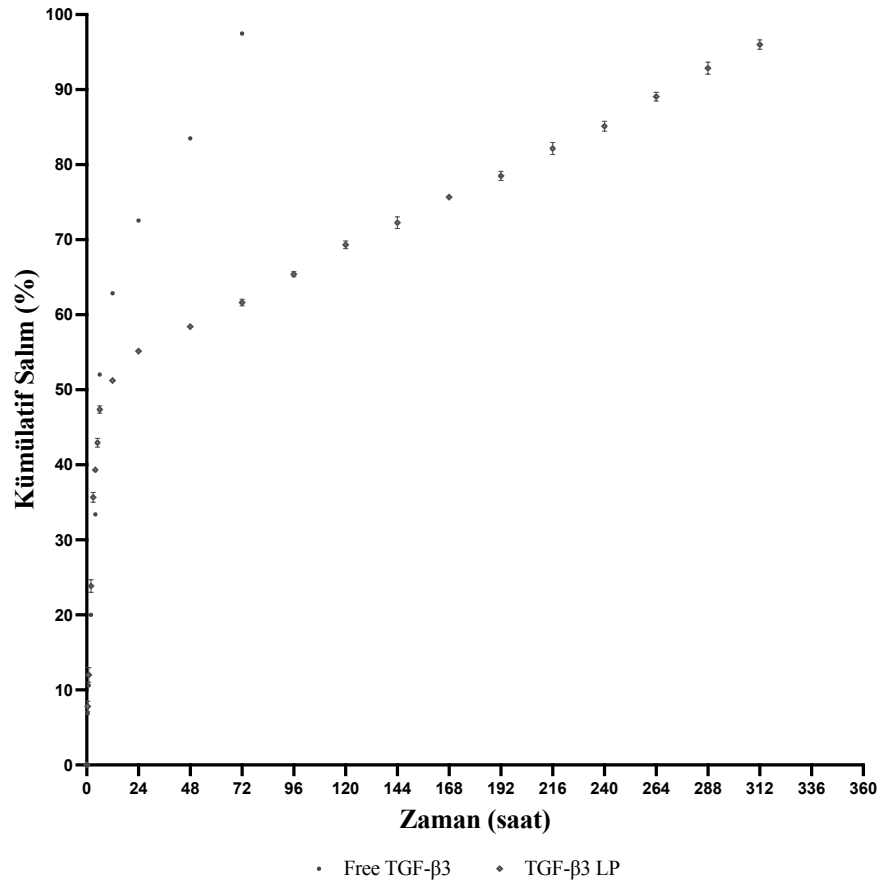


Şekil 4.13. Farklı koşullar altında gerçekleştirilen ultrasantrifüj sonrası süpernatanttan elde edilen lipozomların ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerleri: **A)** SF 1, 1 saat boyunca $60\,000 \times g$; **B)** SF 1, 2 saat boyunca $30\,000 \times g$.

Ultrasantrifüj yönteminde ikinci protokol ile ($30\,000 \times g$, 2 saat) saflaştırılan lipozomlar ile ultrafiltrasyon kullanılarak saflaştırılan lipozomlar arasında PDI bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamış olsa da ($P > 0,05$; Şekil 4.12.B), ek pratik avantajları nedeniyle saflaştırma yöntemi olarak ultrafiltrasyon tercih edilmiştir. DLS karakterizasyonu ile de doğrulandığı üzere, bu yöntem partikül bütünlüğünü korurken serbest aktif maddeleri ve artık organik çözücülerini etkin bir şekilde uzaklaştırmış ve geri kazanımı en üst düzeye çıkarmıştır. Ayrıca ultrafiltrasyon, aktif madde sızıntısı riskini azaltmaktadır (123).

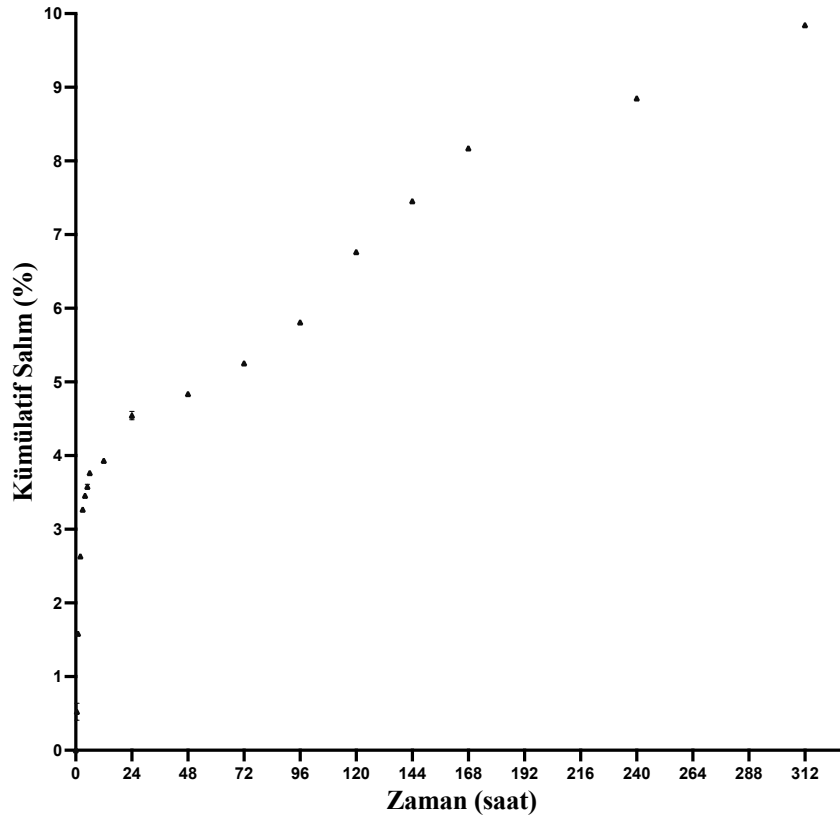
4.4. Lipozom/Lipoplekslerdeki TGF- $\beta 3$ ve miR-132'nin *in vitro* Salım Çalışmaları

TGF- $\beta 3$ LP ve miR-132 LPX'in *in vitro* salım profilleri Şekil 4.14.-4.15.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. TGF-β3 LP ve serbest TGF-β3'ün *in vitro* salım profili (n=3, ort. ± SS).

TGF-β3 LP'den 312 saat içinde toplam $96,64 \pm 0,64$ oranında TGF-β3 salınmıştır. Serbest TGF-β3'ün tamamı yaklaşık 72 saatte salınmıştır. Bu sonuçlar, TGF-β3'ün lipozomlara yüklenmesiyle kontrollü bir şekilde salınmasının sağlanabildiğini göstermektedir.

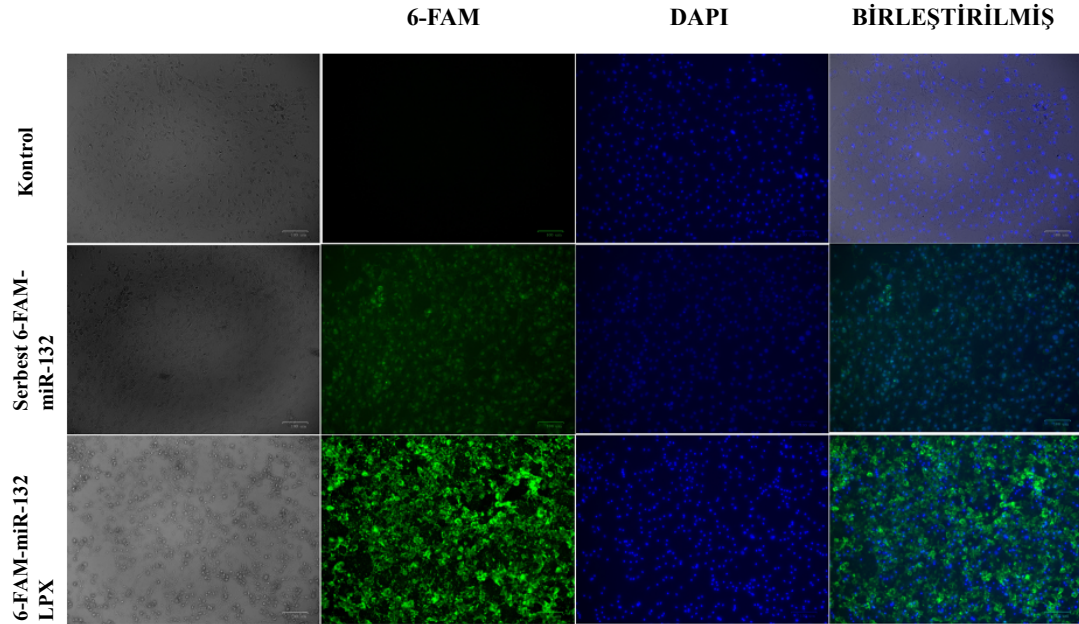


Şekil 4.15. miR-132 LPX'in *in vitro* salım profili (n=3, ort.±SS). Serbest miR-132 2,12 saat içinde neredeyse tamamen salınmıştır (2 saatte $95,96 \pm 0,011$). miR-132 LPX stabil kalmış ve 4 saatte sadece %3,46, 312 saatte ise %9,84 miRNA salınmıştır.

Sonuçlar, miR-132 LPX'ten miR-132'nin %3,46'sının ilk 4 saat içinde ortama salındığını göstermiştir. Salınan toplam miR-132 miktarı 168 saatin sonunda %8,17'ye, 312 saatin sonunda ise %9,84'e ulaşmıştır. Literatürle uyumlu olarak, bu sonuçlar miRNA LPX'in tedavi süresi boyunca stabil kaldığını göstermektedir (168).

4.5. Optimize Edilen Lipozom/Lipopleksler ile Hücre Kültürü Çalışmaları

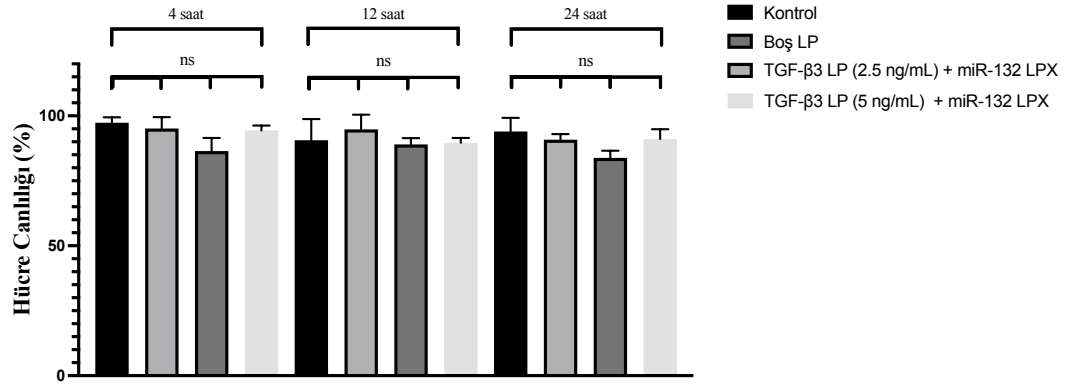
4.5.1. *in vitro* Hücresel Alım (Transfeksiyon) Çalışmaları



Şekil 4.16. Lipopleks yoluyla fare fibroblast hücrelerine miR-132 alımının değerlendirilmesi (6-FAM: 6-Karboksifloresin, DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol).

Hücresel alım, floresan mikroskop ile gösterilmiştir (131). Şekil 4.16., miR-132 lipopleks aracılığıyla L929 hücrelerine miR-132 alımının floresan mikroskop ile değerlendirilmesini göstermektedir. Kontrol grubundaki hücrelerde floresan sinyal gözlenmezken, serbest 6-FAM-miR-132 ile muamele edilen hücrelerde zayıf düzeyde floresan sinyal gözlenmiştir. Buna karşılık, 6-FAM-miR-132 LPX ile muamele edilen hücrelerde belirgin bir 6-FAM floresan sinyali saptanmıştır. Bu bulgular, miR-132'nin lipopleks formülasyonu aracılığıyla L929 hücrelerine daha etkin bir şekilde transfekte ettiğini göstermektedir (Şekil 4.16.).

4.5.2. Lipozom/Lipopleks Formülasyonlarının *in vitro* Hücre Canlılık Testi

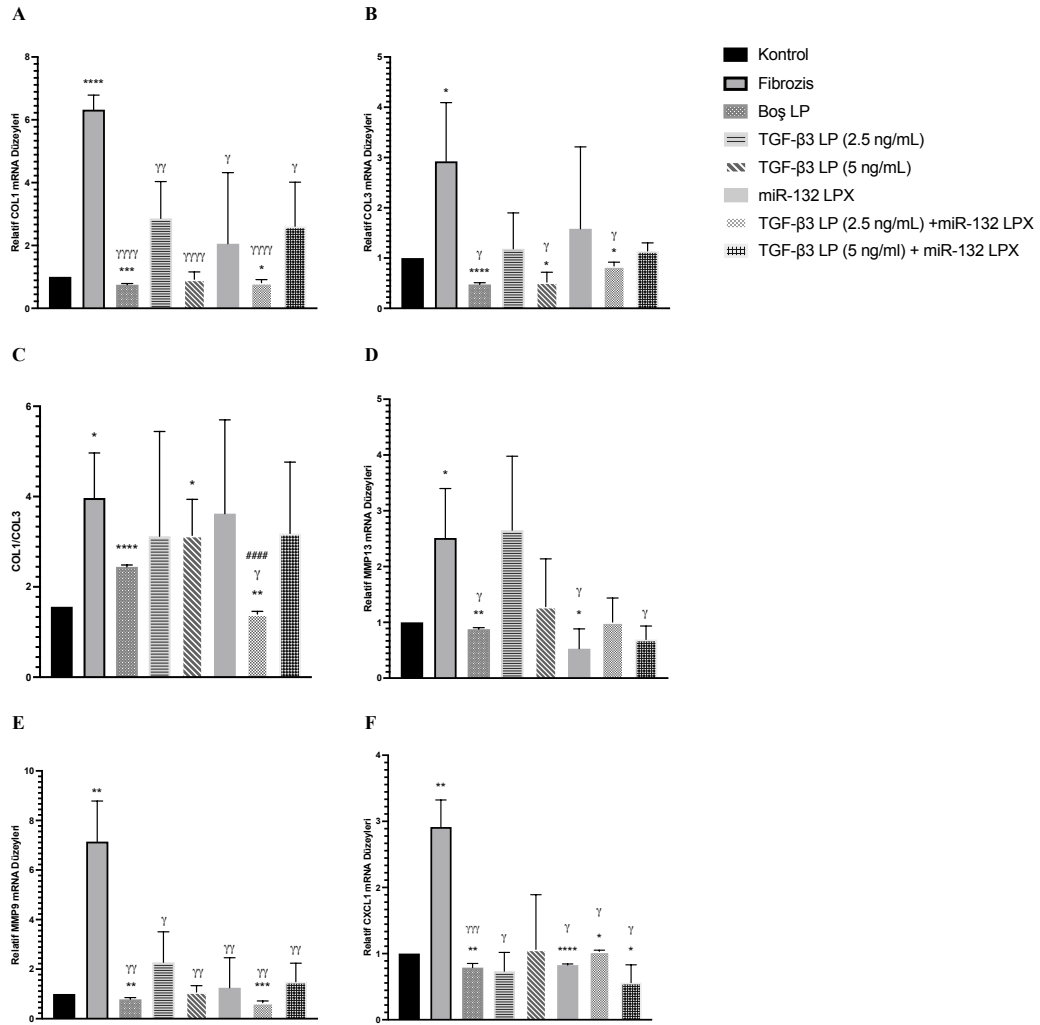


Şekil 4.17. Boş Lipozom, TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) LP + miR-132 LPX ve TGF-β3 LP (5 ng/mL) LP + miR-132 LPX'in 4, 12 ve 24 saatlerdeki *in vitro* hücre canlılık testi sonuçları (n=3, ort. ± SS).

Hücre canlılık testi sonuçları Şekil 4.17.'de gösterilmiştir. Kontrole kıyasla, 4, 12 ve 24 saat sonra boş lipozomlar, TGF-β3 (2,5 ng/mL) LP + miR-132 LPX ve TGF-β3 (5 ng/mL) LP + miR-132 LPX grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$).

4.5.3. RT-qPCR Analizi

Şekil 4.18.'de kolajen tip I (COL1), kolajen tip III (COL3), MMP13, MMP9, CXCL1 ve COL1/COL3 oranının gen düzeyindeki ekspresyonları gösterilmektedir.



Şekil 4.18. Kontrol, fibrozis ve tedavi gruplarında gen ekspresyon seviyeleri (n=6). **A)** COL1, **B)** COL3, **C)** COL1/COL3 oranı, **D)** MMP13, **E)** MMP9 **F)** CXCL1. Fibrozis, kontrol grubuna kıyasla COL1, COL3, MMP13, MMP9, CXCL1 ekspresyonunu ve COL1/COL3 oranını önemli ölçüde artırmıştır. Tedavi grupları, fibrozisle ilişkili gen ekspresyonunu farklı şekilde modüle etmiş olup, kombine TGF-β3-LP + miR-132 LPX gruplarında belirgin azalmalar gözlemlenmiştir. Veriler ort. ± SS olarak sunulmuştur (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001 kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. γ P<0,05, γγ P<0,01, γγγ P<0,001, γγγγ P<0,0001 fibrozis grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. #####P<0,0001 boş lipozom grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir).

Gen düzeyinde, fibrozis grubunda COL1 ekspresyonu kontrol grubuna göre artmıştır (****). TGF-β3 LP (2,5 ng/mL), TGF-β3 LP (5 ng/mL), miR-132 LPX ve TGF-β3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (P>0,05). Gen düzeyinde COL1 ekspresyonu, fibrozis grubuna

kıyasla boş lipozom (γγγγ), TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) (γγ), TGF-β3 LP (5 ng/mL) (γγγγ), miR-132 LPX (γ), TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX (γγγγ) ve TGF-β3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX (γ) gruplarında azalmıştır (Şekil 4.18.A).

Gen düzeyinde, fibrozis grubunda COL3 ekspresyonu kontrol grubuna göre artmıştır (*). TGF-β3 LP (2,5 ng/mL), miR-132 LPX ve TGF-β3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Boş lipozom (****), TGF-β3 LP (5 ng/mL) (*) ve TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX (*) gruplarında, COL3 mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır. Boş lipozom (γ), TGF-β3 LP (5 ng/mL) (γ) ve TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX (γ) gruplarında, COL3 mRNA ekspresyonu fibrozis grubuna kıyasla azalmıştır. TGF-β3 LP (2,5 ng/mL), miR-132 LPX ve TGF-β3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX grupları ile fibrozis grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.18.B).

Fibrozis grubunda COL1/COL3 oranı kontrol grubuna göre artmıştır (*). TGF-β3 LP (2,5 ng/mL), miR-132 LPX ve TGF-β3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Boş lipozom (****) ve TGF-β3 LP (5 ng/mL) (*) gruplarında COL1/COL3 oranı kontrol grubuna göre artmıştır. TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX grubunda, COL1/COL3 oranı kontrol grubuna (**), fibrozis grubuna (γ) ve boş lipozom grubuna (#####) göre azalmıştır (Şekil 4.18.C).

Fibrozis grubunda kontrol grubuna kıyasla gen düzeyinde MMP13 ekspresyonu artmıştır (*). TGF-β3 LP (2,5 ng/mL), TGF-β3 LP (5 ng/mL), TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX ve TGF-β3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX grupları ile kontrol grubu ($P>0,05$) arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Boş lipozom (**) ve miR-132 LPX (*) gruplarında gen düzeyinde MMP13 ekspresyonu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azalmıştır. Boş lipozom (γ), miR-132 LPX (γ) ve TGF-β3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX (γ) gruplarında gen düzeyinde MMP13 ekspresyonu, fibrozis grubuna kıyasla azalmıştır. TGF-β3 LP (2,5 ng/mL), TGF-β3 LP (5 ng/mL) ve TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX grupları ile fibrozis grubu ($P>0,05$) arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.18.D).

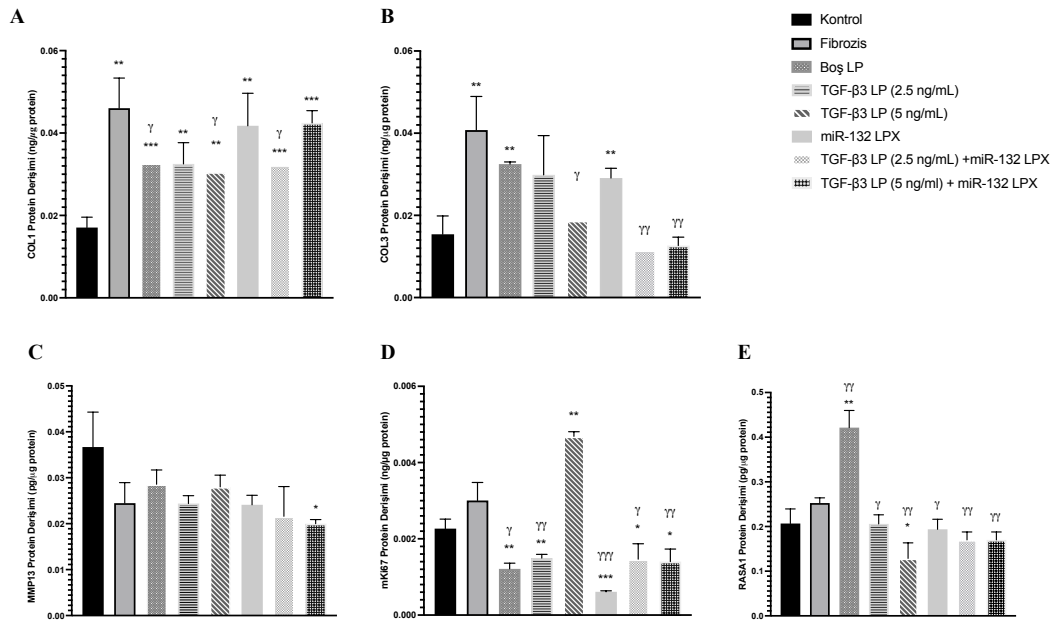
Kontrol grubuna kıyasla fibrozis grubunda gen düzeyinde MMP9 ekspresyonu artmıştır (**). TGF-β3 LP (2,5 ng/mL), TGF-β3 LP (5 ng/mL), miR-132 LPX ve TGF-

β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Boş lipozom (**) ve TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX (***) gruplarında gen düzeyinde MMP9 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla azalmıştır. Boş lipozom ($\gamma\gamma$), TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) (γ), TGF- β 3 LP (5 ng/mL) ($\gamma\gamma$), miR-132 LPX ($\gamma\gamma$), TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX ($\gamma\gamma$) ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX ($\gamma\gamma$) gen düzeyindeki MMP9 ekspresyonu, fibrozis grubuna kıyasla azalmıştır (Şekil 4.18.E).

Kontrol grubuna kıyasla is grubunda gen düzeyinde CXCL1 ekspresyonu artmıştır (**). Kontrol grubu ile TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Kontrol grubuna kıyasla boş lipozom (**), miR-132 LPX (****), TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX (*) ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX (*) gruplarında gen düzeyinde CXCL1 ekspresyonu azalmıştır. Boş lipozom ($\gamma\gamma\gamma$), TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) (γ), miR-132 LPX (γ), TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX (γ) ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX (γ) gruplarında, is grubuna kıyasla gen düzeyinde CXCL1 ekspresyonu azalmıştır. TGF- β 3 LP (5 ng/mL) ve is grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$) (Şekil 4.18.F). Gen düzeyinde mKi67 ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). RASA1 ekspresyonu gen düzeyinde değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

4.5.4. ELISA

COL1, COL3, MMP13, mKi67 ve RASA1'in protein düzeyindeki ekspresyon seviyeleri Şekil 4.19.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Kontrol, fibrozis ve tedavi gruplarında ELİSA yöntemi ile belirlenen protein ekspresyon seviyeleri (n=6). **A)** COL1, **B)** COL3, **C)** MMP13, **D)** mKi67 **E)** RASA1. Veriler ort. ± SS olarak sunulmuştur (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. γ P<0,05, γγ P<0,01, γγγ P<0,001 fibrozis grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir).

Fibrozis grubunda, COL1 protein miktarı kontrol grubuna göre artmıştır (**). Boş lipozom (***), TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) (**), TGF-β3 LP (5 ng/mL) (**), miR-132 LPX (**), TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX (***) ve TGF-β3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX (***) gruplarında, COL1 protein miktarı kontrol grubuna göre artmıştır. Boş lipozom (γ), TGF-β3 LP (5 ng/mL) (γ) ve TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX (γ) gruplarında, COL1 protein seviyesi fibrozis grubuna göre azalmıştır (Şekil 4.19.A).

Fibrozis grubunda, kontrol grubuna kıyasla COL3 protein miktarı artmıştır (**). Boş lipozom (**) ve miR-132 LPX (**) gruplarında COL3 protein seviyeleri kontrol grubuna göre artmıştır. TGF-β3 LP (2,5 ng/mL), TGF-β3 LP (5 ng/mL), TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX ve TGF-β3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (P>0,05). TGF-β3 LP (5 ng/mL) (γ), TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX (γγ) ve TGF-β3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX (γγ) gruplarında COL3 ekspresyonu, fibrozis grubuna kıyasla protein

düzeyinde azalmıştır. Boş lipozom, TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) ve miR-132 LPX grupları ile fibrozis grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$) (Şekil 4.19.B).

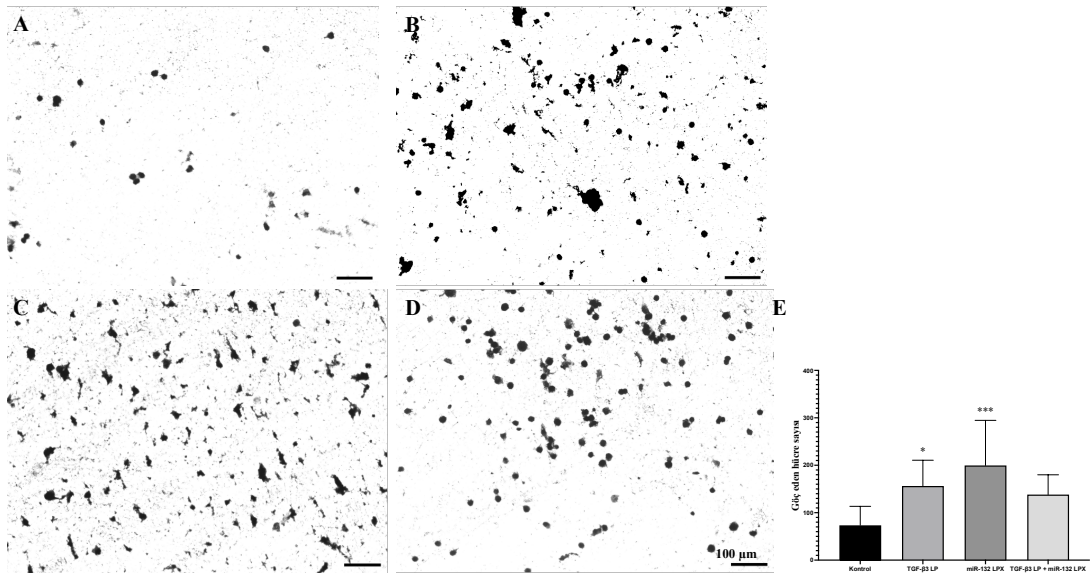
Fibrozis, boş lipozom, TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL), TGF- β 3 LP (5 ng/mL), miR-132 LPX ve TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX grupları ile kontrol grubu arasında MMP13 protein miktarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL), TGF- β 3 LP (5 ng/mL), TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX grupları ile kontrol grubu arasında da anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). TGF- β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX (*) protein seviyesinde MMP13 miktarı, fibrozis grubuna kıyasla azalmıştır. Boş lipozom, TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL), TGF- β 3 LP (5 ng/mL), miR-132 LPX, TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX grupları ile fibrozis grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$) (Şekil 4.19.C). Tüm gruplar arasında MMP9 protein derişimlerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

Fibrozis grubu ile kontrol grubu arasında mKi67 protein miktarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Boş lipozom (**), TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) (**), miR-132 LPX (***), TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX (*) ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX (*) gruplarında, protein içindeki mKi67 miktarı kontrol grubuna göre azalmıştır. TGF- β 3 LP (5 ng/mL) (**) grubunda ise protein içindeki mKi67 miktarı kontrol grubuna göre artmıştır. Boş lipozom (γ), TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) ($\gamma\gamma$), miR-132 LPX ($\gamma\gamma\gamma$), TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX (γ) ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX ($\gamma\gamma$) gruplarında, mKi67 protein miktarı fibrozis grubuna kıyasla azalmıştır. TGF- β 3 LP (5 ng/mL) grubu ile fibrozis grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$) (Şekil 4.19.D).

Fibrozis grubu ile kontrol grubu arasında RASA1 protein miktarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Boş lipozom (**) grubunda, RASA1 protein miktarı kontrol grubuna göre artmıştır. TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL), miR-132 LPX, TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). TGF- β 3 LP (5 ng/mL) (*) grubunda, protein düzeyindeki RASA1 miktarı kontrol grubuna göre azalmıştır. TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) (γ), TGF- β 3 LP (5 ng/mL) ($\gamma\gamma$), miR-132 LPX (γ), TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX ($\gamma\gamma$) ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132

LPX ($\gamma\gamma$) gruplarında, protein düzeyindeki RASA1 miktarı fibrozis grubuna kıyasla azalmıştır. Boş lipozom ($\gamma\gamma$) grubunda ise protein düzeyindeki RASA1 miktarı fibrozis grubuna kıyasla artmıştır (Şekil 4.19.E).

4.5.5. Transwell Hücre Migrasyon Testi



Şekil 4.20. Transwell migrasyon testi sonuçları. Göç eden hücrelerin temsili görüntüleri. **A)** Kontrol, **B)** TGF-β3 LP (2,5 ng/mL), **C)** miR-132 LPX, **D)** TGF-β3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX. **E)** Deney gruplarındaki göç eden hücre sayısı (n=5). Veriler ort. ± SS olarak sunulmuştur. (*P<0,05, ***P<0,001 kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir).

TGF-β3 LP (*) ve miR-132 LPX (**) grubunda 48 saatte, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre migrasyonu önemli ölçüde artırılmıştır. Buna karşılık, kombinasyon tedavisi (TGF-β3 LP+ miR-132 LPX) migrasyonu teşvik etme eğilimi göstermesine rağmen (Ortalama Fark = -64,80), gözlemlenen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (P = 0,0642) (Şekil 4.20.).

4.6. Hidrojel Dispersiyonlarının Formülasyonu ve Hazırlanması

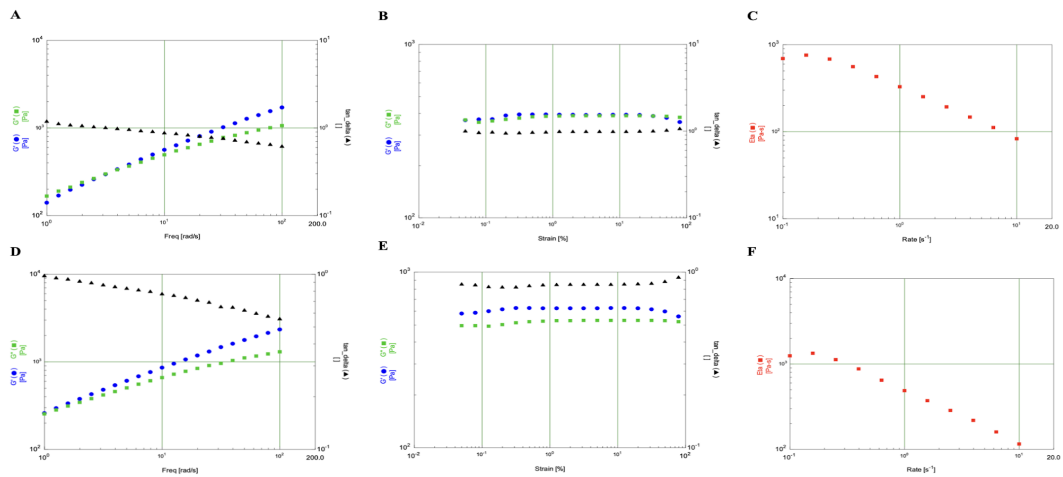
4.6.1. Reolojik Karakterizasyon

Kitosan-RF hidrojel dispersiyonlarının reolojik özellikleri farklı polimer derişimlerinde değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.11'de sunulmuştur.

Tablo 4.11. Kitosan-RF hidrojel dispersiyonlarının reolojik özellikleri (ort. ± SS).

Kitosan Derişimi (% a/h)	Kayma hızı aralığı (s ⁻¹)	Ölçüm yapılan kayma hızı (s ⁻¹)	Viskozite (cP)
2	0,01–200	80	70,56 ± 3,43
3	0,01–90	0,098	480,00 ± 13,70
5	0,01–2,5	0,086	7680,00 ± 22,52
7	0,01–0,2	0,200	401841,00 ± 15,40

Kitosan derişimi %2-7 (a/h) aralığında olan hidrojel dispersiyonları ile biyobaskı çalışmaları yapılmış ve baskı performansı açısından hidrojel iskele üretimi için en uygun formülasyonun %7 (a/h) kitosan hidrojel dispersiyonu olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, hidrojel dispersiyonunun lipozom formülasyonu ile kombinasyonunun reolojik özellikleri ve dolayısıyla biyobaskı yeteneğini etkileyebileceği öngörüldüğünden, lipozom/lipopleks yüklü hidrojel biyobaskı çalışmaları için %8 (a/h) kitosan derişimi seçilmiştir. Boş kitosan (%7 (a/h)) hidrojel ve lipozom yüklü kitosan (%8 (a/h)) hidrojel dispersiyonlarının reolojik analiz sonuçları Şekil 4.21'de sunulmuştur.



Şekil 4.21. Boş kitosan (%7 (a/h)) hidrojel dispersiyonuna ait **A)** frekans taraması, **B)** gerinim taraması, **C)** viskozite ölçümleri. Lipozom/lipopleks yüklü kitosan (%8 (a/h)) hidrojel dispersiyonuna ait **D)** frekans taraması, **E)** gerinim taraması, **F)** viskozite ölçümleri.

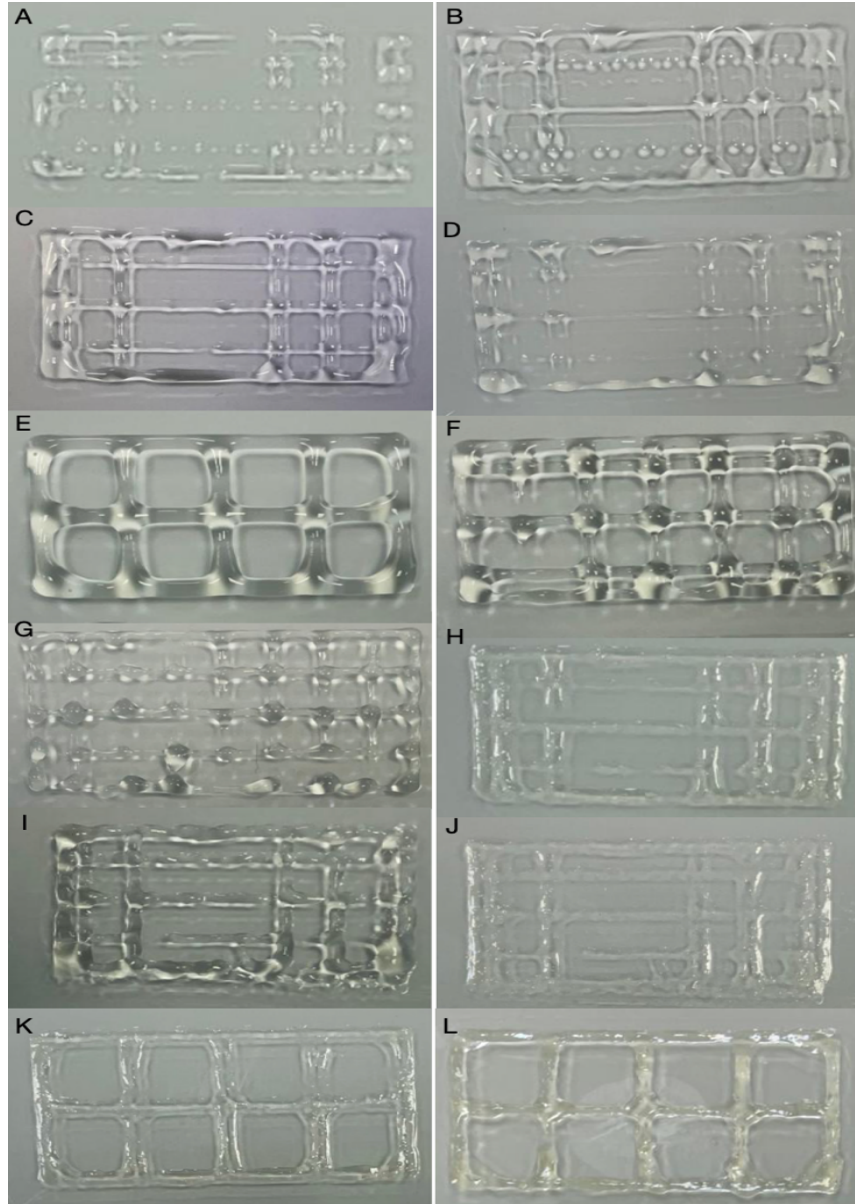
Frekans tarama analizinde, her iki formülasyonun da incelenen frekans aralığında genel olarak kararlı viskoelastik davranış sergilediği ve depo modülü (G') değerlerinin kayıp modülü (G'') değerlerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, her iki hidrojel sisteminde elastik davranışın baskın olduğunu ve sistemlerin jel benzeri bir karakter taşıdığını göstermektedir.

Gerilme tarama analizinde, belirli bir gerilme aralığında modül değerlerinin büyük ölçüde sabit kalması, sistemlerin doğrusal viskoelastik bölge içinde yapısal bütünlüklerini koruduğunu göstermiştir. Viskozite ölçümlerinde, kayma hızının artmasıyla viskozitenin azalması, her iki sistemin de kayma incilmesi davranışı sergilediğini ortaya koymuştur. Genel olarak, %8 (a/h) kitosan hidrojel içerisine lipozom/lipopleks yüklenmesiyle elde edilen sistemin daha yüksek viskoelastik özelliklere ve viskoziteye sahip olduğu gözlenmiştir.

4.6.2. Hidrojel İskelelerin 3B Biyobaskı Çalışmaları

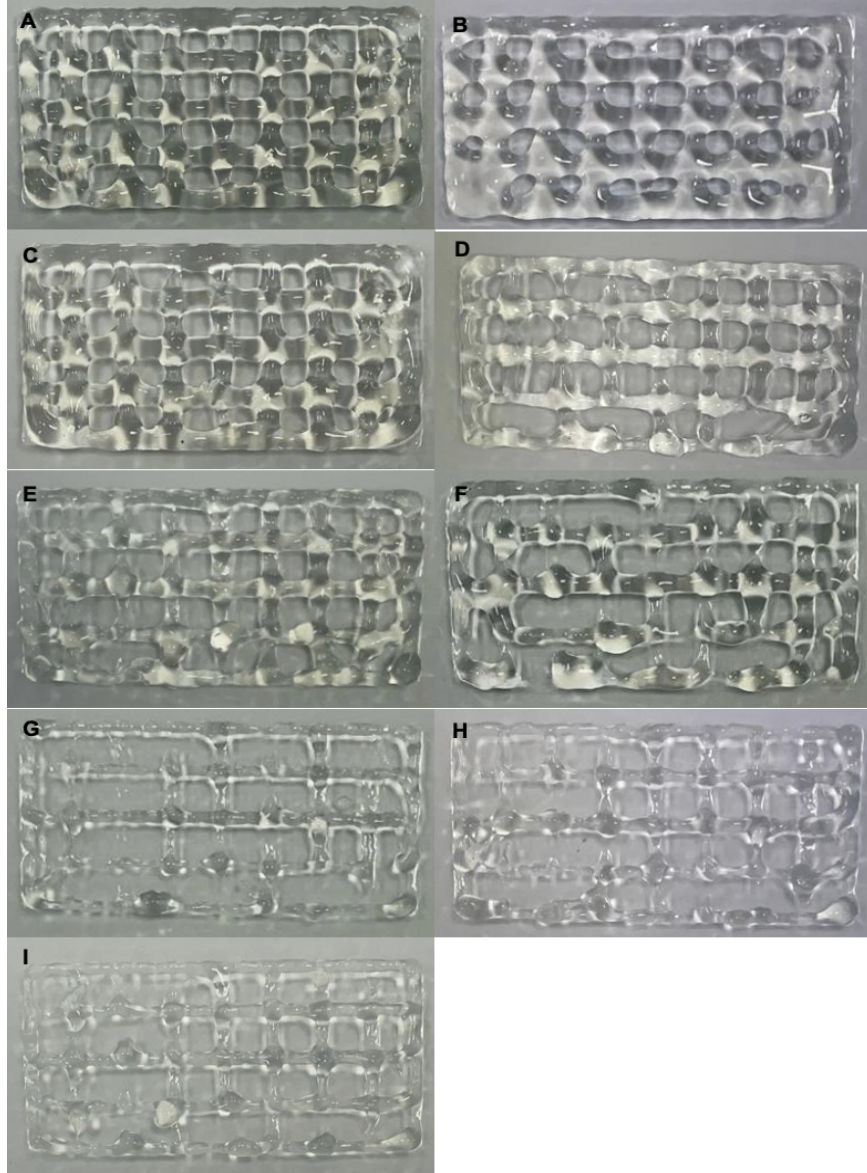
Hazırlanan hidrojel dispersiyonları, Axo A1 3B Biyobaskı Sistemi kullanılarak 3B olarak basılmıştır. Standardize hidrojel iskeleler elde etmek için, iğne ucu tipi/çapı, basınç ve baskı hızı optimize edilmiştir (Şekil 4.22.). İğne ucu ve çapının seçimi için, hidrojel dispersiyonları uygun basınçlarda 14G–25G mikro iğnelerden ekstrüde edilmiştir.

Şekil 4.22.'de, iğne ucu ve basınç optimizasyonu için, %1-7 (a/h) derişim aralığında hazırlanan kitosan hidrojel dispersiyonlarının 25 mm/s hızda basılmasıyla elde edilen hidrojel iskelelerinin görüntüleri yer almaktadır.



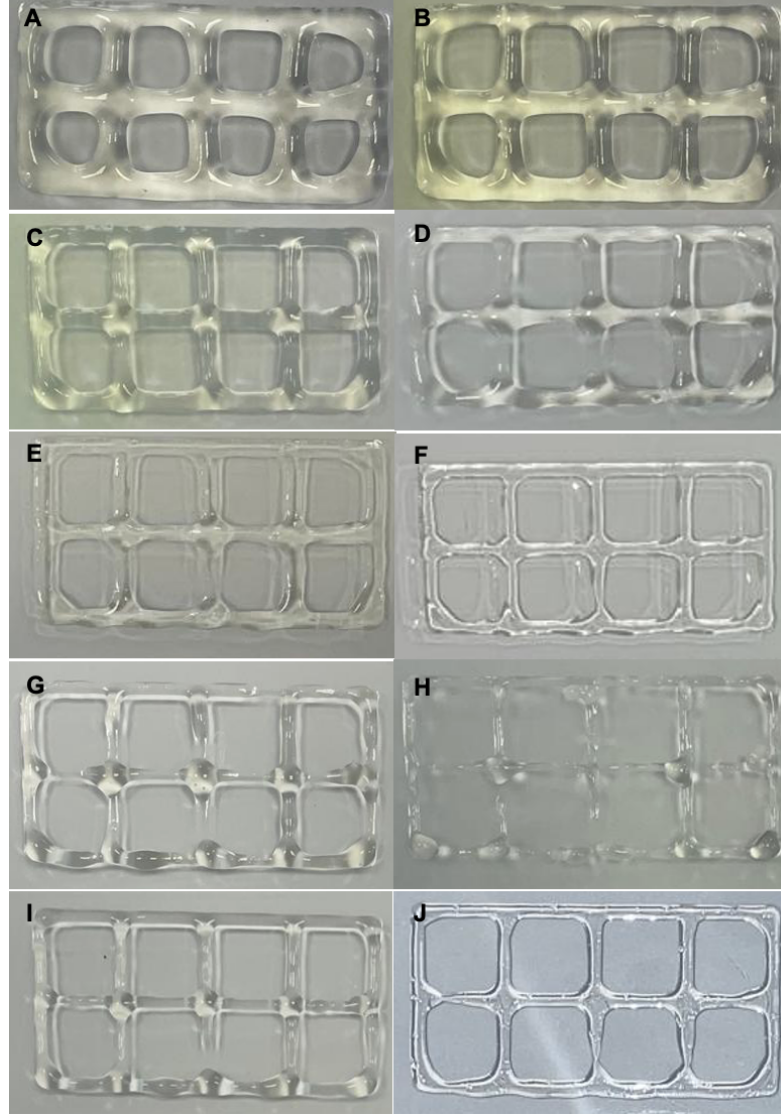
Şekil 4.22. Çeşitli derişimlerde ve 0,2 mm katman yüksekliği, farklı koşullar altında basılan kitosan ve kitosan-RF hidrojel iskelelerin görüntüleri. **A-B)** Kitosan hidrojel iskele (%1 (a/h)), sırasıyla 0,9 ve 1,2 psi basınçta ve %7 dolulukta, 25G iğne kullanılarak basılmıştır. **C-D)** Kitosan hidrojel iskele (%3 (a/h)) ve kitosan (%3 (a/h))-RF hidrojel iskele, sırasıyla 1,9 ve 1,4 psi basınçta ve %7 dolulukta, 20G iğne kullanılarak basılmıştır. **E-F-G)** Kitosan (%5 (a/h))-RF hidrojel iskele, 4,0 ila 5,6 psi basınçta ve %8 veya %16 dolulukta, 16G veya 18G iğneler kullanılarak basılmıştır. **H-I-J-K)** Kitosan (%7 (a/h))-RF hidrojel iskele, 10,3 ila 11,3 psi basınçta, %7 veya %8 dolulukta, 14G veya 16G iğneler kullanılarak basılmış; ardından 4,5 cm mesafeden 365 nm dalga boyundaki UV ışığı altında 1,5 saat boyunca çapraz bağlanmışır. **L)** İkinci katman, K'deki katmanın üzerine basılmışır.

Takiben %6-7 (a/h) aralığındaki hidrojel dispersiyonları, iğne ucu ve çapının seçimi için uygun basınçlarda 14G-18G mikro iğnelerden ekstrüde edilmiştir. Optimize edilmiş iğne ucu ve basınçta, farklı hızlarda (15-25 mm/s) basılan hidrojel iskelelerin görüntüleri Şekil 4.23.-4.24.'te yer almaktadır.



Şekil 4.23. Kitosan-RF hidrojel iskelelerin, %7 (a/h) kitosan derişiminde ve 0,2 mm katman yüksekliğinde farklı baskı koşullarında elde edilen görüntüleri. **A-B)** Hidrojel iskele 14G iğne kullanılarak, %16 dolulukta, sırasıyla 25 ve 20 mm/s hızlarda ve 9,6 psi basınçta basılmıştır. **C)** Hidrojel iskele 14G iğne kullanılarak, %16 dolulukta, 15 mm/s hızda ve 8,7 psi basınçta basılmıştır. **D)** Hidrojel iskele 14G iğne kullanılarak, %16 dolulukta, 25 mm/s hızda ve 7 psi basınçta basılmıştır. **E-F)** Hidrojel iskele 14G iğne kullanılarak, %16 dolulukta, sırasıyla 20 ve 15 mm/s hızlarda ve 7,5 psi

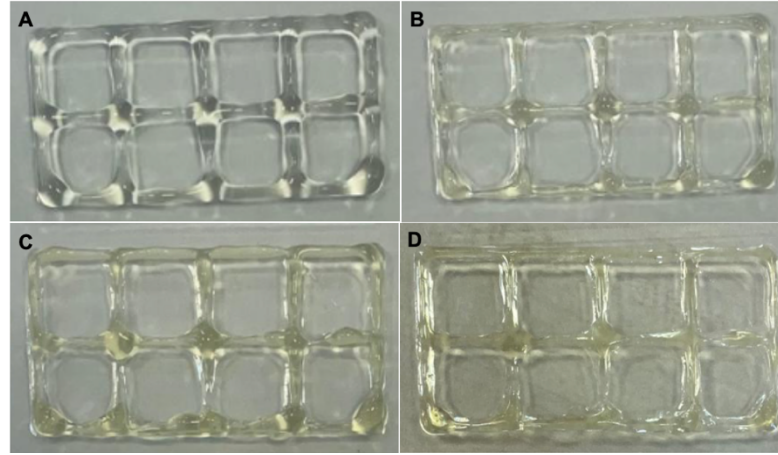
basınçta basılmıştır. **G-H)** Hidrojel iskele 16G iğne kullanılarak, %16 dolulukta, 20 mm/s hızda ve sırasıyla 9,4 veya 8,6 psi basınçta basılmıştır. **I)** Hidrojel iskele; 16G iğne kullanılarak, %16 dolulukta, 15 mm/s hızda ve 7,5 psi basınçta basılmıştır.



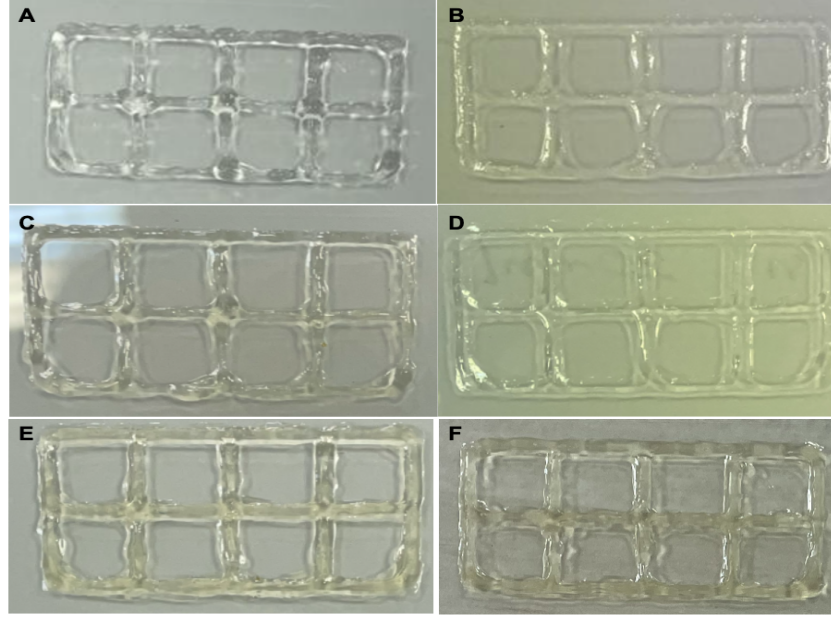
Şekil 4.24. Kitosan-RF hidrojel iskelelerin, %6-7 (a/h) kitosan derişimlerinde, %8 dolulukta ve 0,2 mm katman yüksekliği ile farklı baskı koşullarında elde edilen görüntüleri. **A-B-C-D-E)** Kitosan (%7 (a/h)) + RF hidrojel iskeleler; sırasıyla 8,5; 7; 6,6; 5,8 ve 5 psi basınçta, 20 mm/s hızla ve 14G iğne ucu kullanılarak basılmıştır. **F)** Kitosan (%7 (a/h)) + RF hidrojel iskele 5,2 psi basınçta aynı baskı koşulları altında basılmış ve ardından 4,5 cm mesafeden 365 nm dalga boyundaki UV ışığı altında 1 saat çapraz bağlanmıştır. **G)** Kitosan (%7 (a/h)) + RF hidrojel iskele, 7 psi basınçta, 20 mm/s hızla ve 16G iğne ucu kullanılarak basılmıştır. **H-I)** Kitosan (%6 (a/h)) + RF hidrojel iskeleler; sırasıyla 4,5 ve 3,7 psi basınçta, 25 ve 20 mm/s hızlarla ve 16G iğne ucu kullanılarak basılmıştır. **J)** Kitosan (%7 (a/h)) + RF hidrojel iskele, 4,7 psi basınçta, 15 mm/s hızla ve 16G iğne

ucu kullanılarak basılmış ve ardından aynı koşullar altında 1 saat çapraz bağlanmıştır.

Basınç ve baskı hızının optimizasyonu için, %7 (a/h) kitosan + RF hidrojel dispersiyonu 14G iğne ile ekstrüde edilmiştir. Optimize edilmiş basınçta ve 15-20 mm/s hızlarda katman katman biriktirme yöntemiyle basılarak elde edilen iskelelerin görüntüleri Şekil 4.25.-4.26.'da yer almaktadır.



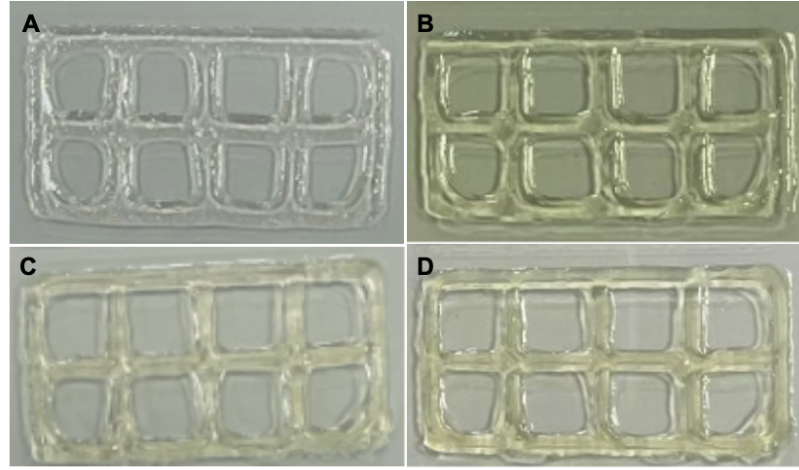
Şekil 4.25. Kitosan-RF hidrojel iskelelerin, %7 (a/h) kitosan derişiminde, 14G iğne ucu kullanılarak, 20 mm/s hız ve 5,4 psi basınçla, %8 dolulukta ve 0,2 mm katman yüksekliğinde katman katman basılmasıyla edilen görüntüleri. **A)** Hidrojel iskele basılmıştır. **B)** Hidrojel iskele, 4,5 cm mesafeden 365 nm dalga boyundaki UV ışığı altında 1 saat boyunca çapraz bağlanmıştır. **C)** Aynı baskı koşulları altında, tek katmanlı hidrojel iskele üzerine ikinci katman basılmış ve ardından UV ile çapraz bağlanmıştır. **D)** Aynı baskı koşulları altında, iki katmanlı hidrojel iskele üzerine üçüncü katman basılmış ve ardından UV ile çapraz bağlanmıştır.



Şekil 4.26. Kitosan-RF hidrojel iskelelerin, %7 (a/h) kitosan derişiminde, 14G iğne ucu kullanılarak 15 mm/s hızla, %8 dolulukta ve 0,2 mm katman yüksekliğinde, farklı basınçlar altında katman katman basılmasıyla elde edilen görüntüleri. **A)** Hidrojel iskele 6,3 psi basınçta basılmıştır. **B)** Hidrojel iskele 7 psi basınçta basılmış ve UV ile çapraz bağlanmıştır. **C)** Hidrojel iskele üzerine 7 psi basınçta 2. katman basılmış ve ardından UV ile çapraz bağlanmıştır. **D)** Hidrojel iskele 7,6 psi basınçta basılmış ve ardından UV ile çapraz bağlanmıştır. **E)** Hidrojel iskele üzerine 7,6 psi basınçta 2. katman basılmış ve ardından UV ile çapraz bağlanmıştır. **F)** Hidrojel iskele üzerine 7,6 psi basınçta 3. katman basılmış ve ardından UV ile çapraz bağlanmıştır.

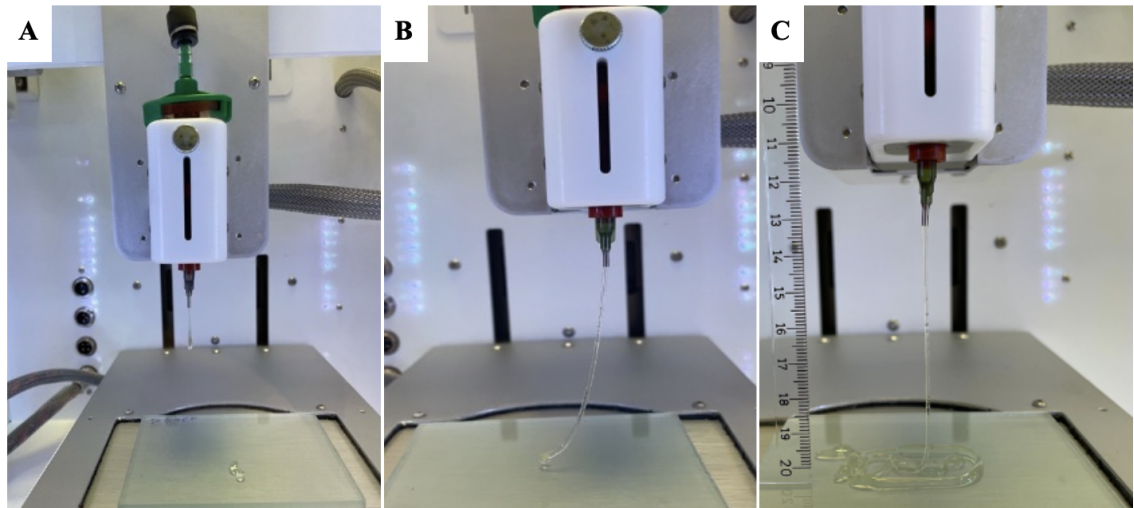
Biyobaskı optimizasyon çalışmalarına dayanarak, boş kitosan hidrojel iskeleler için en uygun formülasyon, 14G iğne, 15 mm/s hız, 7,6 psi basınç, %8 doluluk (ızgara deseni) ve 0,2 mm katman yüksekliği baskı parametreleriyle %7 (a/h) kitosan + RF hidrojel dispersiyonu olarak belirlenmiştir (Şekil 4.26.D–F). Her katmandan sonra UV (365 nm) çapraz bağlama uygulanması yalnızca dördüncü katmandan sonra UV (365 nm) çapraz bağlamaya göre yüksek çözünürlüklü hidrojel iskeleler elde edilmesini sağlamıştır. En uygun UV maruziyet süresi 1 saat, UV-iskele mesafesi ise 4,5 cm olarak belirlenmiştir.

Lipozom/lipopleks yüklü hidrojel dispersiyonu, 14G iğne kullanılarak 15 mm/s hızda, 7 psi basınçta, %8 doluluk oranında (ızgara) ve 0,2 mm katman yüksekliğinde ekstrüde edilmiş ve ardından UV çapraz bağlama işlemi uygulanarak lipozom yüklü hidrojel iskeleleri elde edilmiştir (Şekil 4.27.A–D).



Şekil 4.27. Lipozom yüklü kitosan-RF hidrojel iskelelerin, %8 (a/h) kitosan derişiminde, 14G iğne ucu kullanılarak, 15 mm/s hızla, %8 dolulukta ve 0,2 mm katman yüksekliğinde, farklı basınçlar altında katman katman basılmasıyla elde edilen görüntüleri. **A)** Hidrojel iskele 7 psi basınçta basılmış ve UV ile çapraz bağlanmıştır. **B)** Hidrojel iskele üzerine 7 psi basınçta 2. Katman basılmış ve ardından UV ile çapraz bağlanmıştır. **C)** Hidrojel iskele üzerine 7 psi basınçta 3. katman basılmış ve ardından UV ile çapraz bağlanmıştır. **D)** Hidrojel iskele üzerine 7 psi basınçta 4. katman basılmış ve ardından UV ile çapraz bağlanmıştır.

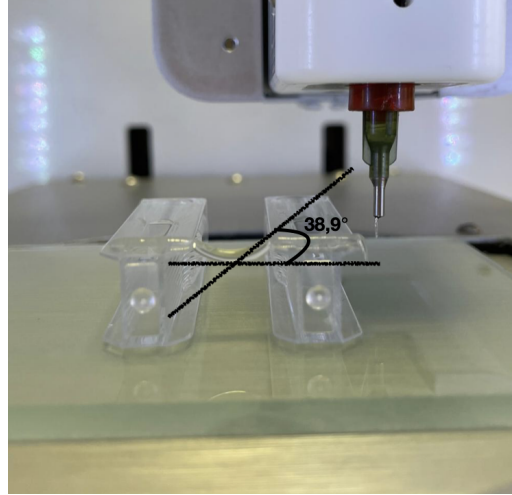
Hidrojel dispersiyonlarının filament ekstrüzyonu, kitosan (%6 ve %7 a/h) + RF ve lipozom/lipopleks yüklü kitosan (%8 a/h) + RF formülasyonları 3B biyobaskı cihazında değerlendirilmiştir. Test edilen tüm formülasyonlar sürekli, kırılmamış filament ekstrüzyonu göstermiştir (Şekil 4.28.).



Şekil 4.28. Filament Ekstrüzyon Bütünlüğünün Belirlenmesi. **A)** Kitosan (%6 (a/h)) + RF hidrojel dispersiyonu (16G iğne ucu). **B)** Kitosan (%7 (a/h)) + RF

hidrojel dispersiyonu (14G iğne ucu). C) Lipozom/lipopleks yüklü %8 (a/h) kitosan + RF hidrojel dispersiyonu (14G iğne ucu).

Boş ve lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskeleler için maksimum yayılma oranı 2,0 olarak belirlenmiştir. Her iki formülasyonda da, 1,0 ve 1,25 yayılma oranları yüksek oranda gözlemlenmiştir. Filament çökme testinde ölçülen sapma açısı $38,9^\circ$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.29.).



Şekil 4.29. Filament çökme testi ile sapma açısının belirlenmesi.

Biyobaskı çalışmalarında, her katman 0,2 mm yükseklikte basılmıştır. Dijital mikrometre ölçümleri, dört katmanlı hidrojel iskelenin toplam katman yüksekliğinin 0,8 mm olduğunu ve teorik-gerçek yükseklik oranının 1,0 olduğunu doğrulamıştır. Bu bulgu hidrojel iskelede minimum katmanlar arası kaynaşma ve yerçekimi kaynaklı deformasyonu göstermektedir.

4.7. Hidrojel İskelelerin Karakterizasyon Çalışmaları

4.7.1. pH Değerlerinin Belirlenmesi

Hidrojel iskelelerin pH değerleri Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.12. Hidrojel İskelelerin pH değerleri (n=3, ort. $\pm$ SS).

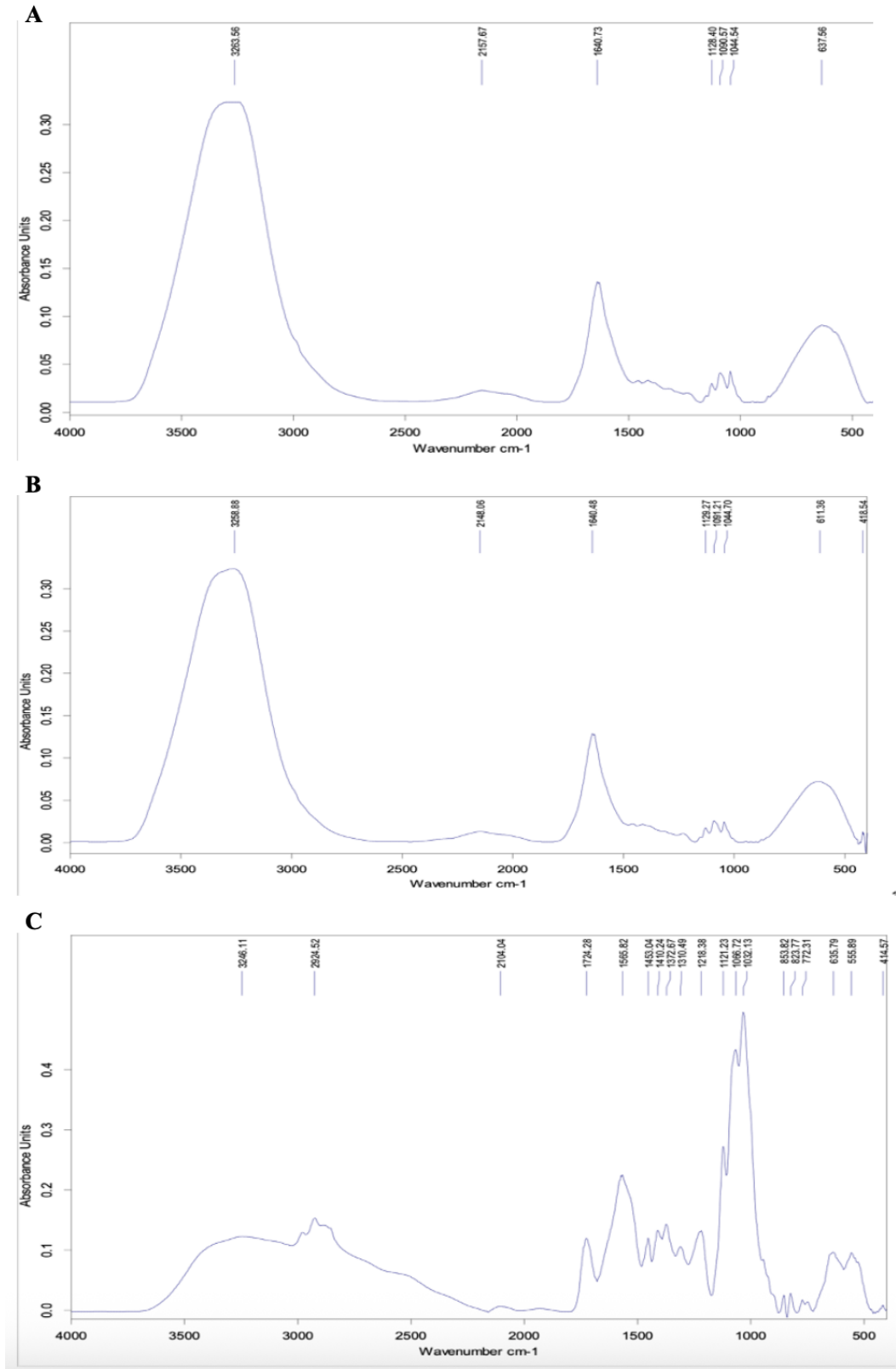
Kitosan Derişimi (% a/h)	pH
6	$3,36 \pm 0,1$
7)	$3,31 \pm 0,05$

8	$3,22 \pm 0,09$
8 (Lipozom/lipopleks yüklü)	$3,28 \pm 0,01$

Farklı derişimlerdeki kitosan hidrojel iskelelerin ve lipozom/lipopleks yüklü %8 (a/h) kitosan hidrojel iskelesinin pH değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

4.7.2. FTIR Analizi

Boş hidrojel dispersiyonunun, lipozom/lipopleks yüklü hidrojel dispersiyonunun ve boş hidrojel iskelesinin FTIR spektrumları Şekil 4.30.'da verilmiştir.



Şekil 4.30. FTIR Spektrumu. **A)** Boş hidrojel dispersiyonu. **B)** Lipozom/lipopleks yüklü hidrojel dispersiyonu. **C)** Boş hidrojel iskelesi.

Boş hidrojel dispersiyonunun FTIR spektrumundaki (Şekil 4.30.A) 2157,67 cm^{-1} dalga sayısındaki titreşim, numune hazırlamada kullanılan ATR kristalini göstermektedir. Aynı spektrumda 3263,56 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen ana pik, N–H ve O–H gerilme titreşim bantları ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca 1640,73 cm^{-1} dalga sayısındaki majör pik, C=O gerilme, C–H gerilme ve N–H bükülme titreşimlerine karşılık gelmektedir (169). Benzer şekilde, 1128,4 ve 1044,54 cm^{-1} civarında gözlenen diğer iki pik ise C–O gerilme titreşimlerini göstermektedir (170). Lipozom/lipopleks yüklü hidrojel dispersiyonunun analizinde de benzer bir spektrum elde edilmiştir (Şekil 4.30.B).

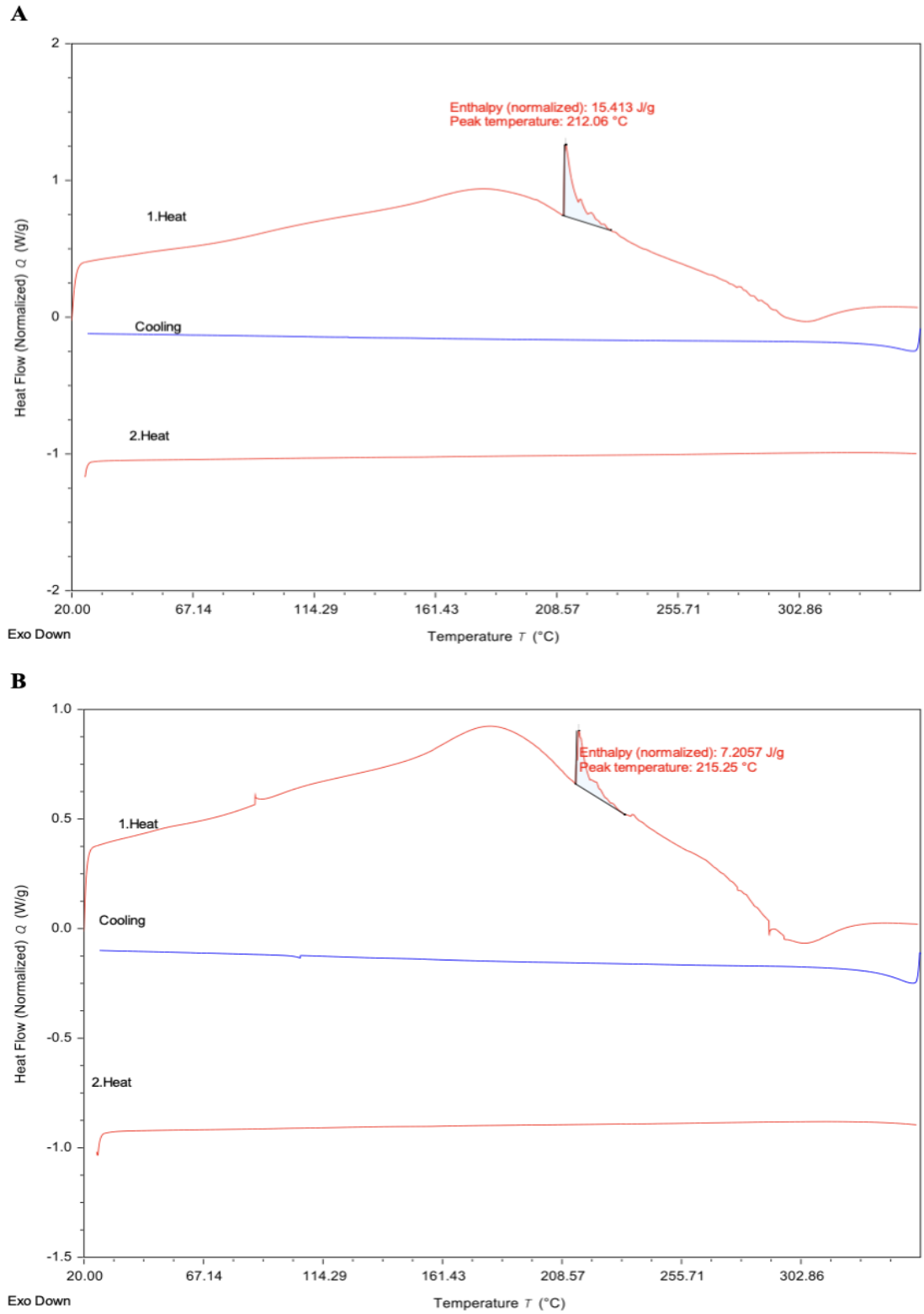
Boş hidrojel iskelesinde UV çapraz bağlama reaksiyonu kitosanın NH₂ fonksiyonel grubunda gerçekleştiği için, kitosanın N-H bağı ve O-H bağı gerilme bantları, hidrojel dispersiyonuna kıyasla daha geniş ve daha düşük yoğunlukta 3246,11 cm^{-1} dalga sayısında gözlemlenmiştir (33, 169). Ayrıca, 2924 cm^{-1} dalga sayısındaki piklerin, çapraz bağlanmış kitosanın CH ve metilen gruplarının C-H titreşimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (171). Bunun yanı sıra, 1724 cm^{-1} dalga sayısındaki pik, RF ile kitosan arasında oluşan amid bağı ile ilişkilendirilmiştir (33) (Şekil 4.30.C).

RF literatürle uyumlu şekilde (33) C=O gerilme titreşimleri, halka I'in C–C gerilme titreşimlerinden kaynaklanan 1565,82 cm^{-1} dalga sayısındaki majör pik ve CN çift bağ gerilmesiyle birlikte C–C, C–N gerilmesine ve CH veya CNH bükülme titreşimlerinden kaynaklanan çoklu bantlarla karakterize edilmiştir (33).

RF'in UV ışığını absorbe ettiği ve radikal türler ve reaktif ara ürünler oluşturduğu bilinmektedir (33). Düşük dalga sayısı bölgesinde (1500–500 cm^{-1}) gözlenen heterojen piklerin, UV ışığı altında RF tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerinin hidrojel dispersiyonu içerisindeki fonksiyonel gruplar arasında rastgele ve spesifik olmayan reaksiyonları başlatmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (33).

4.7.3. Termal Analiz

Boş ve lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelesinin DSC termogramları Şekil 4.31.'de verilmiştir.



Şekil 4.31. DSC termogramları. **A)** Boş hidrojel iskele. **B)** Lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelesi.

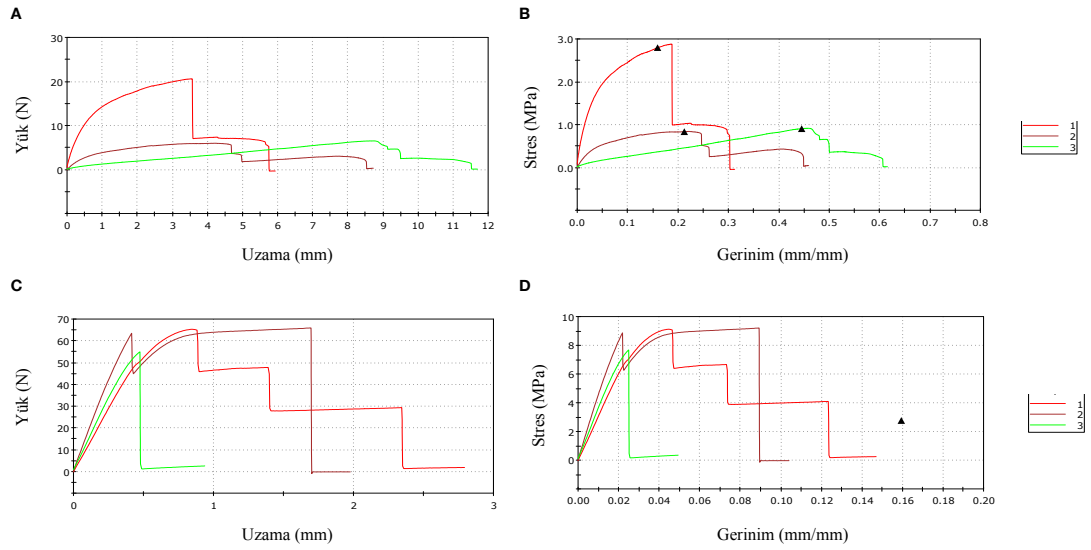
Boş ve lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskeleler için sırasıyla 210,06 °C ve 213,81 °C'de elde edilen endotermik pikler, iskele içindeki nemin buharlaşmasından kaynaklanmaktadır. Yüklenmemiş ve lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskeleler için sırasıyla 212,06 °C ve 215,25 °C'de elde edilen ekzotermik pik, polimerik zincirlerin kendilerini yeniden düzenleyip kristal forma girebildiği kristalleşme sıcaklığından kaynaklanmaktadır (172). Boş hidrojel ve lipozom yüklü hidrojel iskele için sırasıyla 305,19 °C ve 305,69 °C'deki endotermik bant yüksek sıcaklıkta oksijenin varlığında moleküler yapının depolimerizasyonu ve ayrıca kitosanın yapısının ayrışması nedeniyle gözlenmiştir (173).

4.7.4. Şişme, Degradasyon ve Mekanik Dayanım Testi

Hidrojel iskeleler 24 saat sonra dağıldığı için, iskelelerin şişme yüzdeleri 24 saatlik süre içinde belirlenmiştir. Boş ve lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelelerin 24 saat sonunda belirlenen şişme yüzdeleri sırasıyla $1287,59 \pm 20,9$ ve $1667,86 \pm 47,15$ olarak bulunmuştur. Bu bulgu, PBS içerisinde hidrojel yapısının hidrat haldeki bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir.

Degradasyon yüzdeleri ise boş ve lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskeleler için sırasıyla $3,51 \pm 0,14$ ve $8,45 \pm 1,23$ olarak bulunmuştur.

Mekanik çekme dayanım testi sonuçları Tablo 4.13'te sunulmuştur. Boş hidrojel ve lipozom yüklü hidrojel iskelelerin uzamaya karşı yük grafiği ve gerinime karşı stres grafiği şekil 4.32.'de yer almaktadır.



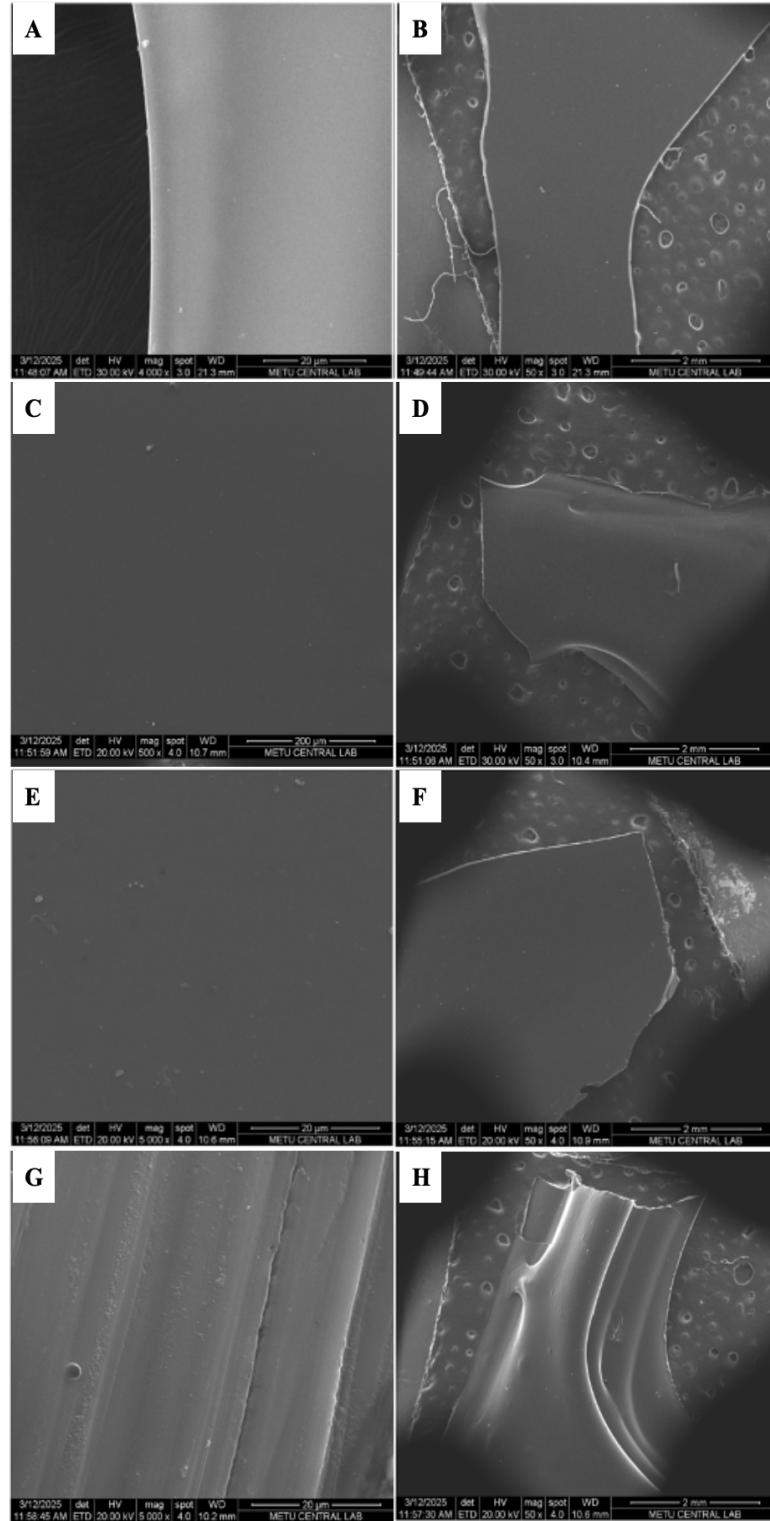
Şekil 4.32. Mekanik test sonuçları. Boş hidrojel iskelesine ait **A)** uzamaya karşı yük grafiği ve **B)** gerinime karşı stres grafiği. Lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelesine ait **C)** uzamaya karşı yük grafiği ve **D)** gerinime karşı stres grafiği.

Tablo 4.13. Boş hidrojel ve lipozom/lipopleks yüklü hidrojel mekanik dayanım testi sonuçları (ort. $\pm$ SS).

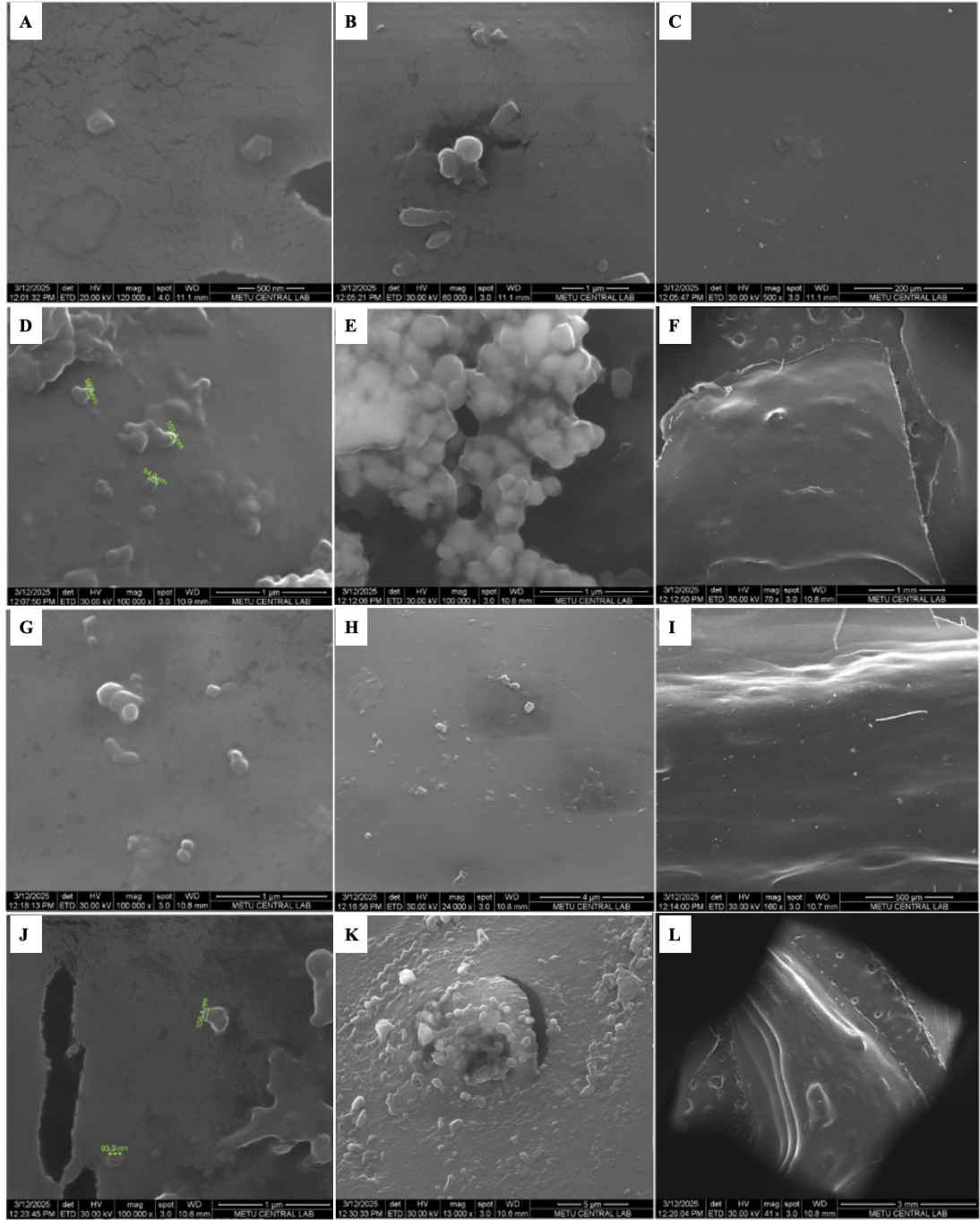
	Maksimum Yük (N)	Maksimum Yükteki Uzama (mm)	Uzamada Kırılma (Standart) (mm)	Maksimum Gerinim (MPa)	Maksimum Gerinim (mm/mm)
Boş Hidrojel İskele	11,12 $\pm$ 8,26	5,44 $\pm$ 2,80	8,77 $\pm$ 2,88	1,55 $\pm$ 1,15	0,29 $\pm$ 0,15
Lipozom/ Lipopleks Yüklü Hidrojel İskele	62,10 $\pm$ 6,13	1,00 $\pm$ 0,62	1,90 $\pm$ 0,93	8,67 $\pm$ 0,86	0,05 $\pm$ 0,033

4.7.5. Çok Katmanda Por Geometrisi Tayini

Boş ve lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelelerin 1., 2., 3., 4. Katmanlarının SEM görüntüleri Şekil 4.33.-4.34.'te yer almaktadır.



Şekil 4.33. Boş hidrojel iskelesinin katmanlarına ait SEM görüntüleri. **A-B)** 1. katman, **C-D)** 2. katman, **E-F)** 3. katman, **G-H)** 4. katman. Ölçek çubukları: 200 µm olan C paneli hariç, 1. panel için 20 µm; 2. panel için ise 2 mm.

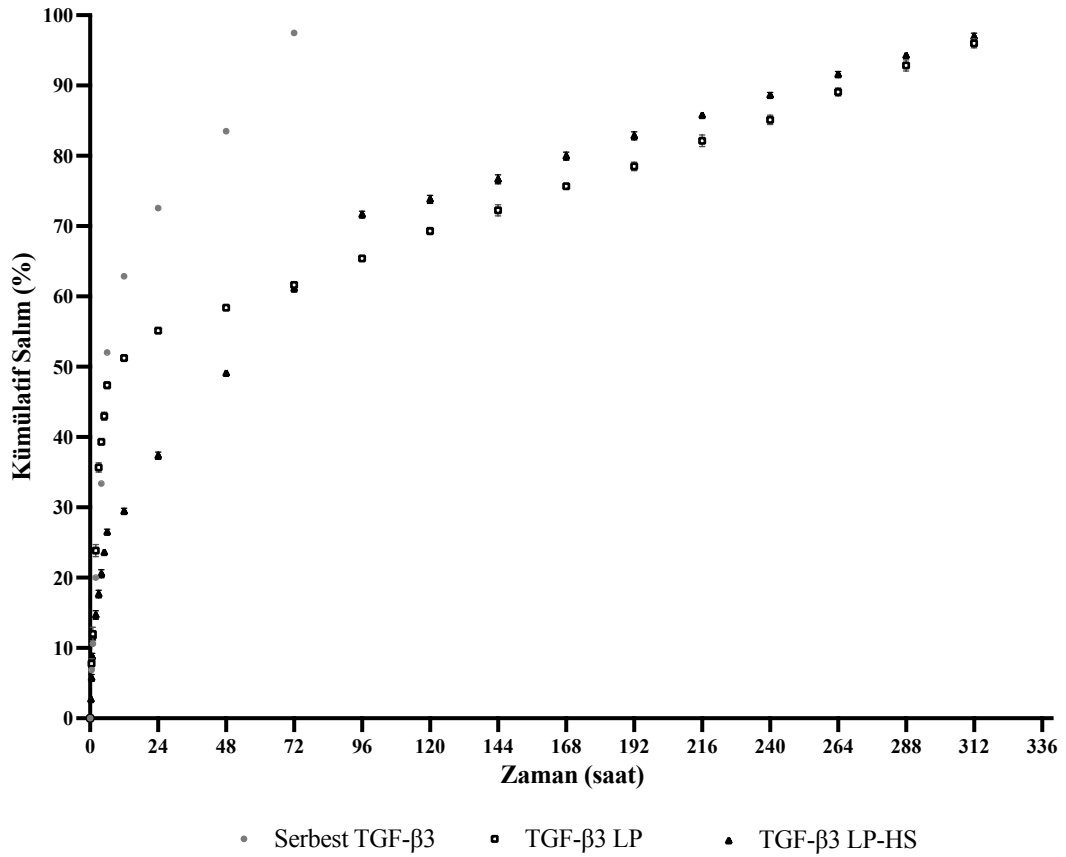


Şekil 4.34. Lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelesinin katmanlarına ait SEM görüntüleri. **A-B-C)** 1. katman, **D-E-F)** 2. katman, **G-H-I)** 3. katman, **J-K-L)** 4. katman. Ölçek çubukları: (A) 500 nm; (B, D, E, G, J) 1 µm; (C) 200 µm; (F) 1 mm; (H) 4 µm; (I) 500 µm; (K) 5 µm; (L) 3 mm.

Lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelelerinin SEM görüntüleri, partikül büyüklüğü belirleme ve lipozomların morfolojik analizi yoluyla lipozomların hidrojel iskele formülasyonuna dahil edildiğini doğrulamıştır.

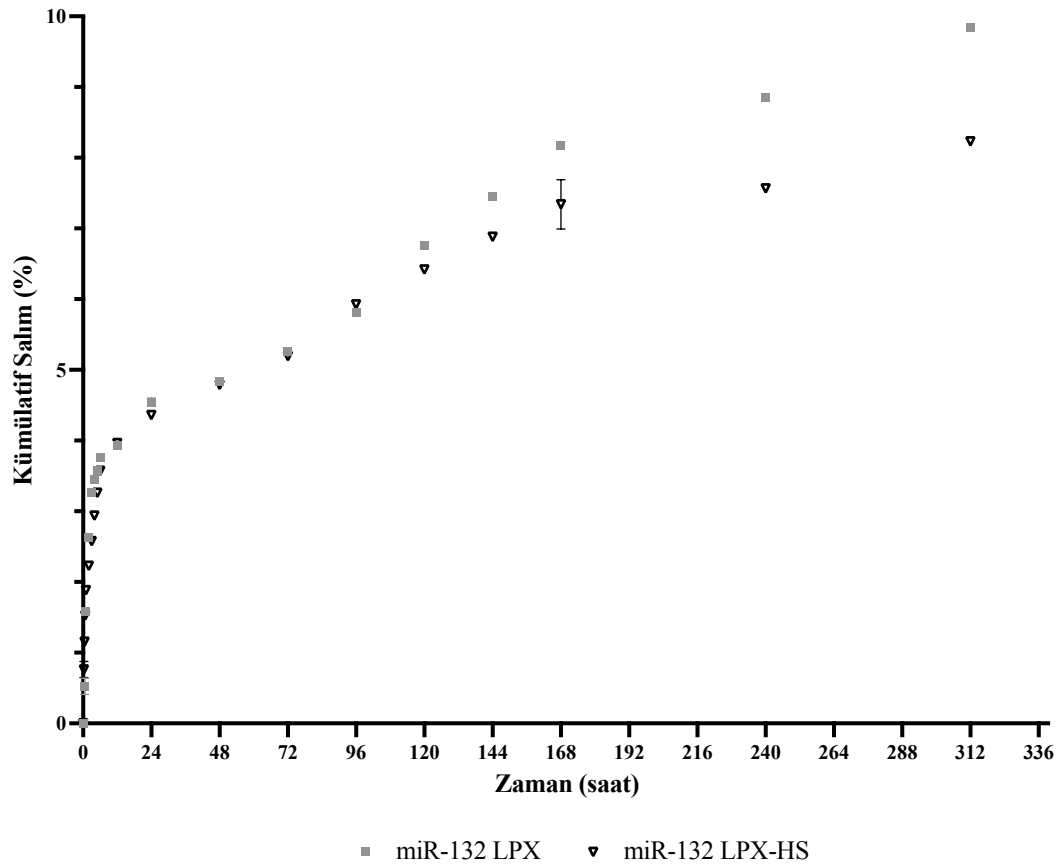
4.8. Lipozom/Lipopleks Yüklü Hidrojel İskelelerdeki TGF- β 3 ve miR-132'nin *in vitro* Salım Çalışmaları

TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS formülasyonundan TGF- β 3 ve miR-132 *in vitro* salım profilleri Şekil 4.35.-4.36.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.35. TGF- β 3 LP-HS ve TGF- β 3 LP'nin *in vitro* salım profili (n=3, ort. $\pm$ SS).

Hidrojel iskeledeki TGF- β 3 içeriğinin tamamı yaklaşık 336 saat içinde salınmıştır. TGF- β 3 LP'den toplam $96,64 \pm 0,64$ 'ü 312 saat içinde salınmıştır. Serbest TGF- β 3'ün tamamı yaklaşık 72 saatte salınmıştır. Bu sonuçlar, TGF- β 3 LP'nin hidrojel iskeleye yüklenmesinin salım süresini uzattığını göstermektedir.



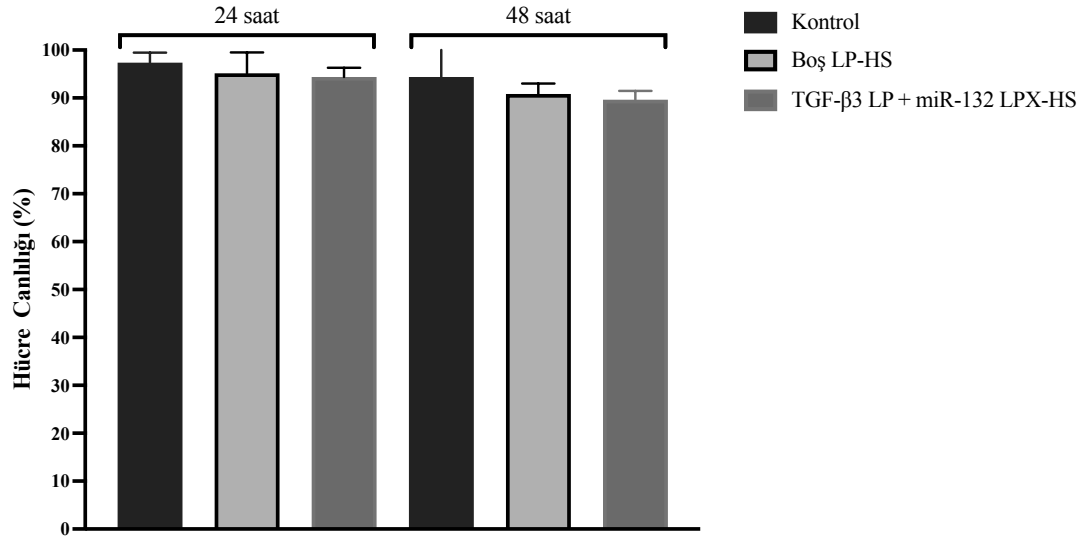
Şekil 4.36. miR-132 LPX-HS ve miR-132 LPX'nin *in vitro* salım profili (n=3, ort. $\pm$ SS).

Hidrojel iskeledeki miR-132'nin $2,03 \pm 0,004$ 'ünün ilk 4 saat içinde ortama salınmıştır. 168. saatin sonunda kümülatif salım $7,34 \pm 0,35$ 'e, 312. saatin sonunda ise $8,23 \pm 0,001$ 'e ulaşmıştır. Lipopleks içerisindeki miR-132 ise ilk 4 saat içinde $3,46 \pm 0,001$, 168 ve 312. saatlerde ise sırasıyla $8,17 \pm 0,02$ ve $9,84 \pm 0,004$ oranında salınmıştır. Serbest miR-132'nin toplam miktarı ilk 3 saat içinde salınmıştır.

Bu bulgular, hidrojel iskeleye yüklenen miR-132 LPX'in 312 saate kadar kontrollü ve kademeli bir salım profili sergilediğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur (168). Bu sonuçlar ayrıca miR-132 LPX'in hidrojel iskelesine yüklenmesinin salım süresini uzattığını göstermektedir.

4.9. Lipozom/Lipopleks Yüklü Hidrojel İskelelerin *in vitro* Hücre Canlılık Testi

in vitro hücre canlılık testi sonuçları Şekil 4.37.'de gösterilmiştir.

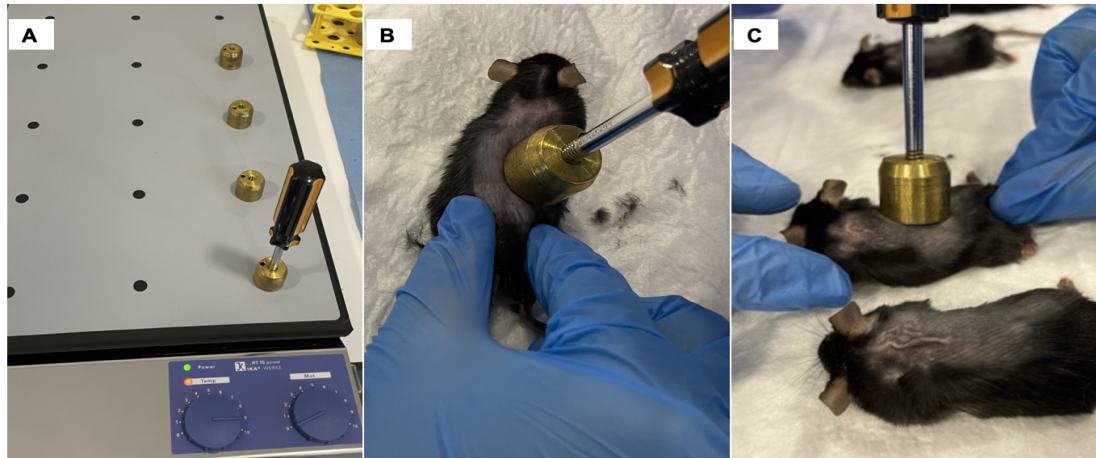


Şekil 4.37. Boş LP-HS ve TGF-β3 LP + miR-132 LPX-HS'nin 24 ve 48. saatlerdeki *in vitro* hücre canlılık testi sonuçları (n=3, ort. ± SS).

Kontrol ile karşılaştırıldığında, 24 ve 48 saatte boş LP-HS ve TGF-β3 LP + miR-132 LPX-HS arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,05$).

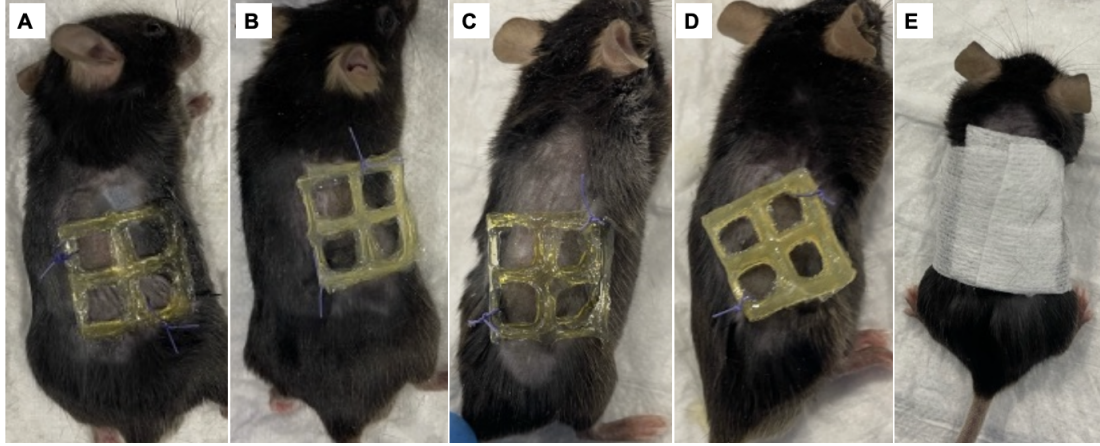
4.10. *in vivo* Hayvan Deneyleri

Şekil 4.38.'de, *in vivo* deneylerde farelerde yanık modelinin oluşturulması gösterilmektedir.



Şekil 4.38. Farelerde ikinci derece yanık modelinin oluşturulması. A) Yanık oluşturmak için kullanılan metal pirinç şablonun 100 °C'ye ısıtılması. B–C) Isıtılmış metal şablonun farelerin dorsal bölgesine uygulanarak standart yanık alanının oluşturulması.

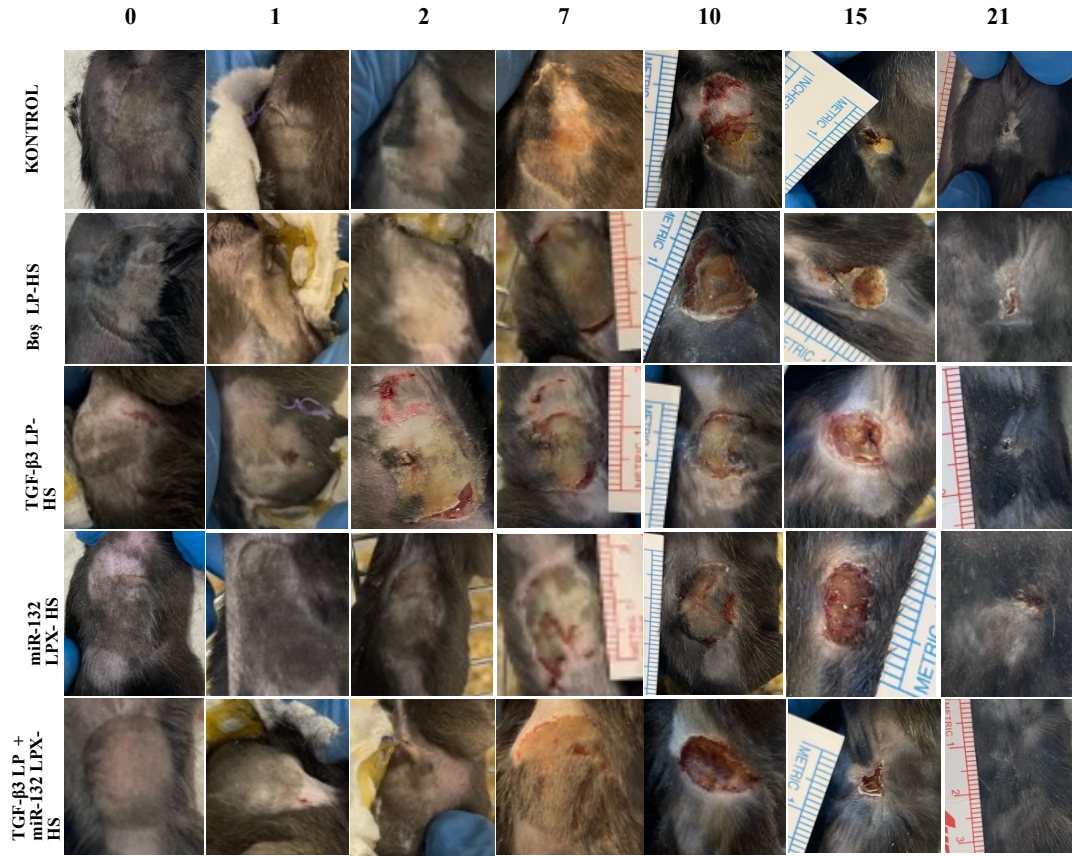
Şekil 4.39.'da ise hidrojel iskele uygulamasının ardından pansuman yapılan farelerin görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 4.39. A) Boş LP-HS. B) TGF- β 3 LP-HS. C) miR-132 LPX-HS. D) TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS hidrojel iskelelerin uygulanması. E) Hidrojel iskele yerleştirildikten sonra pansuman yapılan fare görüntüsü.

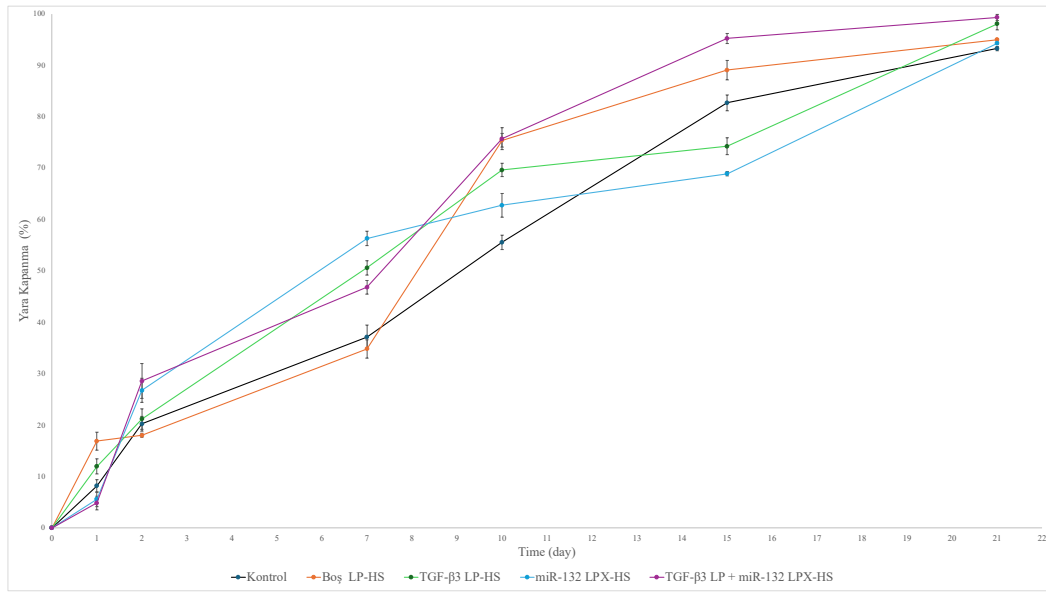
4.10.1. Yara Kapanmasının Görsel Gözlemi

Şekil 4.40.'da yanık ve tedavi gruplarında 0, 1, 2, 7, 10, 15 ve 21. günlerde yara iyileşme sürecinin görsel değerlendirmesine ait görüntüler yer almaktadır.



Şekil 4.40. Yara kapanmasının görsel gözlemi. Yalnızca yanık modeli oluşturulan grubu (kontrol) ile boş LP-HS, TGF- β 3 LP-HS, miR-132 LPX-HS ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS gruplarındaki farelerin yanık yaralarına ait 0., 1., 2., 7., 10., 15. ve 21. günlerde elde edilen görüntüler.

Kontrol ve tedavi grupları için zaman içindeki yara kapanma yüzdesini gösteren grafik Şekil 4.41.'de sunulmuştur. Tüm gruplarda makroskobik olarak yara kapanmasının %80–100 düzeyine ulaştığı 21. günde hayvanların sakrifikasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.41. Zaman karşı yara kapanma yüzdesi grafiği. Yanık modelindeki farklı tedavi gruplarında yara kapanma yüzdesi (%), başlangıçtaki yara alanına göre normalize edilerek (ImageJ kullanılarak) hesaplanmıştır (n=6, ort. ± SS). Kontrol grubu siyah, boş LP-HS turuncu, TGF-β3 LP-HS yeşil, miR-132 LPX-HS mavi ve TGF-β3 LP + miR-132 LPX-HS ise mor çizgilerle gösterilmiştir.

Yara kapanma yüzdelерinin zamana bağlı değişimi iki yönlü RM ANOVA ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçları, zamanın yara kapanması üzerinde anlamlı bir etkisi olduğunu göstermiştir (Zaman etkisi: $P < 0,0001$). Ayrıca, tedavi grupları arasında genel olarak anlamlı farklılıklar saptanmış (Tedavi etkisi: $P < 0,0001$) ve zaman ile tedavi arasındaki etkileşimin de istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Zaman × Tedavi etkileşimi: $P < 0,0001$).

Bu bulgular, yara iyileşme sürecinin yalnızca zamana değil, uygulanan tedaviye ve tedavinin zamana bağlı etkisine göre değiştiğini göstermektedir. Aynı hayvanların zaman içinde izlenmesi nedeniyle tekrarlı ölçüm yapısına uygun olarak Geisser–Greenhouse düzeltmeli iki yönlü RM ANOVA kullanılmıştır.

Zaman noktasına özgü çoklu karşılaştırmalarda, erken dönemde (2. gün) yara kapanma yüzdesinin TGF-β3 LP + miR-132 LPX içeren hidrojel iskele tedavi grubunda kontrol grubuna kıyasla arttığı belirlenmiştir ($P = 0,0036$).

İkinci günde miR-132 LPX-HS ve TGF-β3 LP + miR-132 LPX-HS gruplarında yara kapanma yüzdesinin boş LP-HS grubuna kıyasla daha yüksek olduğu

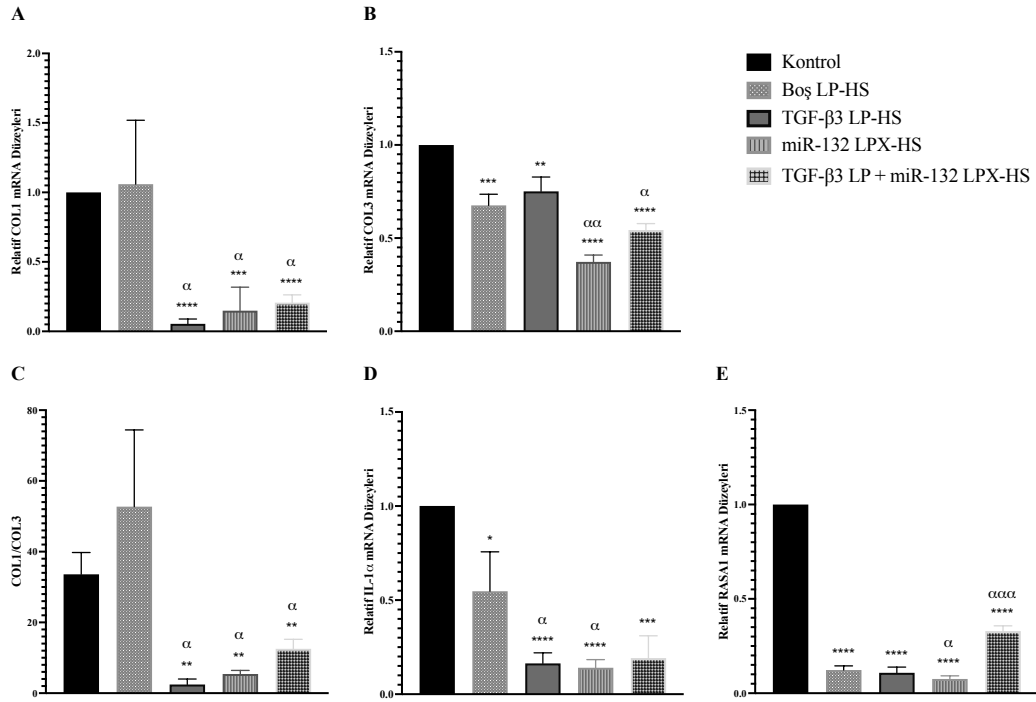
belirlenmiştir ($P<0,05$). Yedinci günde, TGF- β 3 LP-HS (*), *miR-132 LPX-HS* (**) ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS (*) gruplarının yara kapanma yüzdesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir ($P<0,05$). Aynı zaman noktasında, TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS (*) grubunun yara kapanma yüzdesinin miR-132 LPX-HS grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Aynı zaman noktasında, TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS (*) grubunun yara kapanma yüzdesinin miR-132 LPX-HS grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$).

Onuncu günde, TGF- β 3 LP-HS (**), miR-132 LPX-HS (*) ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS (***) gruplarının yara kapanma yüzdesinin kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür. Aynı zamanda TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS grubunda yara kapanma yüzdesinin, hem TGF- β 3 LP-HS (*) hem de miR-132 LPX-HS (**) gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptanmıştır ($P<0,05$). On beşinci günde ise, TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS grubunun yara kapanma yüzdesinin kontrol (*), TGF- β 3 LP-HS (**) ve miR-132 LPX-HS (**) gruplarına kıyasla anlamlı biçimde arttığı belirlenmiştir ($P<0,05$).

4.10.2. Doku RT-qPCR Analizi

Her gruptaki 6 hayvandan alınan yanık yara dokusu örnekleri histolojik analiz için ayrılmış; daha sonra, α -SMA, tip I kolajen, tip III kolajen, RASA1 ve IL-1A genlerinin ve proteinlerinin ekspresyon seviyeleri İHK ve biyokimyasal analiz kapsamında değerlendirilmiştir.

Doku örneklerinden izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-qPCR analizinden elde edilen COL1, COL3, IL-1 α , RASA1 ve tip 1/3 kolajen (COL1/COL3) oranının gen düzeyindeki ekspresyon seviyeleri Şekil 4.42.'de sunulmuştur. COL1/COL3 oranı her örnek için $2^{-(CtCOL1-CtCOL3)}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.42. Kontrol ve tedavi gruplarında gen ekspresyon düzeyleri (n=6). **A)** COL1, **B)** COL3, **C)** COL1/COL3 oranı, **D)** IL-1α, **E)** RASA1. Tedavi grupları, kontrol ve boş LP-HS gruplarına kıyasla fibrozis ve inflamasyonla ilişkili gen ifadelerini farklı şekillerde modüle etmiştir. Veriler ort. ± SS olarak sunulmuştur (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001 kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farkı; α P<0,05, αα P<0,01, ααα P<0,001 boş LP-HS grubuna kıyasla anlamlı bir farkı belirtmektedir).

Kontrol ve Boş LP-HS grupları arasında gen düzeyinde COL1 ekspresyonunda anlamlı bir fark bulunamamıştır (P>0,05). TGF-β3 LP-HS (***), miR-132 LPX-HS (***) ve TGF-β3 LP + miR-132 LPX-HS (****) gruplarında, gen düzeyinde COL1 ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır. Gen düzeyindeki COL1 ekspresyonu, Boş LP-HS grubuna kıyasla TGF-β3 LP-HS (α), miR-132 LPX-HS (α) ve TGF-β3 LP + miR-132 LPX-HS (α) gruplarında azalmıştır.

Gen düzeyindeki COL3 ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla Boş LP-HS (***), TGF-β3 LP-HS (**), miR-132 LPX-HS (****) ve TGF-β3 LP + miR-132 LPX-HS (****) gruplarında azalmıştır. TGF-β3 LP-HS grubu ile Boş LP-HS grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (P>0,05). Gen düzeyindeki COL3 ekspresyonu, Boş LP-HS grubuna kıyasla miR-132 LPX-HS (αα) ve TGF-β3 LP + miR-132 LPX-HS (α) gruplarında azalmıştır.

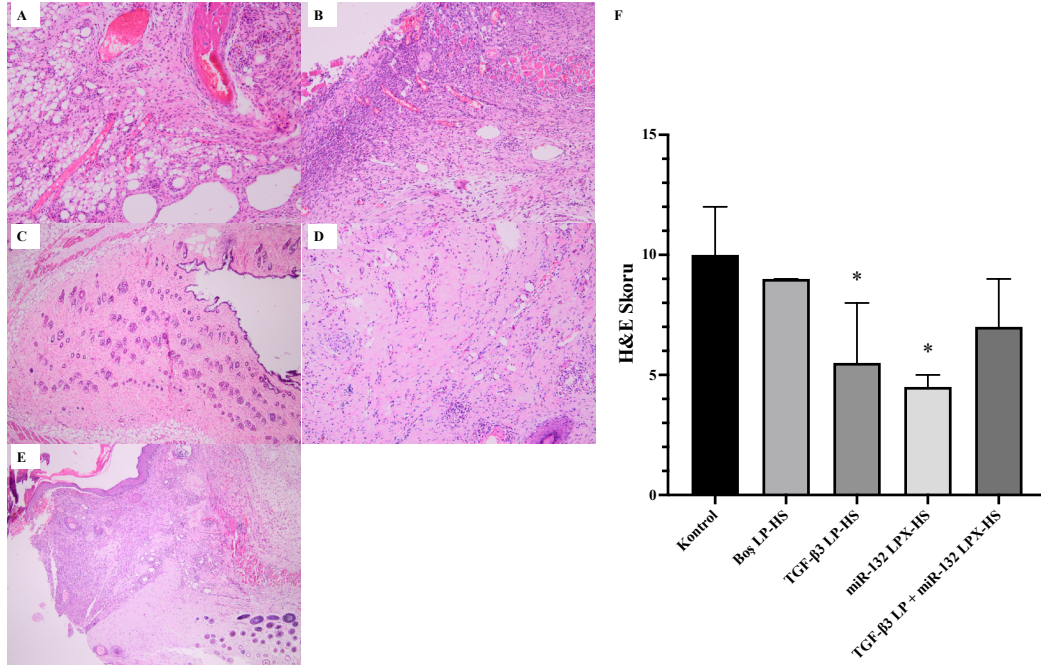
Boş LP-HS grubu ile kontrol grubu arasında COL1/COL3 oranında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). COL1/COL3 oranı, kontrol grubuna kıyasla TGF- β 3 LP-HS (**), miR-132 LPX-HS (**) ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS (**) gruplarında azalmıştır. COL1/COL3 oranı, boş LP-HS grubuna kıyasla TGF- β 3 LP-HS (α), miR-132 LPX-HS (α) ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS (α) gruplarında azalmıştır.

Gen düzeyindeki IL-1 α ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla Boş LP-HS (*), TGF- β 3 LP-HS (****), miR-132 LPX-HS (****) ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS (***) gruplarında azalmıştır. TGF- β 3 LP-HS (α) ve miR-132 LPX-HS (α) gruplarında, Boş LP-HS grubuna kıyasla gen düzeyinde IL-1 α ekspresyonu azalmıştır. TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS grubu ile Boş LP-HS grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

Boş LP-HS (****), TGF- β 3 LP-HS (****), miR-132 LPX-HS (****) ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS (****) gruplarında, kontrol grubuna kıyasla gen düzeyinde RASA1 ekspresyonu azalmıştır. TGF- β 3 LP-HS grubu ile Boş LP-HS grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). miR-132 LPX-HS (α) grubunda, RASA1 gen düzeyindeki ekspresyonu, Boş LP-HS grubuna kıyasla azalmıştır. TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS ($\alpha\alpha\alpha$) grubunda ise RASA1 gen düzeyindeki ekspresyonu, Boş LP-HS grubuna kıyasla artmıştır.

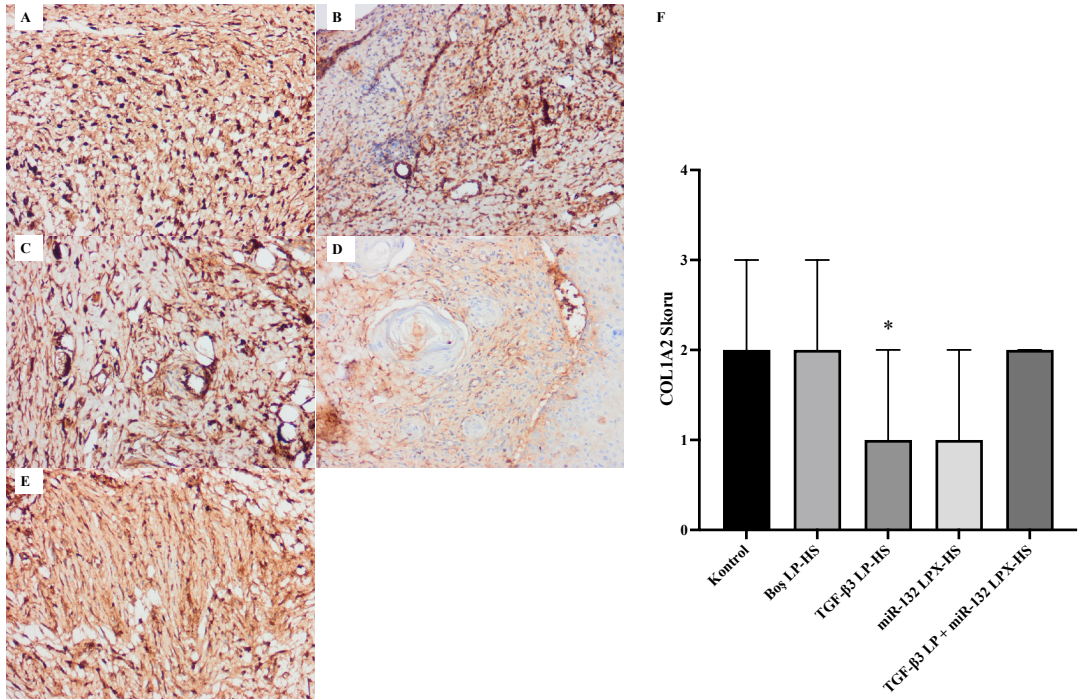
4.10.3. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler

Yanık yara dokularının H&E boyalı mikroskopik görüntülerinden ve histolojik incelemelerinden elde edilen yarı kantitatif skor analizi Şekil 4.43.'te sunulmuştur. Boş LP-HS ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS gruplarının H&E skorları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$). TGF- β 3 LP-HS (*) ve miR-132 LPX-HS (*) gruplarında H&E skorları kontrol grubuna göre azalmıştır.



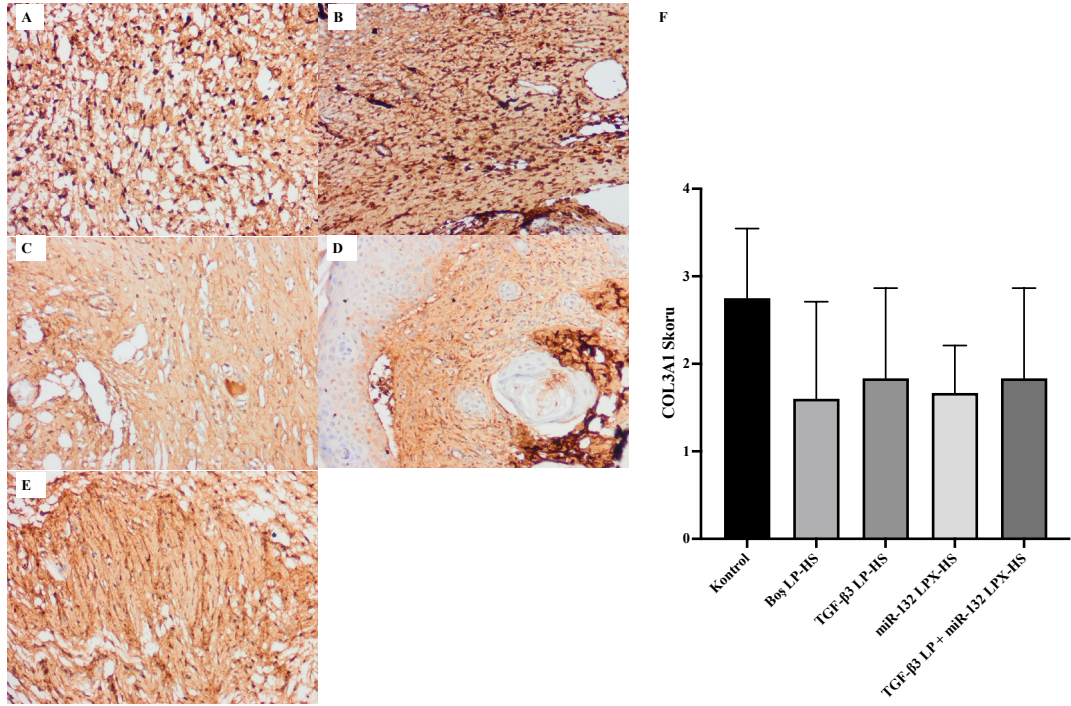
Şekil 4.43. H&E boyaması ve yarı kantitatif skor analizi (n=6). **A)** Kontrol. **B)** Boş LP-HS. **C)** TGF- β 3 LP-HS. **D)** miR-132 LPX-HS. **E)** TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS. **F)** H&E skorları. Veriler medyan (%95 güven aralığı (GA)) olarak sunulmuştur (*P<0,05 kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farkı belirtmektedir).

COL1A2, COL3A1, IL-1 α ve α -SMA immün boyamasının İHK görüntüleri ve yarı kantitatif analizi sırasıyla Şekil 4.44.-4.47.'de sunulmuştur.



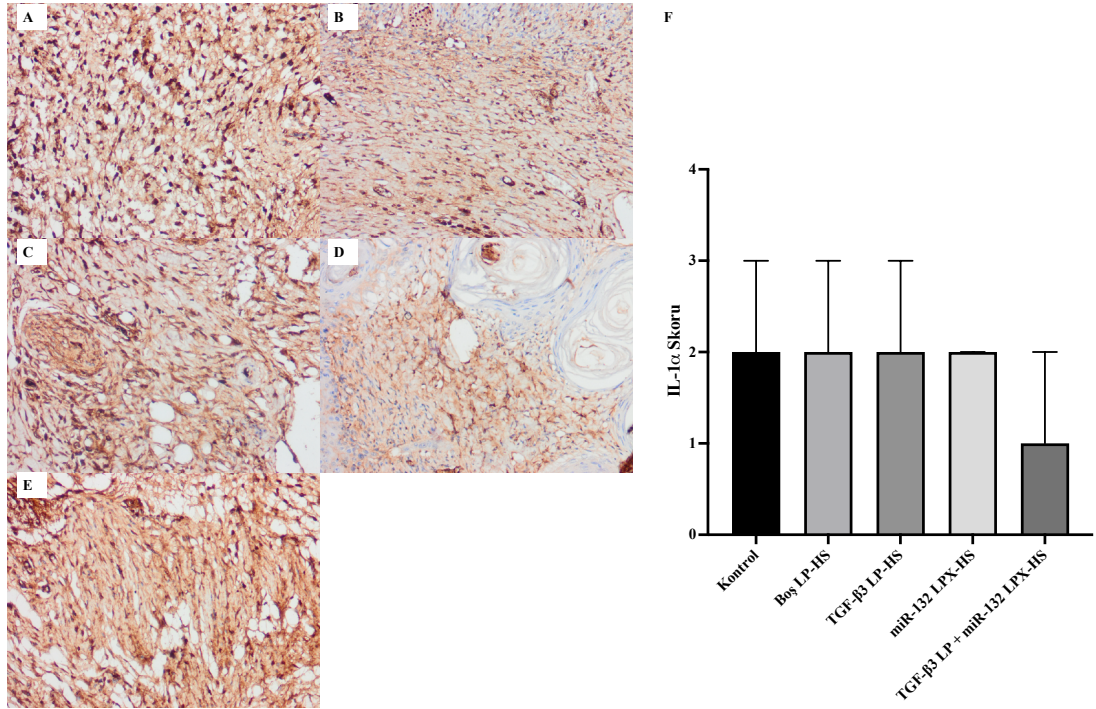
Şekil 4.44. COL1A2 İHK boyaması ve yarı kantitatif skor analizi (n=6). **A)** Kontrol. **B)** Boş LP-HS. **C)** TGF-β3 LP-HS. **D)** miR-132 LPX-HS. **E)** TGF-β3 LP + miR-132 LPX-HS. **F)** COL1A2 yarı kantitatif skorları. Veriler medyan (%95 GA) olarak sunulmuştur (*P<0,05 kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farkı belirtmektedir).

Kontrol grubu ile Boş LP-HS, miR-132 LPX-HS ve TGF-β3 LP + miR-132 LPX-HS grupları arasında COL1A2 skorlarında anlamlı bir fark bulunamamıştır (P>0,05). TGF-β3 LP-HS grubunda (*), COL1A2 skoru kontrol grubuna göre azalmıştır.



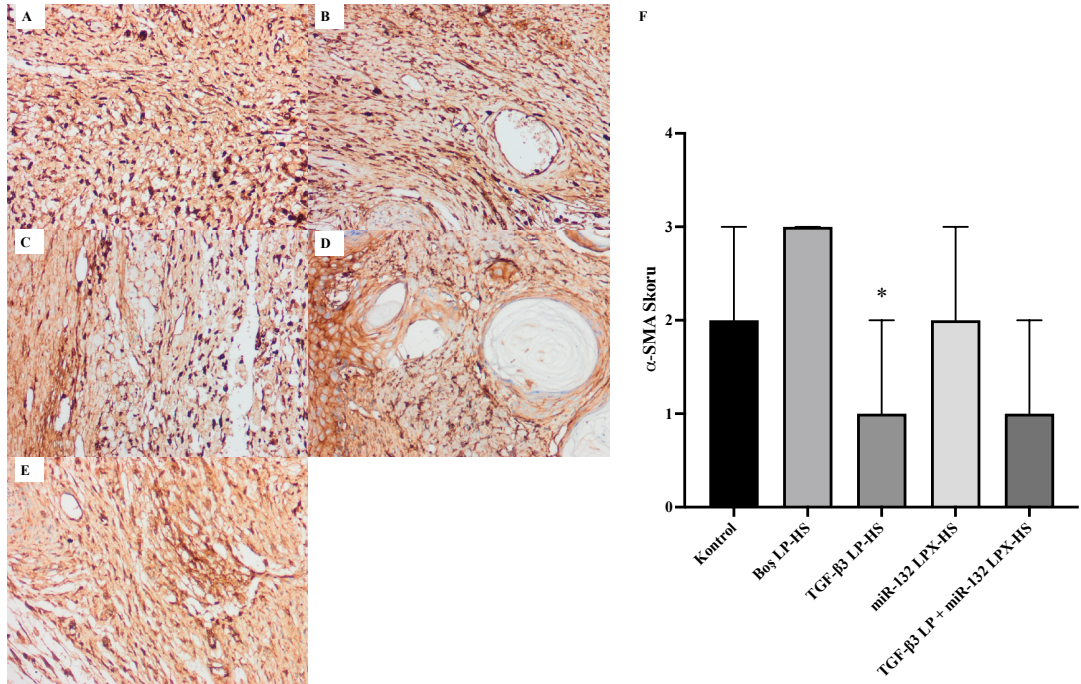
Şekil 4.45. COL3A1 İHK boyaması ve yarı kantitatif skor analizi (n=6). **A)** Kontrol. **B)** Boş LP-HS. **C)** TGF-β3 LP-HS. **D)** miR-132 LPX-HS. **E)** TGF-β3 LP + miR-132 LPX-HS. **F)** COL3A1 yarı kantitatif skorları. Veriler medyan (%95 GA) olarak sunulmuştur.

Boş LP-HS, TGF-β3 LP-HS, miR-132 LPX-HS ve TGF-β3 LP + miR-132 LPX-HS grupları ile kontrol grubu arasında COL3A1 skorlarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).



Şekil 4.46. IL-1 α İHK boyaması ve yarı kantitatif skor analizi (n=6). **A)** Kontrol. **B)** Boş LP-HS. **C)** TGF- β 3 LP-HS. **D)** miR-132 LPX-HS. **E)** TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS. **F)** IL-1 α yarı kantitatif skorları. Veriler medyan (%95 GA) olarak sunulmuştur.

Boş LP-HS, TGF- β 3 LP-HS, miR-132 LPX-HS ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS grupları ile kontrol grubu arasında IL-1 α skorlarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0,05$).



Şekil 4.47. α -SMA İHK boyaması ve yarı kantitatif skor analizi (n=6). **A)** Kontrol. **B)** Boş LP-HS. **C)** TGF- β 3 LP-HS. **D)** miR-132 LPX-HS. **E)** TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS. **F)** α -SMA yarı kantitatif skorları. Veriler medyan (%95 GA) olarak sunulmuştur (*P<0,05 kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farkı belirtmektedir).

Boş LP-HS, miR-132 LPX-HS ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS grupları ile kontrol grubu arasında α -SMA skorlarında anlamlı bir fark bulunamamıştır (P>0,05). TGF- β 3 LP-HS grubunda (*), α -SMA skoru kontrol grubuna göre azalmıştır.

5. TARTIŞMA

Yanık yaralarının karmaşık patofizyolojisi nedeniyle inflamasyonu, anjiyogenezi ve fibrozisi aynı anda hedefleyebilen tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (4). Bu bağlamda, antiinflamatuvar ve proanjiyojenik etki gösteren miR-132 ile antifibrotik özellikleriyle bilinen TGF- β 3'ün kombine kullanımının, yara iyileşmesini hızlandırırken skar oluşumunu azaltan sinerjistik bir etki oluşturabileceği öngörülmektedir. miR-132 ve TGF- β 3 kombinasyonunun birbirini tamamlayıcı etki mekanizmalarıyla fibrotik kaskadı hedefleyerek, TGF- β 3'ün bilinen antifibrotik potansiyeline rağmen klinik çalışmalarda bildirilen sınırlı ve tutarsız etkinliğinin aşılmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (4). Bu doğrultuda, bu tez kapsamında TGF- β 3 LP ve miR-132 LPX yüklü 3B kitosan bazlı hidrojel iskelelerin geliştirilmesi ve bu sistemlerin yanık yaralarının tedavisindeki terapötik potansiyelinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Biyoaktif bileşiklerin kombine edildiği nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemler, yara iyileşmesinde sinerjik etkiler sergilemiştir. Mercy ve ark. (174), antioksidan, anti-inflamatuvar ve antimikrobiyal özelliklere sahip biyoaktif bileşiklerle yüklü aljinat/jelatin hidrojellerin 72 saat içinde %98 oranında *in vitro* yara kapanımı sağladığını ve sadece nanosilver içeren formülasyonlara (%56 kapanım) kıyasla önemli ölçüde daha iyi performans gösterdiğini bildirerek kombine ilaç dağıtım sistemlerinin faydalarını vurgulamıştır (174).

Önceki çalışmalarda, miRNA'ların ve büyüme faktörü ile ilişkili terapötiklerin birlikte verilmesi için çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler araştırılmıştır. miRNA'ların ve büyüme faktörlerinin birlikte verilmesine ilişkin sınırlı sayıdaki çalışma arasında, Hu ve ark. (175), yara iyileşmesi amacıyla miR-145 ve PDGF-BB ile yüklü bir poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)-lipozom hibrit elektrospun fiber sistemi geliştirmiştir (175). Bu çalışmada, miRNA elektrospun fiber matrisi içine kapsüllenirken, PDGF-BB ise fiberlerin içine gömülü lipozomlara dahil edilmiştir. Bu sayede her iki ilacın da sırayla salınması sağlanmıştır. Ancak, çok aşamalı üretim süreci ve yoğun fiber yapısının, hücresel infiltrasyon ve oksijen difüzyonu açısından zorluklar yaratabileceği bildirilmiştir.

Nie ve ark. (176), miyokard enfarktüsünde miR-499 ve VEGF kodlayan plazmid DNA'nın salımı için lipozom içermeyen bir Hep@PGEA nanokompleksi kullanmışlardır. Polimerik nanokompleksler, kardiyak rejenerasyon modellerinde miRNA'ların ve VEGF'yi kodlayan plazmid DNA'nın eşzamanlı salınımını mümkün kılmıştır (176). Ayrıca, Torreggiani ve ark. (177), trombosit kaynaklı ekzozomların sadece fonksiyonel küçük RNA'ları değil, aynı zamanda çok sayıda büyüme faktörünü de taşıdığını göstermiş ve bu bulguyla kombine tedaviler için biyolojik bir gerekçe sunmuştur (177).

Bu çalışmaların tamamı, rejeneratif yolların terapötik olarak modüle edilmesinde nükleik asitler ile büyüme faktörü sinyallerinin bir arada verilmesinin faydalı olabileceğini göstermektedir. Bu sistemlerin umut verici rejeneratif sonuçlar göstermesiyle beraber, aktif içerik stabilitesi, yükleme verimliliği ve salımın uzamsal-zamansal kontrolü konusundaki kısıtlamalar devam etmektedir. Polimerik fiber ve nanokompleks sistemleriyle karşılaştırıldığında, lipozomal/lipopleks formülasyonları, nükleik asitlerin kolayca kapsüllenmesi, miRNA'ların enzimatik bozunmadan korunması ve tek bir taşıyıcı sistem içerisinde biyolojik olarak aktif moleküllerin yüklenebilmesi gibi çeşitli pratik avantajlar sunmaktadır (131). Bu çalışmalar, miRNA ve büyüme faktörü yollarının birleştirilmesinin terapötik potansiyelini desteklemekte ve bu stratejinin özellikle yanık yarası tedavisine uygulanmasının yenilikçiliğini vurgulamaktadır.

Lipozom/lipopleks formülasyonları, aktif maddenin stabilitesi, yükleme verimliliği ve salımın uzamsal-zamansal kontrolü açısından sınırlamalarla karşı karşıya kalan polimerik liflere, nanokomplekslere veya ekzozomlara dayalı önceki kombine ilaç dağıtım sistemlerinden farklı olarak, tek bir mikroakışkan platform içinde her bir aktif içeriğin bağımsız olarak optimize edilmesini sağlamıştır.

TGF- β 3, mikroakışkan çip kullanılarak enkapsüle edilirken, miR-132 kontrollü bir N/P oranında sulu bir ortamda önceden optimize edilmiş katyonik lipozomlara bağlanmaktadır. Lipozom özellikleri (partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli) öncelikle optimize edilip karakterize edildikten sonra, uygun koşullar altında miRNA ile kontrollü kompleks oluşturulmaktadır. Bu iki aşamalı strateji, literatürde nükleik asit iletimi için iyi bilinen bir yöntemdir (178).

Nükleik asit taşınmasında sağladıkları avantajlara rağmen, katyonik lipozomların yaygın olarak bildirilen sınırlamaları bulunmaktadır. Katyonik lipidlerin pozitif yüzey yükü, negatif yüklü miRNA ile elektrostatik kompleks oluşumunu kolaylaştırırken, yüksek konsantrasyonlarda hücre zarı bütünlüğünü bozarak sitotoksisiteye yol açabileceği bildirilmiştir (179). Katyonik lipozomlar ayrıca kompleman sistemini aktive ederek, potansiyel olarak kompleman aktivasyonuna bağlı psödoalerjiyi (CARPA) tetikleyebilir; sistemik uygulama durumunda ise hızla opsonize edilir ve mononükleer fagosit sistemi (MPS) tarafından ortadan kaldırılırlar (94, 180).

Bu tez kapsamında, formülasyonun dolaşım süresini uzatmak ve sterik stabilizasyon sağlamak amacıyla PEGile lipozom formülasyonları geliştirilmiştir (93). Ancak PEGile taşıyıcıların tekrarlı intravenöz uygulanması, anti-PEG antikollarının aracılık ettiği hızlandırılmış kan klirensi (ABC) fenomenini tetikleyerek, sonraki dozlarda terapötik etkinliği azalmasına yol açmaktadır (94). Mevcut çalışmada, lipozom/lipopleks formülasyonları doğrudan yara bölgesine lokal uygulama amacıyla tasarlanmıştır. Lokal tedavi, hedef bölgede yüksek ilaç konsantrasyonu sağlarken, sistemik dolaşımı ve bununla ilişkili yan etkileri büyük ölçüde önlemektedir (181). Ayrıca, formülasyondaki yardımcı lipidler olan DOPC ve CHOL, yüzey yük yoğunluğunu düzenlemeye ve çift tabakayı stabilize etmeye yardımcı olmaktadır.

Faktöriyel tasarım analizi, partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli üzerindeki baskın etkinin DOTMA-CHOL etkileşiminden kaynaklandığını, CHOL'un ise en büyük ana etki katkısına sahip olduğunu göstermiştir. CHOL molar oranının artırılması ortalama partikül büyüklüğünü azaltırken, DOPC oranının artırılması bunu düşük oranda artırmıştır. Tek başına DOTMA'nın partikül büyüklüğü üzerinde anlamlı bir ana etkisi olmamıştır.

PDI açısından en büyük ana etkinin CHOL faktörü olduğu belirlenmiştir. Daha yüksek CHOL oranları PDI değerlerini azaltmıştır. Mekanizma açısından bakıldığında, CHOL, yağ asitleriyle hidrojen bağı kurarak membran kohezyonunu artırır ve böylece membran akışkanlığını ve geçirgenliğini düzenler (182, 183). Optimal CHOL oranları, lipid paketlenmesini iyileştirerek daha kompakt ve kararlı

partiküller oluşmasını sağlamaktadır. Ancak, aşırı CHOL, çift tabakanın viskozitesini artırabilir, kararlılığı azaltabilir ve agregasyonu teşvik edebilir (184).

Zeta potansiyeli açısından en baskın etki DOTMA–CHOL etkileşiminden kaynaklanmıştır. Ana etki düzeyinde ise, daha düşük CHOL oranları zeta potansiyelini artırırken, daha yüksek oranlar ise zeta potansiyelini azaltmıştır. Bu durumun katyonik sistemlerdeki çift tabakanın yeniden düzenlenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (184, 185). Artık analizleri, test edilen deneysel aralık içinde zeta potansiyeli için açıklayıcı gücün diğer DOE faktörlerine kıyasla daha sınırlı olduğunu ortaya koymuştur.

DOE sonuçları, partikül büyüklüğü ve PDI değerlerinin ağırlıklı olarak DOTMA–CHOL etkileşimleri tarafından belirlendiğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar bileşenler arası optimizasyonun önemini vurgulamaktadır. En düşük partikül boyutu, DOTMA6–CHOL10 etkileşiminde gözlemlenmiştir. Yaklaşık 40 mV'lık zeta potansiyeline sahip olması nedeniyle, 6–1–10 (F5) ve 6–2–10 (F22) formülasyonları arasında F22 optimal formülasyon olarak seçilmiştir.

Parti-parti tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi için F22 formülasyonu beş bağımsız üretimde (n=5) hazırlanmış ve ortalama $102,9 \pm 13,43$ nm büyüklük (göreceli standart sapma (RSD) %13,05) ile $0,227 \pm 0,049$ PDI değeri elde edilmiştir. Bu değerler, benzer koşullar altında (n=3) mikroakışkan karıştırma yöntemiyle üretilen PC:Chol lipozomları için $107,9 \pm 14,1$ nm büyüklük (RSD %13,1) bildiren Dimov ve ark. (128) tarafından rapor edilen değerlerle tutarlıdır (128). Aynı çalışmada, daha basit iki bileşenli bir katyonik lipozom formülasyonu (DOPE: DOTAP) yalnızca %3,0 RSD göstermiştir. Bu çalışmalar doğrultusunda mevcut formülasyonun (DOTMA/DOPC/CHOL/DSPE-mPEG2000) daha kompleks bileşenli olmasının gözlemlenen varyasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir (128).

Bu çalışmanın bir diğer sınırlaması, her bir formülasyonun temel bir mikroakışkan çip kullanılarak laboratuvar ölçeğinde üretilmiş olmasıdır. Küçük hacimlerde (1 mL, toplam 15 μ mol lipid), mikroakışkan kanallarda yaklaşık 4,5 μ mol lipid kalmaktadır; bu da %30'luk bir kayba karşılık gelmektedir. Aynı çip daha büyük bir hacimle (5 mL, toplam 75 μ mol lipid) sürekli olarak çalıştırıldığında, aynı kayıp toplamın yalnızca %6'sına karşılık gelmektedir. Lipid veriminin artmasının ve büyük

ölçekli üretimin hem partikül büyüklüğü hem de PDI değerlerini iyileştirdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, mikroakışkan çiplerde seri üretimin başlangıç ve kapanış aşamalarına bağlı kayıpları en aza indirdiğini ve küçük hacimli üretimlerde toplam işleme süresinin daha büyük bir bölümünü oluşturan bu aşamalardan kaynaklanan kalite değişkenliğini azalttığını bildiren literatürle uyumludur (186). Elde edilen bulgular, partiler arasındaki değişkenliğin büyük ölçüde formülasyon kararsızlığından değil, ölçeğe bağlı başlangıç kayıplarından kaynaklandığını düşündürmektedir. Her ne kadar partiler arasında partikül büyüklüğü ve PDI değerlerinde belirli düzeyde varyasyon gözlenmiş olsa da, tüm değerler kabul edilebilir sınırlar içerisinde kalmıştır. Bu sonuçlar, mikroakışkan sistemlerde üretim tekrarlanabilirliğinin artırılmasında ölçek büyütme ve seri üretim stratejilerinin önemini ortaya koymaktadır. Sürecin daha ileri düzeyde optimize edilmesi ve ölçek büyütme çalışmalarının sürdürülmesi, partiler arası değişkenliğin daha da azaltılmasına ve üretim tekrarlanabilirliğinin artırılmasına katkı sağlayacaktır.

TGF- β 3 LP formülasyonlarının EE (%) değeri, başlangıç protein konsantrasyonu 0,5 μ g/mL'den 2 μ g/mL'ye yükseltildikçe azalırken, LD (%) değeri buna orantılı olarak artmıştır. Lipozomlar, lipid bileşimleri ve vezikül büyüklükleri tarafından belirlenen sınırlı bir iç sulu hacme sahiptir; eklenen protein miktarı lipid çift tabakasının enkapsülasyon kapasitesini aştığında veziküller doyumluğa ulaşmakta ve proteinin giderek artan bir kısmı hücre dışı ortamda kalarak daha düşük bir EE (%) değeriyle sonuçlanmaktadır (187). Sharma ve ark. (187), somon iskelet proteini hidrolizati yüklü lipozomların EE değerinin, peptit konsantrasyonu %1'den %3'e yükseldikçe %89,6'dan %60,5'e anlamlı biçimde azaldığını bildirmiş ve bu azalmayı sınırlı iç hacim ile yüksek peptit yüklemelerinde ortaya çıkan vezikül doyumluğuna bağlamıştır (187). Benzer bir eğilim Chotphruethipong ve ark. (188) tarafından da gözlemlenmiş; söz konusu çalışmada konjugat konsantrasyonu %0,25'ten %1'e (a/h) yükseldikçe daha düşük EE (%) değeri elde edilmiştir (188). Benzer şekilde Ambati ve ark. (2025), lipid nanopartiküllerde protein/lipid oranının 1:20 (a/a) değerinin üzerine çıkarılmasının EE (%) değerini artırmadığını; aksine fazla proteinin işlem sırasında denatüre olarak çöktüğünü göstermiş ve bu bulgu lipid sistemine özgü belirli bir yükleme kapasitesinin varlığına işaret etmiştir (189). Bu doğrultuda, en yüksek EE (%) değerini sağlaması ve dolayısıyla terapötik proteinin en verimli şekilde

kullanılmasına olanak tanınması nedeniyle, sonraki deneyler için 0,5 µg/mL TGF-β3 dozu seçilmiştir (190, 191).

miRNA EE (%) değeri %99,29 ± 0,021 düzeyine ulaşmış olup, bu sonuç lipopleks sistemlerinde neredeyse tam enkapsülasyon bildiren çalışmalarla uyumludur (101, 116, 192). EE (%) değeri 4 N/P oranında artmış, lipozom oranlarının azaltılması ise miRNA enkapsülasyonunu düşürmüştür.

Termal ve sızıntı stabilitesi çalışmaları, TGF-β3 LP ve miR-132 LPX formülasyonlarının hem 4°C hem de 37°C’de stabil kaldığını göstermiştir. Hem TGF-β3 LP hem de miR-132 LPX, 14 günlük süre boyunca ortalama partikül büyüklüğünde kademeli artışlar sergilemiştir. Bununla birlikte, her iki formülasyon için de PDI değeri istatistiksel olarak değişmemiş ($P > 0,05$) ve 0,3’ün altında kalmıştır; bu durum partikül popülasyonunun monodispers kaldığını göstermektedir. On dört günlük depolama süresi boyunca ortalama partikül büyüklüğünde gözlemlenen kademeli artış, PEG zincirlerinin hidrasyonuna ve buna bağlı olarak veziküllerin çevresinde Sabit Sulu Tabaka Kalınlığı (FALT) oluşumuna atfedilebilir (193). Kritik olarak, PDI değerinin stabil kalması ve 0,3’ün altında seyretmesi ($P > 0,05$), formülasyonun homojenliğini koruduğunu ve kontrolsüz agregasyon veya füzyona uğramadığını doğrulamaktadır (194). Formülasyonların partikül büyüklüğündeki artış potansiyel bir stabilite sınırlaması olarak kabul edilse de (193), kritik kalite özelliklerinin (partikül büyüklüğü < 200 nm, yüksek zeta potansiyeli ve kabul edilebilir EE%) korunması, formülasyonun terapötik uygulamaya uygunluğunu doğrulamaktadır.

in vitro salım çalışmalarında serbest TGF-β3 72 saat içinde tamamen salınırken, lipozomlardan TGF-β3’ün %96,64 ± %0,64’ünün 312 saat boyunca kademeli olarak salındığının gösterilmesi uzatılmış ve kontrollü salımı doğrulamıştır. Serbest miR-132 membrandan 2,12 saat içinde tamamen difüze olurken, miR-132 LPX sınırlı bir salım göstermiştir. İlk 4 saat içinde yalnızca %3,46, 312 saat boyunca ise %9,84 oranında salım gerçekleşmiştir. miR-132’nin düşük *in vitro* salım hızı, sınırlı biyoyararlanımdan ziyade, lipopleks formülasyonunun hücre dışı ortamda stabil kaldığını göstermektedir. Bu durum, nükleik asitlerin etkin hücresel iletimi için gerekli bir özelliktir (168). Hücre içi iletim amacıyla tasarlanan katyonik lipopleks formülasyonlarında, nükleik asitlerin hücresel alımı gerçekleşene kadar ilaç taşıyıcı

sistem içinde kalması gerekmektedir (168, 195). Devulapally ve ark. (168), anti-miR-10b ve anti-miR-21 yüklü polimer nanopartiküllerin hücre dışı ortamda yapısal bütünlüklerini koruduğunu, ilk 3 gün içinde nükleik asitlerin yalnızca ~%4'ünün salındığını ve yüklü nanopartiküllerin uygulanmasından 6 gün sonra anti-miR-21 düzeylerinin iki katından fazla arttığını göstermiştir (168). Bununla uyumlu olarak Mendonça ve ark. (195), katyonik lipid temelli nanotaşıyıcıların elektrostatik etkileşimler yoluyla miRNA ile stabil kompleksler oluşturduğunu ve pozitif yüklü komplekslerin negatif yüklü hücre zarlarıyla etkileşerek endositozu başlattığını, böylece etkin hücre içi iletimin mümkün kılındığını vurgulamıştır (195). Buna paralel olarak, *in vitro* transfeksiyon çalışmalarında, negatif yüklü miRNA'nın hücre zarını sınırlı düzeyde geçebilmesi nedeniyle serbest 6-FAM-miR-132 uygulanan hücrelerde zayıf floresans sinyali gözlemlendiğini göstermiştir (54, 74). Buna karşılık, miR-132 LPX uygulanan hücrelerde güçlü floresans gözlemlenmiş ve bu bulgu etkin transfeksiyonu doğrulamıştır. Artan hücresel alım, katyonik lipopleksler ile hücre zarı arasındaki elektrostatik etkileşimlerin endositozu kolaylaştırmasına atfedilmiştir (131). Hücre dışı miRNA salımının en az düzeyde olmasıyla birlikte değerlendirildiğinde, bu sonuçlar formülasyonun hücre dışı salımdan ziyade hücre içi iletim için optimize edildiğini doğrulamaktadır.

MTT analizleri, boş lipozomların, TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL)+miR-132 LPX ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL)+miR-132 LPX formülasyonlarının dermal fibroblastlarda 4, 12 ve 24. saatlerde sitotoksite göstermediğini doğrulamıştır ($P>0,05$).

L929 fare fibroblast hücre hattı, yara iyileşmesi ve fibrozis araştırmalarında yaygın olarak kullanılan, iyi karakterize edilmiş bir *in vitro* modeldir. Fibroblastlar, keloid patogenezindeki başlıca efektör hücreler olup aşırı kolajen birikiminden ve ECM yeniden düzenlenmesinden sorumludur (196). Bu tez kapsamında değerlendirilen parametreler (COL1/COL3 oranı (ECM birikimi), MMP aktivitesi (ECM yeniden şekillenmesi), CXCL1 (kemokin birikimi), RASA ve MKI67 (proliferasyon)), fibroblastların yara iyileşmesi ve fibrozisteki işlevsel rollerini yansıtmaktadır. Bununla birlikte, Li ve ark. (78), yara iyileşmesi sırasında miR-132'nin insan dermal fibroblastlarında yüksek düzeyde eksprese edildiğini göstermiştir (83). miR-132'nin keratinositlerde, özellikle re-epitelizasyon sürecinde inflamasyonu ve proliferasyonu düzenlediği bildirilmiştir (81). Ancak TGF- β 1 ile

indüklenmiş fibroblast fibrozis modelinde lipopleks formülasyonu aracılığıyla iletimi daha önce araştırılmamıştır.

TGF- β 1 ile fibroblast uyarımı, fibrozisin *in vitro* olarak modellenmesinde fizyolojik açıdan doğrulanmış bir yaklaşımdır. *in vivo* koşullarda TGF- β 1, fibrotik kaskadın ana düzenleyicisi olup ECM birikimini (COL1/COL3 artışı yoluyla), inflamasyonu (CXCL1 dâhil kemokin indüksiyonu yoluyla) ve fibroblast migrasyonu ile proliferasyonunu yönlendirmektedir. Andrews ve ark. (196), keloid dokusunda TGF- β 'nın kalıcı olarak aktif olduğunu ve yüksek düzeyde eksprese edildiğini; doğrudan kolajen sentezini uyarırken, MMP aracılı hücre dışı matriks (ECM) yıkımını baskıladığını bildirmiştir (196). Ansorge ve ark. (197) ise, *in vivo* koşulları yeterince yansıttıkları sürece basitleştirilmiş *in vitro* modellerin, fibroziste TGF- β 1 sinyal yollarının aydınlatılması açısından temel öneme sahip olduğunu vurgulamıştır (197). Bu doğrultuda, L929 fibroblastlarının TGF- β 1 ile uyarılması, fibrotik mikroçevrede görülen patolojik TGF- β sinyalizasyonunun *in vitro* ortamda modellenmesini sağlamaktadır (196).

TGF- β 1'in fibroblastlarda MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu baskılayıp COL1 ve COL3 ekspresyonunu artırarak fibrozisi uyardığı bilinmektedir (62, 198). Buna karşın TGF- β 3, doku yeniden şekillenmesi sürecinde hücre migrasyonunu ve re-epitelizasyonu desteklemektedir (62). TGF- β 3, TGF- β 1'e benzer şekilde Smad2/3 yolunu aktive edebilmesine rağmen, Smad7 indüksiyonu aracılığıyla TGF- β 1 sinyalini dengelemekte ve fibrotik yanıtı doza bağımlı olarak baskılamaktadır (133, 179, 199, 200). Düşük dozlarda TGF- β 3, TGF- β 1 sinyalini modüle ederek antifibrotik etki gösterirken, daha yüksek dozlarda Smad2/3 aktivasyonunun baskın hâle gelmesi fibrotik yanıtı destekleyebilmektedir (63, 133). Ayrıca TGF- β 3'ün fibronektin, COL1 ve COL3 düzeylerini azaltarak dermal matriksin yeniden düzenlenmesini desteklediği ve skar oluşumunu sınırlandırdığı gösterilmiştir (62, 133, 199, 200). Bu durumu destekler nitelikte Murata ve ark. (133), TGF- β 3'ün insan dermal fibroblastlarına tek başına uygulandığında COL1 sentezini artırdığını; buna karşılık TGF- β 1 ile uygulandığında COL1 ve TGF- β 1 mRNA ekspresyonunu azalttığını bildirmiştir (133). Bu bulgular, TGF- β 3'ün biyolojik etkilerinin dozuna, TGF- β izoformları arasındaki dengeye ve hücrel mikroçevreye bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

miR-132'nin yara iyileşmesindeki rolü başlıca iki mekanizma üzerinden gerçekleşmektedir. İlk olarak, RASA1 mRNA'sının 3' çevrilmeyen bölgesine (3'UTR) bağlanarak Ras/MAPK sinyal yolunu aktive etmekte ve böylece fibroblast ile keratinosit migrasyonunu desteklemektedir (83). İkinci olarak ise, TGF- β 1 mRNA'sının 3'UTR bölgesini hedefleyerek TGF- β 1 ekspresyonunu baskılamasıyla Smad2/3 sinyal yolunu negatif yönde düzenlemektedir (81, 86, 201). Ayrıca TGF- β 1'in miR-132 ekspresyonunu indüklediği ve bu sayede iki molekül arasında negatif geri besleme döngüsü olduğu bildirilmiştir (81). Bu çift yönlü düzenleyici mekanizma, miR-132'nin hücre proliferasyonu, hücre migrasyonunu ve antifibrotik süreçleri düzenlemedeki önemli rolünü ortaya koymaktadır. Bununla uyumlu olarak Li ve ark. (81), miR-132 mimik uygulamasının inflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonunu baskılayarak yara iyileşmesini desteklediğini göstermiştir (81). Benzer şekilde, tümör hücrelerinde miR-132 ve TGF- β sinyal yolunun hedeflenmesinin tümör hücre invazyonunu ve proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir (86, 202). Bu bulgular, miR-132 ile TGF- β 1 arasındaki etkileşimin hücresel bağlama ve biyolojik koşullara bağlı olarak farklı sonuçlar doğurabileceğini düşündürmektedir.

RT-qPCR analizinde TGF- β 1 ile indüklenen fibrozis modelinde COL1 gen ekspresyonu kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır. Fibrozis grubuyla karşılaştırıldığında, tüm tedavi gruplarında COL1 ekspresyonu azalmıştır. Bununla birlikte, boş lipozom (**) ve TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX gruplarında COL1 ekspresyonu kontrolden anlamlı biçimde daha düşük bulunmuştur.

Önceki çalışmalarda miR-132'nin yara iyileşme sürecindeki etkileri, RASA1 ve inflamatuvar mediyatörlerdeki değişikliklerin gen düzeyinde değerlendirilmesiyle belirlenmiştir (81, 83). Literatürde miR-132'nin COL1, COL3 ve MMP düzeylerine etkilerini gen veya protein düzeyinde değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, miR-132 LPX uygulamasının ardından *in vitro* fibrozis modelinde COL1 ekspresyonunun gen düzeyinde azaldığı (γγγγ) gösterilmiştir. Bu bulgunun, miR-132'nin TGF- β 1'i hedefleyerek aşırı fibrotik yanıtı dengeleyebilme yeteneğiyle ilişkili olabileceği öngörülmüştür.

COL1 gen ekspresyonunda, 2,5 ve 5 ng/mL TGF- β 3 LP uygulamalarının ardından gözlemlenen farklı baskılanma düzeyleri, TGF- β 3'ün daha önce tanımlanan

doza bağımlı etkileriyle uyumludur. Kombine tedavide 2,5 ng/mL TGF- β 3, COL1 mRNA'sını 5 ng/mL'ye kıyasla daha etkili biçimde baskılamıştır. Bu bulgu, TGF- β 3 ile miR-132'nin birlikte uygulanmasında antifibrotik etkinliğin TGF- β 3 dozuna bağlı olarak değişebileceğini ve daha düşük TGF- β 3 dozlarının bu koşullarda daha etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Protein düzeyinde, fibrozis modelinde COL1 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artmış olması, RT-qPCR bulguları ve literatür ile uyumludur (62, 133). Fibrozis grubuyla karşılaştırıldığında, boş lipozom, TGF- β 3 LP (5 ng/mL) ve TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX gruplarında COL1 protein düzeyleri azalmış; ancak kontrol grubundaki değerlere tam olarak gerilememiştir. Buna karşılık, diğer tedavi gruplarında fibrozis grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($P>0,05$). Tüm tedavi gruplarında COL1 protein düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek kalması, 96 saatlik TGF- β 1 indüksiyonunu takiben uygulanan 24 saatlik tedavi süresinin sınırlı olmasına bağlanabilir. Bu süre gen ekspresyonundaki değişikliklerin ortaya çıkması için yeterli görünmekle birlikte, özellikle kolajenler ve α -SMA gibi yapısal proteinler ile MMP'ler gibi sentezi, salınımı ve aktivasyonu çok aşamalı mekanizmalarla düzenlenen proteinlerde meydana gelen değişikliklerin protein düzeyine tam olarak yansımaları için yeterli olmayabilir (203, 204).

COL3 ekspresyonu da benzer bir örüntü sergilemiştir. İn vitro fibrozis modelinde TGF- β 1 uygulamasının ardından COL3 mRNA ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla artmış olup bu bulgu önceki çalışmalarla uyumludur (62, 179, 205, 206). Fibrozis grubuyla karşılaştırıldığında ise COL3 mRNA düzeyleri boş lipozom, TGF- β 3 LP (5 ng/mL) ve TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX gruplarında azalmıştır. Kombine tedavide TGF- β 3 dozunun 2,5 ng/mL'den 5 ng/mL'ye yükseltilmesi, COL3 ekspresyonunun baskılanmasını azaltmış; bu durum COL1 bulgularıyla paralellik göstererek TGF- β 3'ün doza bağımlı biyolojik etkisini desteklemiştir (133, 207). Ayrıca, tek başına uygulanan 5 ng/mL TGF- β 3 fibrozis grubuna kıyasla COL3 ekspresyonunu azaltırken, kombine tedavide aynı etkinin 2,5 ng/mL TGF- β 3 ile elde edilmesi, miR-132 ile TGF- β 3 arasında doza bağlı bir etkileşim bulunduğunu düşündürmektedir.

Tek başına miR-132, TGF- β 1 sinyalindeki düzenleyici rolüyle uyumlu olarak COL3 gen ekspresyonunu kontrol grubuna yakın düzeylere düşürmüştür (81, 201, 208). Bununla birlikte, bu etkinin protein düzeyine aynı ölçüde yansımadağı görülmüştür. Dikkat çekici olarak, kombinasyon grubunda COL3 mRNA düzeyindeki azalmanın tek başına 2,5 ng/mL TGF- β 3 uygulamasına kıyasla daha belirgin olması, iki ajanın birlikte kullanımının antifibrotik etkinliğı artırabileceğini düşündürmektedir.

Protein düzeyinde ise COL3 ekspresyonu, fibrozis grubunda kontrol grubuna kıyasla artmıştır. Tedavi gruplarının bir kısmında fibrozis grubuna göre anlamlı bir farklılık saptanmamış olsa da ($P>0,05$), özellikle TGF- β 3 LP (5 ng/mL), TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX gruplarında COL3 protein düzeylerinde azalma eğilimi gözlenmiştir. Yirmi dört saatlik tedavi sonunda, tek başına 2,5 ng/mL TGF- β 3 uygulanan grup dışında kalan TGF- β 3 içeren tüm gruplarda COL3 protein düzeyleri kontrol grubundaki değerlere yaklaşmıştır.

Bazı çalışmalarda TGF- β 3'ün COL3 gen ekspresyonunu artırdığı bildirilmiş olsa da (209), TGF- β 1 ile uygulandığında COL3 ekspresyonunu azalttığı ve yara iyileşmesi sürecinde TGF- β izoformları arasındaki dengenin korunmasına katkı sağladığı gösterilmiştir (52, 62, 133, 179). Bu izoform dengesinin korunması, yara iyileşmesinin skarsız ilerlemesi ve fibrotik yanıtın sınırlandırılması açısından kritik öneme sahiptir (63, 133, 210). Bu tez çalışmasında ise 24 saat sonunda COL3 protein düzeyindeki azalma yalnızca aktif madde yüklü formülasyonlarda gözlenmiştir. Bu bulgu, aktif madde yüklü formülasyonların boş lipozomlara kıyasla COL3 ekspresyonunun baskılanmasında daha etkili olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmalarda, kolajen birikimindeki düzensizliklerin başlıca COL1/COL3 oranındaki değişikliklerle karakterize olduğu bildirilmiştir. COL1, sert fibriller oluşturarak doku mekanik stabilitesini artırırken, COL3 daha ince, lifsi ve elastik bir ağ oluşturmaktadır. Yara iyileşmesinin erken evresinde COL3 düzeyleri daha yüksekken, geç evrede COL1 baskın hâle gelmektedir. Bu orandaki değişiklikler matriksin mekanik ve işlevsel özelliklerini etkilemektedir (211). Yüksek COL1/COL3 oranı, birçok doku ve organda fibrotik yanıt ve skar dokusu oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (211, 212). Buna karşılık, COL1/COL3 oranı daha düşük olan

dokuların daha elastik bir yapı sergilediği ve skarsız iyileşme gösterdiği bildirilmiştir (213).

COL1/COL3 gen oranı, profibrotik profille uyumlu olarak fibrozis grubunda kontrole kıyasla artmıştır. TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX kombinasyon grubu, bu oranı hem kontrol hem de fibrozis gruplarına göre anlamlı biçimde normalleştiren tek formülasyon olmuş ve güçlü bir antifibrotik etkiye işaret etmiştir. Daha yüksek TGF- β 3 dozu (5 ng/mL) bu oranı artırarak, yukarıda tanımlanan doza bağımlı mekanizmayı desteklemiştir. Genel olarak, tek ajanların kısa süreli (24 saat) uygulanması, COL1/COL3 oranını mRNA düzeyinde belirgin biçimde normalleştirmek için yetersiz görünmektedir. Protein düzeyinde, kombinasyon gruplarında COL1/COL3 oranındaki artış, büyük olasılıkla COL3 proteinindeki azalmanın COL1'e kıyasla daha erken başlamasını yansıtmakta olup, çift etkili formülasyonun kolajen izoformlarını farklı zamansal kinetiklerle modüle ettiğini düşündürmektedir.

COL1/COL3 gen ekspresyon oranı, profibrotik fenotiple uyumlu olarak fibrozis grubunda kontrol grubuna kıyasla artmıştır. TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX kombinasyon grubu, bu oranı hem kontrol hem de fibrozis gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde normalleştiren tek formülasyon olmuş ve belirgin bir antifibrotik potansiyel sergilemiştir. Buna karşılık, daha yüksek dozda uygulanan TGF- β 3 LP (5 ng/mL), COL1/COL3 oranında artışa neden olmuş; bu bulgu TGF- β 3'ün doza bağımlı biyolojik etkisini desteklemiştir. Genel olarak, tek ajan uygulamalarının 24 saatlik tedavi süresinde COL1/COL3 oranını mRNA düzeyinde belirgin biçimde normalleştirmek için yeterli olmadığı görülmüştür. Protein düzeyinde, kombinasyon gruplarında COL1/COL3 oranındaki artış, büyük olasılıkla COL3 proteinindeki azalmanın COL1'e kıyasla daha erken başlamasını yansıtmakta olup, kombine formülasyonun kolajen izoformlarını farklı zamansal kinetiklerle modüle ettiğini düşündürmektedir.

MMP'ler çinko (Zn) bağımlı endopeptidazlar olup, ECM proteinlerinin ve hücre dışı büyüme faktörleri gibi diğer proteinlerin yıkımı için gereklidir (214). MMP dengesi bozulduğunda, yara iyileşme sürecinde artmış ECM yıkımı, sitokin profilinde değişiklikler ve skar oluşumu gözlemlenmektedir (215).

Akut yaralarda MMP1, MMP8, MMP9 ve MMP3 gibi proteazların ekspresyonu gösterilmiştir (203). Özellikle akut fazda MMP1'in trombositler tarafından yüksek miktarlarda salındığı bilinmektedir (203). Ancak fare hücrelerinde MMP1'in yerini, yapısal olarak insan MMP13'üne benzeyen interstisyel kolajenaz MMP13 almaktadır. Farelerde yara iyileşmesi sırasında MMP9 ve MMP13'ün re-epitelizasyona katkıda bulunduğu bildirilmiştir (203).

Literatürde, kronik kutanöz ülserlerde fibroblastlarda yüksek düzeyde MMP13 ekspresyonu bildirilmiştir (216). Ayrıca MMP13 ekspresyonu, skarsız iyileşen insan fetal deri ve gingival dokularında da gösterilmiştir (214, 216). MMP13, miyofibroblast fonksiyonunun düzenlenmesi, inflamasyonun kontrolü, anjiyogenez ve matriks yıkımı gibi süreçlerde rol oynayarak yara iyileşmesine katkıda bulunmaktadır. Çok sayıda sitokin ve büyüme faktörü, MMP ekspresyonunu transkripsiyonel düzeyde aktive edebilmektedir. TGF- β ailesi de bunlar arasında yer almaktadır (203). Gingival ve fetal deri fibroblastlarında MMP13 ekspresyonunun TGF- β tarafından indüklendiği bildirilmiştir (216).

MMP13 gen ekspresyonu, önceki çalışmalarla uyumlu olarak fibrozis grubunda kontrole kıyasla artmıştır. Ekspresyon, fibrozise kıyasla boş lipozom, miR-132 LPX ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL)+miR-132 LPX gruplarında azalmıştır. Buna karşın, TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL), TGF- β 3 LP (5 ng/mL) ve TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL)+miR-132 LPX gruplarında MMP13 düzeylerinin kontrol ile fibrozis grupları arasında yer alması, ekspresyonun fizyolojik sınırlara doğru dengelendiğini ve patolojik aktivitenin baskılanırken normal doku yeniden şekillenmesi için gerekli bazal MMP13 düzeyinin korunduğunu düşündürmektedir. Buna karşılık, boş lipozom ve miR-132 LPX gruplarında gözlenen, MMP13 ekspresyonunun kontrol düzeylerinin de altına inmesi, matriks yeniden şekillenmesinin aşırı baskılanabileceğine ve bunun doku onarımını olumsuz etkileyebileceğine işaret etmektedir. Daha önce de belirtildiği üzere, literatürde miR-132'nin TGF- β 1 aracılı Smad2/3 sinyal yolunu modüle ettiği bildirilmiştir (81). MMP13 ekspresyonunun TGF- β /Smad sinyal yolu aracılığıyla düzenlendiği göz önünde bulundurulduğunda, miR-132'nin TGF- β 1 ile indüklenen MMP13 ekspresyonunu baskılaması beklenen bir mekanizma olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, bu çalışmada yalnızca miR-132 uygulamasının MMP13 ekspresyonunu kontrol düzeylerinin altına indirmesi, tek

başına güçlü bir inhibitör etki oluşturabileceğini; buna karşın düşük doz TGF- β 3 ile kombinasyonunun ekspresyonu fizyolojik aralıkta tutarak matriks yıkımı ile yeniden yapılanma arasındaki dengeyi daha etkin biçimde sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Bu bağlamda, TGF- β 3'ün Smad2/3 sinyalini doza bağımlı biçimde baskılayarak MMP13 ekspresyonunu düzenlediği ileri sürülmüştür. miR-132'nin 2,5 ng/mL dozunda TGF- β 3 ile kullanılmasının, MMP13 ekspresyonunu gen düzeyinde kontrol ve fibrozis grupları arasında dengelediği belirlenmiştir. miR-132'nin inhibitör etkisinin TGF- β 3 ile kombine kullanıldığında değiştiği gözlemlenmiştir. Protein düzeyinde ise, büyük olasılıkla modelin zamansal sınırlamaları nedeniyle 24 saatin sonunda anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Çalışmalar, hipertrofik skar dokusunda MMP9 aktivitesinin skarsız iyileşme gösteren dokuya kıyasla arttığını ortaya koymuştur (215). TGF- β 1 Smad3 sinyalinin, sinyal iletili ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3) aracılığıyla MMP2, MMP9, TIMP2 ve CTGF ekspresyonunun artmasına yol açtığı bilinmektedir (217). MMP9'un fibroblastlardaki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. MMP9, fibroblastlarda düşük düzeylerde üretilmektedir (218). Kobayashi ve ark. (219), MMP9'un pozitif bir geri besleme döngüsü aracılığıyla inaktif latent TGF- β 1'i aktive ettiğini ve böylece fibroblast kontraksiyonunu artırdığını göstermiştir (219). MMP9 inhibisyonuna bağlı olarak fibroblastlarda TGF- β 1 düzeylerinin azalmasının ardından kolajen matriks kontraksiyonunda anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (219). Bu bulgular, fibroziste MMP9'un inhibe edilmesinin antifibrotik bir etkiye katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

MMP9 gen ekspresyonu fibrozis grubunda artmış, tüm tedavi gruplarında ise azalmıştır; en belirgin azalmalar boş lipozom ve TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX gruplarında gözlemlenmiştir. Bu bulgular, TGF- β 3 ve miR-132'nin, özellikle kombine uygulandıklarında, MMP9 sinyal yolunun modülasyonu aracılığıyla fibrotik sürecin düzenlenmesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

MMP13 bulgularıyla uyumlu olarak, boş lipozom grubunda MMP9 gen ekspresyonu hem kontrol hem de fibrozis gruplarına kıyasla azalmıştır. TGF- β 3 uygulaması da benzer şekilde, büyük olasılıkla Smad2/3 sinyalinin baskılanması

yoluyla MMP9 ekspresyonunu azaltmıştır. miR-132 LPX grubunda fibrozise kıyasla gözlemlenen azalma ise miR-132'nin anti-inflamatuar özelliklerine ve TGF- β 1'i doğrudan hedeflemesine atfedilmiştir (81).

MMP9 ekspresyonu fibrozise kıyasla tüm tedavi gruplarında azalmış olsa da, düzeylerin kontrol değerlerinin altına inmesi fizyolojik iyileşmeyi olumsuz etkileyebilir. Aşırı düşük MMP9 düzeyleri, gecikmiş epitelizasyon ve azalmış hücre proliferasyonu ile ilişkilendirilmiştir (203, 215). Bu nedenle tedavi etkinliği yalnızca MMP9 mRNA ekspresyonuna dayanarak değerlendirilmemeli, diğer gen ve protein bulgularıyla birlikte yorumlanmalıdır.

Gruplar arasında MMP9 protein düzeylerinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$). Bu durum, transkripsiyon sonrası işlenme, sekresyon ve hücre dışı aktivasyonu içeren çok aşamalı MMP düzenlenmesiyle uyumlu olup, bu süreçler mRNA ve protein düzeyleri arasında zamansal uyumsuzluklara neden olabilmektedir (203, 204, 214). Ayrıca, MMP9 ve MMP13'ün aktivasyonunun yara iyileşmesinin ileri evrelerinde gerçekleşen hücre dışı proteolitik kaskadlara bağlı olması nedeniyle, protein düzeyindeki değişiklikler 24 saatlik gözlem süresi içinde tam olarak ortaya çıkmamış olabilir.

CXCL1, nötrofil migrasyonunu kolaylaştırarak yara bölgesinde antimikrobiyal korunmaya katkıda bulunmaktadır (81, 220). Ayrıca, yara bölgesine ulaşan immün hücreler tarafından sitokin ve büyüme faktörü salınımı artırılmaktadır. Sonuç olarak, uzamış inflammatuar yanıtlarda TGF- β gibi çeşitli büyüme faktörlerinin sürekli salınımı ECM düzensizliğine ve hipertrofik skar oluşumuna yol açmaktadır (81).

Culley ve ark. (221), TGF- β 1 uygulaması sonrasında insan dermal fibroblastlarında CXCL1 mRNA ekspresyonunda artış olduğunu bildirmiştir (221). Bu bulguyla uyumlu olarak, gen düzeyinde CXCL1 ekspresyonu fibrozis grubunda kontrol grubuna kıyasla artmıştır. Bununla birlikte, literatürde TGF- β /Smad2/3 sinyal yolunun belirli koşullarda CXCL1 ekspresyonunu baskılayabildiği ve CXCL1 eksikliğinin azalmış TGF- β 1 sinyalleme aracılığıyla antifibrotik etkilerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (222, 223). Bu durum, CXCL1 ekspresyonunun hücre tipine ve biyolojik bağlama bağlı olarak farklı şekillerde düzenlenebildiğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada, TGF- β 3 uygulanan gruplarda (2,5 ve 5 ng/mL) CXCL1 ekspresyonu kontrolden anlamlı biçimde farklılık göstermemiş ($P>0,05$); bu durum TGF- β 3'ün sinyal dengesini yeniden sağlayabileceğine işaret etmektedir. Fibrozise kıyasla CXCL1 ekspresyonunda azalma 2,5 ng/mL TGF- β 3 ile gözlemlenirken, 5 ng/mL doz anlamlı bir baskılanma gözlenmemiştir. Bu bulgu daha önce tanımlanan doza bağımlı TGF- β 3 etkisini bir kez daha desteklemiştir.

Boş lipozom, miR-132 LPX, TGF- β 3 LP (2,5 ng/mL) + miR-132 LPX ve TGF- β 3 LP (5 ng/mL) + miR-132 LPX gruplarında CXCL1 mRNA ekspresyonu hem kontrol hem de fibrozis gruplarına kıyasla anlamlı biçimde azalmıştır. Önceki çalışmalar, miR-132'nin aşırı ekspresyonunun, heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) sinyali ya da nükleer faktör kappa B (NF- κ B) aktivitesinin inhibisyonu yoluyla CXCL1 gibi inflamatuvar mediyatörleri baskıladığını göstermiştir. Ayrıca TGF- β 1 ve TGF- β 2'nin miR-132 ekspresyonunu indüklediği ve böylece inflamasyon şiddetini modüle ettiği bildirilmiştir (81). Bu bulgularla uyumlu olarak, miR-132 LPX uygulaması fibroblastlarda CXCL1 ekspresyonunu azaltmış, kombine tedaviler ise bu anti-inflamatuvar etkiyi daha da güçlendirmiştir. MMP9 gen ekspresyonuyla birlikte değerlendirildiğinde, tedavi grupları genelinde CXCL1'de gözlemlenen azalma, MMP9 düzenlenmesinin inflamatuvar sinyalin baskılanması yoluyla gerçekleşebileceğini düşündürmektedir.

mKi67, yara iyileşme sürecinde proliferasyon belirteci olarak kullanılmaktadır. mKi67, dinlenme fazı (G0) ve erken G1 fazı dışında aktif hücre döngüsünün tüm fazlarında saptanmaktadır (224, 225). Epidermis ve dermiste yüksek mKi-67 düzeyleri skar oluşumuna ve aktif bir proliferasyon sürecine işaret etmektedir (226). Yanık yarası iyileşme sürecinde tedavi uygulanan dokulardaki mKi-67 düzeylerinin, tedavi uygulanmayan gruba kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bu bulgu, skar dokusunda yüksek mKi-67 düzeyleriyle belirlenen aşırı hücre proliferasyonunu desteklemektedir (227).

Gen düzeyinde mKi67 ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($P>0,05$). Yara iyileşmesinin erken evresinde Ki67 ekspresyonunda artış gözlemlenirken, geç evrede ise genel olarak azaldığı bildirilmiştir (228). Bu bağlamda, bu çalışmada uygulanan 24 saatlik inkübasyon

süresinin, gruplar arasında mKi67 gen ekspresyonunda oluşabilecek olası farklılıkları ortaya koymak için yeterli olmadığı düşünülmektedir.

Fibrozis sürecinde yüksek TGF- β 1 sinyali fibroblast proliferasyonunu uyarak patolojik skar oluşumuna yol açmaktadır (6). Fibrozis grubunda protein düzeyindeki mKi67 miktarı kontrol grubuna kıyasla artma eğilimi göstermiştir, ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($P>0,05$).

Protein düzeyinde, 2,5 ng/mL TGF- β 3 uygulaması TGF- β 1 sinyaliyle ilişkili aşırı proliferatif aktiviteyi baskılamak, 5 ng/mL doz ters yönde bir etki göstermiş ve doz bağımlılığını ortaya koymuştur. miR-132 LPX ve kombine tedaviler mKi67 ekspresyonunu anlamlı biçimde azaltmış olup, bu durum iki aktif madde arasındaki sinerjistik etkileşimi desteklemektedir. COL1, COL3, MMP'ler ve CXCL1 ekspresyonundaki değişikliklerle birlikte değerlendirildiğinde, bu bulgular tedavilerin aşırı hücre proliferasyonunu sınırlandırarak yara iyileşmesini modüle ettiğini düşündürmektedir (229).

RasGAP ailesinin bir üyesi olan RASA1, GTP hidrolizini hızlandırarak Ras aktivitesini düzenlemekte ve yara iyileşmesi sırasında fibroblast ile keratinosit migrasyonunda önemli rol oynamaktadır (230). miR-132 doğrudan RASA1'i hedeflemekte olup, aşırı ekspresyonunun RASA1 düzeylerini baskıladığı ve hücre migrasyonu ile proliferasyonunu etkilediği gösterilmiştir (83, 230).

RASA1 ekspresyonu gen düzeyinde değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($P>0,05$). RASA1 ekspresyonunun başlıca transkripsiyon sonrası düzeyde düzenlendiği bilinmektedir (231). miRNA'lar, RASA1'in 3' çevrilmeyen bölgesini (3'UTR) hedefleyerek ya da RASA1 mRNA'sının yıkımını artırarak mRNA translasyonunu baskılamaktadır. Bu nedenle miRNA aracılı düzenlenmede, mRNA düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmaksızın protein ekspresyonunda anlamlı farklılıklar gözlemlenebilmektedir (78, 232). Ayrıca literatürde RASA1 mRNA stabilitesinin düşük olduğu ve transkript yarılanma ömrünün saatlik ölçekte değiştiği bildirilmiştir (233). Dolayısıyla, tek bir zaman noktasında gerçekleştirilen gen ve protein düzeyindeki değerlendirmelerde, RASA1 ekspresyonunda mRNA düzeyindeki olası değişikliklerin gözden kaçmış olabileceği düşünülmektedir.

Mevcut çalışmada, önceki çalışmalarla uyumlu olarak, miR-132 LPX grubunda RASA1 protein düzeyleri fibrozis grubuna kıyasla azalmıştır. Buna karşın, fibrozis ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu bulgu, TGF- β 1'in miR-132 ekspresyonunu uyardığını gösteren önceki çalışmalarla uyumlu olup, fibrozis grubunda endojen miR-132 ekspresyonunun artmış olabileceğini ve bunun RASA1 düzeylerinin kontrol grubuna benzer seviyelerde korunmasına katkı sağlamış olabileceğini düşündürmektedir (81).

Tedavi gruplarının çoğu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmamış olsa da, TGF- β 3 LP (5 ng/mL) grubunda RASA1 protein ekspresyonu kontrol (*) grubuna kıyasla azalmıştır. Ayrıca, fibrozis grubuna kıyasla tüm tedavi gruplarında RASA1 düzeyleri düşmüştür. Genel olarak bu bulgular, miR-132 ve TGF- β 3'ün yara iyileşme sürecinde proliferasyon ve migrasyon yollarının modülasyonundaki düzenleyici rolünü desteklemektedir.

TGF- β sinyali yalnızca kanonik Smad yollarıyla değil, aynı zamanda hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (ERK1/2), Ras ve kanonik olmayan sinyal yolları (p38, PI3K/AKT, MAPK, JNK) gibi kanonik olmayan/mitojenik kaskadlarla da ilişkilidir (234). RASA1 ile TGF- β arasında doğrudan bir etkileşim açıkça tanımlanmamıştır. Ancak Ras'a yanıt veren eleman bağlayıcı protein 1 (RREB1), TGF- β 1 ile Ras yolları arasında moleküler bir bağlantı sağlamaktadır (232). Mevcut çalışmada, TGF- β 3 uygulaması sonrasında RASA1 düzeylerinde gözlemlenen doza bağımlı değişiklikler, Ras ile ilişkili sinyal mekanizmalarının sürece dâhil olduğunu düşündürmektedir. TGF- β 'nin fibroblastlarda Ras/MEK/ERK sinyal yolunu geçici olarak aktive edebildiğini bildiren çalışmalarla uyumlu olarak (235), TGF- β 3 uygulanan gruplarda RASA1 protein düzeyleri azalmış, en belirgin düşüş ise 5 ng/mL TGF- β 3 grubunda gözlenmiştir. RASA1'in Ras sinyal yolunun negatif düzenleyicisi olduğu göz önünde bulundurulduğunda, RASA1 düzeylerindeki azalmanın Ras aktivasyonunu kolaylaştırarak hücre proliferasyonu ve migrasyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, TGF- β 3'ün doza bağlı olarak pro- veya antifibrotik etki gösterebildiği bilinmektedir (133). Bu nedenle, farklı TGF- β 3 dozlarında gözlenen RASA1 değişiklikleri biyolojik açıdan anlamlı kabul edilmiştir. Kombinasyon gruplarında ise RASA1 baskılanmasının daha dengeli olduğu görülmüştür. Proliferasyon belirteçleri birlikte değerlendirildiğinde, TGF- β 3 ve/veya miR-132

tedavisi sonrasında gözlenen RASA1 azalmasının aşırı proliferatif bir yanıtın bağımsız olarak hücre migrasyonu ve doku yeniden şekillenmesini destekleyen mekanizmalarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Boş lipozom grubunda fibrozis grubuna kıyasla COL1, COL3, MMP9, MMP13 ve CXCL1 gen ekspresyonunda gözlemlenen azalmalar, DOPC ve DSPE-mPEG2000 gibi lipid bileşenlerinin biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Formülasyondaki DOPC bir fosfatidilkolin yapısındayken, DSPE-mPEG2000 fosfoetanolamin yapısındadır. Vázquez-de-Lara ve ark. (236), fosfoetanolaminin akciğer fibroblastlarında ERK ve STAT sinyal yollarını aktive ederek COL1 ekspresyonunu baskıladığını göstermiştir (236). Bu bulgu, boş lipozom grubunda gözlemlenen gen düzeyindeki COL1 ekspresyon azalmasını desteklemektedir.

Literatürde, lipozom formülasyonunda bulunan kolesterolün terapötik uygulamalarda NF- κ B aktivasyonunu baskılayabildiği bildirilmiştir (237). Ayrıca, van Alem ve ark. (238), lipid temelli ilaç taşıyıcı sistemlerinin inflamatuvar yanıtı baskılayabildiğini göstermiştir (238). Fosfatidilkolin ve fosfoetanolamin yapısındaki lipidlerin ise hücre zarı organizasyonunu modüle ederek inflamatuvar sinyal yollarını etkileyebildiği bildirilmiştir (239). Bununla birlikte, lipid temelli nanoterapötik sistemlerin sitokin üretimini, nitrik oksit (NO) sentezini ve diğer proinflamatuvar mediyatörlerin salınımını baskılayabildiği de gösterilmiştir (238). Bu bulgularla uyumlu olarak, mevcut çalışmada boş lipozom grubunda CXCL1 gen ekspresyonunun hem fibrozis hem de kontrol gruplarına kıyasla azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuç, lipozom bileşenlerinin tek başına inflamatuvar yanıtın düzenlenmesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

MMP'leri aktive eden NF- κ B gibi sinyal yolları, inflamatuvar yanıt sürecinde aktive olmaktadır (240). Bu doğrultuda, boş lipozom formülasyonunun inflamatuvar yanıtı baskılamasının, MMP ekspresyonunun azalmasına katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmektedir.

Dikkat çekici biçimde, boş lipozom grubunda RASA1 protein düzeyleri kontrol ve fibrozis gruplarına kıyasla artmıştır. Azalmış mKi67 protein ekspresyonuyla birlikte değerlendirildiğinde, bu bulgu boş lipozom formülasyonunun

RASA1 artışı yoluyla Ras/MAPK/ERK sinyalini baskılayarak proliferasyonu sınırlandırabileceğini düşündürmektedir. Ras proteinlerinin membranla ilişkili olduğu ve lipid bileşimine duyarlılık gösterdiği göz önüne alındığında, formülasyonun indüklediği membran lipid değişikliklerinin Ras yolağı aktivitesini modüle etmiş olabileceği değerlendirilmektedir (241-243).

Boş lipozom grubunda, COL1 ekspresyonundaki değişimle uyumlu olarak COL3 gen ekspresyonunda da azalma gözlenmesi, formülasyon bileşiminde yer alan fosfolipidler ve kolesterolün fibrotik süreci etkileyebileceği hipotezini desteklemektedir. Bu doğrultuda, literatürde fosfoetanolamin gibi yüzey aktif özellik gösteren lipidlerin akciğer fibroblastlarında kolajen birikimini azalttığı bildirilmiştir (244).

Bununla birlikte, boş lipozom grubunda COL1/COL3 oranının artması ve bazı parametrelerin kontrol grubunun da altına düşmesi, taşıyıcı sistemin tek başına fibrotik süreci optimal şekilde düzenlemek için yeterli olmadığını göstermektedir. Genel olarak bu bulgular, boş lipozom formülasyonunun biyolojik olarak inert olmadığını ve destekleyici antifibrotik ile antiinflamatuvar etkiler gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, temel terapötik etkinliğin TGF- β 3 ve miR-132 gibi aktif ajanlardan kaynaklandığı, taşıyıcı sistemin ise bu etkiyi destekleyici ve tamamlayıcı bir rol üstlendiği düşünülmektedir.

RT-qPCR ve ELISA analizlerinden elde edilen hedef gen ve protein modülasyonu bulguları, lokal lipozom/lipopleks stratejisinin terapötik potansiyelini desteklemektedir. Bu moleküler bulguların fonksiyonel olarak doğrulanması amacıyla, fibroblast migrasyonu 48 saatlik Transwell hücre migrasyon testi ile değerlendirilmiştir (135). Hem TGF- β 3 LP hem de miR-132 LPX gruplarında, kontrol grubuna kıyasla fibroblast migrasyonunun anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir (sırasıyla $P<0,05$ ve $P<0,001$). miR-132 LPX grubunda gözlenen artmış migratuvar aktivite, miR-132'nin RASA1 aracılı fibroblast migrasyonunu düzenlediğini bildiren önceki çalışmalarla uyumludur (83). Benzer şekilde, TGF- β 3 LP grubunda gözlenen artmış migrasyon da TGF- β 3'ün temel hücresel fonksiyonları korurken skar oluşumunu azaltan önemli bir düzenleyici olduğunu gösteren literatürle uyumludur. Buna karşın, kombinasyon formülasyonu kontrol grubuna kıyasla

fibroblast migrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluşturmamıştır ($P=0,0642$). Bu dengeli yanıt, fibroblast aktivitesinin fizyolojik sınırlar içerisinde düzenlendiğini, yara kapanması için gerekli migrasyonu korurken fibrotik süreçlerle ilişkili aşırı migratuvar fenotipin önlenmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Bu bulgu, terapötik ajanların doku açıklığının kapanması ve re-epitelizasyon için gerekli homeostatik migrasyonu korurken fibrozisle ilişkili aşırı migratuvar fenotipi baskılamayı amaçladığı "dengeli aktivasyon" modeliyle uyumludur (245, 246). Moleküler analizlerde gözlenen iyileşmiş COL1/COL3 oranı ve MMP ekspresyonundaki düzenlenme ile değerlendirildiğinde, bu fonksiyonel bulgular TGF- β 3 ve miR-132'nin birlikte uygulanmasının düzensiz fibrotik skar oluşumu yerine düzenli doku yeniden şekillenmesini desteklediğini göstermektedir.

İn vitro düzeyde elde edilen umut verici moleküler ve fonksiyonel bulguların ardından, TGF- β 3 LP ve miR-132 LPX'in yara bölgesine kontrollü ve lokal olarak uygulanmasını sağlayacak bir taşıyıcı sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, *in vivo* yanık modeli çalışmalarında kullanılmak üzere 3D biyobaskılanmış kitosan bazlı hidrojel iskeleleri geliştirilmiş ve fizikokimyasal ile reolojik özellikleri değerlendirilmiştir.

Viskoziteleri 30 mPa.s ile 6×10^7 mPa.s arasında değişen biyomalzemelerin mikroekstrüzyon temelli biyobaskı cihazlarıyla uyumlu olduğu bildirilmiştir (247). Bu doğrultuda, optimal standardize hidrojel iskelenin belirlenmesi amacıyla kitosan konsantrasyonu %2 ile %8 (a/h) arasında değişen hidrojel dispersiyonları üzerinde reolojik ve 3B biyobaskı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Lipozomal formülasyonların ilavesiyle baskı davranışının değişebileceği göz önünde bulundurularak hem deneysel bulgularımız hem de önceki çalışmalar doğrultusunda lipozom yüklü hidrojel biyobaskısı için %8 (a/h) kitosan konsantrasyonu seçilmiştir (148, 151, 157).

Boş kitosan (%7 (a/h)) ve lipozom/lipopleks yüklü kitosan (%8 (a/h)) hidrojel dispersiyonlarına ait frekans tarama analizleri, her iki sistemde de depolama modülünün (G') kayıp modülünden (G'') tüm frekans aralığında daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, her iki hidrojinin de baskın olarak elastik ve jel benzeri bir davranış sergilediğini doğrulamaktadır.

Gerinim taraması testlerinde doğrusal viskoelastik bölgenin belirlenmesi, hidrojel ağlarının düşük kayma koşulları altında yapısal bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir. Her iki formülasyon da, kayma hızının artmasıyla viskozitenin azalmasıyla karakterize edilen kayma incelmesi (shear-thinning) davranışı sergilemiştir. Bu gözlemler uyumlu olarak Cardoso ve ark. (248), kitosan temelli hidrojellerin ekstrüzyon temelli 3B biyobaskıya uygun olabilmesi için kayma incelmesi özelliği göstermesi gerektiğini bildirmiştir. Bu Newtonyen olmayan, psödoplastik akış davranışı, yüksek kayma gerilimi altında nozuldan sorunsuz ekstrüzyona ve depozisyon sonrasında hızlı yapısal geri kazanıma olanak tanıdığından kritik öneme sahiptir (248).

Lipozomların polimer ağı içinde fiziksel dolgu fazı olarak yer alması nedeniyle %8 (a/h) lipozom yüklü kitosan formülasyonunda viskoelastik özelliklerin iyileştiği ve viskozitenin arttığı düşünülmüştür. Lipozomların hidrojel ağı içerisindeki varlığı, ağ yoğunluğunu ve moleküller arası etkileşimleri artırarak akışa karşı direncin güçlenmesine katkı sağlamış olabilir. Bununla birlikte, Čačić ve ark. (181), farklı lipozom tiplerinin kitosan hidrojellere ilavesinin viskozite profilleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını bildirmiş ve viskozite üzerinde lipozom varlığından ziyade polimer konsantrasyonunun daha belirleyici olduğunu göstermiştir. Bu doğrultuda, bu çalışmada gözlenen viskozite artışının temel nedeninin, %7 (a/h) yerine %8 (a/h) kitosan konsantrasyonunun kullanılması olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bu çalışmada elde edilen G' değerleri, Yang ve ark. (37) tarafından lipozom-hidrojel kompozitleri için bildirilen ve yumuşak doku mühendisliği uygulamaları açısından uygun kabul edilen 9.000–18.000 Pa aralığı ile uyumludur. Genel olarak değerlendirildiğinde, bu reolojik bulgular, geliştirilen hidrojel formülasyonlarının ekstrüzyon tabanlı 3D biyobaskılama ve sonraki biyomedikal uygulamalar için uygun viskoelastik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir.

Hidrojel iskelelerinin biyobasılabilişliğini değerlendirmek amacıyla yayılma oranı (spreading ratio) ile teorik baskı yüksekliği/baskı sonrası yükseklik oranı analiz edilmiştir. Hem boş hem de lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelelerinde maksimum 2'lik yayılma oranının elde edilmesi, formülasyonların benzer yayılma davranışı ve şekil doğruluğu sergilediğini göstermektedir. Ayrıca, yayılma oranının ağırlıklı olarak 1 ve 1,25 olduğu bölgelerin baskın olması, hidrojellerin baskılama sırasında kontrollü

şekilde yayıldığını ve ardışık katmanlar arasında yapısal bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir.

Dört katmanlı 90° filament yerleşime sahip iskelelerde teorik baskı yüksekliği/baskı sonrası yükseklik oranının 1 olarak belirlenmesi, optimize edilen baskı parametrelerinin yüksek doğruluk sağladığını ve katmanlar arası çökmenin etkin şekilde önlendiğini doğrulamaktadır. Benzer şekilde, Schwab ve ark. (149), 1'e yakın teorik baskı yüksekliği/baskı sonrası yükseklik oranlarının hidrojel bazlı iskeleler için optimum biyobaskılabilirliği temsil ettiğini bildirmiştir. Kitosan, doğal yapısı gereği biyobaskılabilirliği sınırlı bir polimer olarak kabul edilmesine rağmen (151), bu çalışmada standardize hidrojel iskeleleri başarıyla üretilmiştir. Bu başarının, RF'nin formülasyona dahil edilmesinin yanı sıra iğne geometrisi ve çapı, ekstrüzyon basıncı ile baskı hızı gibi temel biyobaskı parametrelerinin optimize edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Farklı polimer konsantrasyonlarında hazırlanan kitosan hidrojel iskeleler arasında ya da boş ve lipozom/lipopleks yüklü kitosan (%8 a/h) + RF hidrojel iskeleler arasında pH değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($P>0,05$). Bu bulgular, lipozom ilavesinin hidrojel sisteminin pH'sını anlamlı biçimde değiştirmediğini göstermektedir. Bu gözlem ayrıca, lipozomların polimer ağının iyonik özelliklerini değiştirmeden kitosan matriksi içinde fiziksel olarak hapsedildiğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, önceki çalışmalarda da lipozom veya lipoplekslerin hidrojel formülasyonlarına eklenmesinin pH üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir (145, 249).

FTIR analizinde, lipozom/lipopleks yüklü hidrojel dispersiyonlarının spektrumlarının boş hidrojel ile büyük ölçüde benzerlik göstermesi, lipozomlar ile kitosan matriksi arasında yeni kovalent bağların oluşmadığını ortaya koymuştur. Ayrıca hidrojel iskelede gözlemlenen karakteristik pikler çapraz bağlı hidrojel ağ yapısının başarıyla oluştuğunu doğrulamıştır (33). Bu bulgular, lipozomların polimer yapısında kimyasal bir değişikliğe yol açmaksızın hidrojel iskelesi içerisine fiziksel olarak entegre edildiğini göstermektedir.

Benzer şekilde, boş ve lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelelerin DSC termogramları karşılaştırılabilir termal geçiş profilleri sergilemiştir. İlk ısıtma

döngüsünde saptanan endotermik geçiş sıcaklıkları neredeyse aynı bulunmuş (boş hidrojel iskele için 212,06°C ve lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskele için 215,25°C) ve bu durum lipozom ilavesinin hidrojel matriksinin termal stabilitesini önemli ölçüde değiştirmedigini göstermiştir. Buna karşılık entalpi, lipozom ilavesinin ardından 15,41 J/g'dan 7,21 J/g'a düşmüştür. Bu azalma, lipozomların polimer zincir paketlenmesini bozarak hidrojel ağdaki kristalin yapıyı azaltmasından kaynaklanmış olabilir. DSC termogramlarının genel benzerliği ve entalpideki azalma birlikte değerlendirildiğinde, lipozomların moleküler düzeyde anlamlı yapısal değişikliklere yol açmaksızın kitosan matriksi içinde fiziksel olarak hapsedildiği sonucu desteklenmektedir (173).

Önceki çalışmalar, hidrojel matrikslerinin enkapsüle edilmiş lipozomların membran bütünlüğünü ve mekanik stabilitesini koruduğunu; lipozomların ise lipid bileşimlerine ve konsantrasyonlarına bağlı olarak hidrojellerin şişme davranışını ve reolojik özelliklerini modüle edebildiğini göstermiştir (36). Özellikle DOTMA, DOPC, kolesterol ve PEG gibi lipozomal lipidlerin hidrofilik baş grupları, hidrofilik etkileşimler yoluyla su alımını desteklemektedir (250). Ayrıca DOTMA içeren katyonik lipozomların, elektrostatik etkileşimler aracılığıyla polimer ağını genişleterek kitosan hidrojellerinin şişme kapasitesini artırdığı gösterilmiştir (181). PEG'ile lipozomlar ise yüzeydeki PEG zincirlerinin su bağlama kapasitesi sayesinde hidrasyonu ek olarak artırmaktadır (37, 250). Bu çalışmalarla uyumlu olarak, bu çalışmada geliştirilen lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskeleleri, 24 saatlik inkübasyon sonrasında boş hidrojel iskelelerine kıyasla anlamlı derecede daha yüksek şişme (swelling) kapasitesi göstermiştir. Bu bulgu, lipozomların hidrojel matriksine dahil edilmesinin su absorpsiyon kapasitesini artırdığını doğrulamaktadır.

Lipozom yüklenmesinin hidrojel iskelelerinin degradasyon davranışı üzerindeki etkisi degradasyon testi ile değerlendirilmiştir. Yirmi dört saat sonunda, lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelelerinin boş hidrojel iskelelerine kıyasla daha yüksek degradasyon oranı gösterdiği belirlenmiştir. Bu artışın, lipozom yüklenmesiyle hidrojel matriksinin su alım kapasitesinin artmasına ve degradasyon süreci sırasında lipozomların matriksten salınmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde, Kaul ve ark. (251), lipozomların hidrojel ağ yapısına su penetrasyonunu kolaylaştırarak matriks degradasyonunu hızlandırdığını bildirmiştir.

Mekanik karakterizasyon sonuçları, lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskelelerinin boş hidrojel iskelelerine kıyasla daha yüksek çekme gerilmesi, ancak daha düşük kopma uzaması sergilediğini göstermiştir. Bu bulgular, lipozom yüklenmesinin polimer ağ yapısının homojenliğini kısmen bozarak hidrojin elastikiyetini azalttığını düşündürmektedir. Bu etkiyi dengelemek ve hidrojel iskelesinin mekanik performansını iyileştirmek amacıyla kitosan konsantrasyonu artırılmış ve böylece daha yüksek çekme dayanımına sahip hidrojel iskeleleri elde edilmiştir. Ayrıca hem boş hem de lipozom/lipopleks yüklü hidrojel iskeleleri için belirlenen mekanik özelliklerin literatürde genel olarak bildirilen değerlerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durumun, mekanik testler sırasında örneklerde meydana gelen kısmi su kaybından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (252).

SEM analizi, lipozomların hidrojel iskeleye başarıyla dâhil edildiğini bir kez daha doğrulamıştır. Hidrojel matriksi içerisinde gözlenen küresel partiküllerin büyüklüğü, dağılımı ve morfolojik özelliklerinin hazırlanan lipozomlarla uyumlu olması, lipozomların hidrojel matriksi içerisine başarıyla gömüldüğüne ilişkin doğrudan kanıt sağlamaktadır.

TGF- β 3 ve miR-132'ye ait salım profilleri, bu moleküllerin lipozom veya lipopleksler içerisinde hidrojel iskelelere yüklenmesinin, serbest formlarına ve lipozom/lipopleks içerisindeki salımlarına kıyasla salım sürelerini belirgin şekilde uzattığını göstermiştir. Serbest TGF- β 3 yaklaşık 72 saat içerisinde tamamen salınırken, hidrojel iskelesine yüklenen TGF- β 3 yüklü lipozomlar 312 saate kadar uzayan kontrollü bir salım profili sergilemiş ve kümülatif salım oranı $96,64 \pm 0,64$ olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, serbest miR-132 ilk 2 saat içerisinde $95,6 \pm 0,01$ oranında hızla salınırken, hidrojel iskelesine yüklenen miR-132 yüklü lipoplekslerden 312 saatin sonunda yalnızca $9,84 \pm 0,004$ oranında salım gerçekleşmiştir.

Bu bulgular, Yang ve ark. (37) tarafından önerilen lipozom-hidrojel sistemlerindeki iki aşamalı salım mekanizması ile uyumludur. Bu mekanizmaya göre, ilaç salımı ilk olarak hidrojin şişmesi veya degradasyonu sırasında oluşan gözeneklerden lipozomların difüzyonu, ardından ise enkapsüle edilen etkin maddenin lipozomlardan salınması şeklinde gerçekleşmektedir. Benzer şekilde, önceki

çalışmalar lipozomların hidrojel ile birlikte kullanılmasının başlangıçta görülen ani salımı (burst release) azalttığını ve her iki taşıyıcı sistemin tek başına sağlayamayacağı uzun süreli kontrollü ilaç salımına olanak tanıdığını göstermiştir (36). Ayrıca, lipozom yüklü etkin maddelerin kitosan hidrojellere yüklenmesinin, lipozomal membrana ek olarak ikinci bir difüzyon bariyeri oluşturarak ilaç salımını daha da uzattığı bildirilmiştir (181).

TGF- β 3 (%96,64) ve miR-132 (%8,23–9,84) için belirlenen kümülatif salım oranları arasındaki belirgin fark, bu moleküllerin farklı fizikokimyasal özellikleri ile açıklanabilir. Çözünür bir protein büyüme faktörü olan TGF- β 3, hem lipozomal membranlardan hem de hidrojel gözeneklerinden nispeten kolay difüze olabilmektedir. Buna karşılık, negatif yüklü bir nükleik asit olan miR-132, katyonik kitosan matriksi ve katyonik lipopleks bileşenleri ile güçlü elektrostatik etkileşimler oluşturduğundan, hidrojel iskelesinden difüzyonu önemli ölçüde kısıtlanmaktadır.

Hidrojel iskelesinden 312 saatin sonunda miR-132'nin sınırlı düzeyde salınması, lipoplekslerin bu süre boyunca yapısal stabilitesini koruduğunu ve hidrojel matriksinin kontrollü salıma katkı sağladığını göstermektedir. Böylece, hidrojel matriksi ile lipozom/lipopleks sisteminin birlikte oluşturduğu çift bariyer yapısı, her iki terapötik ajanın uzun süreli ve kontrollü salımını desteklemiştir. Bu bulgular, lipozom/lipopleks yüklü kitosan hidrojel iskelesinin proteinler ve nükleik asitlerin lokal ve uzun süreli uygulanması için etkili bir taşıyıcı platform olduğunu desteklemektedir (36, 181).

MTT analizi, 24 ve 48 saat sonunda kontrol, boş LP-HS ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS grupları arasında hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını göstermiştir ($P>0,05$). Bu sonuç, geliştirilen hidrojel iskelelerinin dermal fibroblastlar üzerinde sitotoksik etki oluşturmadığını ve biyoyumlu olduğunu doğrulamaktadır. Elde edilen bulgular, kitosan bazlı lipozom-hidrojel kompozit sistemlerinin yüksek biyoyumluluk gösterdiğini bildiren önceki çalışmalarla uyumludur (36, 248).

Optimize edilmiş formülasyonun terapötik etkinliği, *in vitro* koşullarda gözlemlenen sinerjistik etkilerin fizyolojik açıdan anlamlı yara iyileşme koşullarında da yeniden oluşturulup oluşturulamayacağını belirlemek amacıyla *in vivo* fare yanık

modelinde ayrıca değerlendirilmiştir. Çalışma boyunca yara kapanması makroskobik olarak izlenmiş, histolojik ve biyokimyasal analizler ise yara iyileşmesinin yeniden düzenlenme fazına karşılık gelen 21. günde gerçekleştirilmiştir.

Fare yanık modellerinde 21. gün, yara iyileşmesinin proliferatif fazdan yeniden düzenlenme (remodeling) fazına geçiş dönemi olarak kabul edilmektedir (253, 254). Tedavi gruplarının çoğunun 21. güne kadar yaklaşık %80–100 oranında makroskobik yara kapanması sergilemesi nedeniyle, doku toplama için bu zaman noktası seçilmiştir.

Proliferatif faz genellikle yaralanmayı takip eden üçüncü günde başlamakta ve yaklaşık üç haftaya kadar devam etmektedir (255). Bu faz; fibroblast proliferasyonu, miyofibroblastlara farklılaşma, ECM sentezi ve yara kontraksiyonu ile karakterizedir. Aynı dönemde, keratinositler ile fibroblastlar arasındaki koordineli epitelial-mezenkimal etkileşimler sonucunda re-epitelizasyon gerçekleşirken, anjiyogenez, endotelial hücre proliferasyonu ve periferik sinir rejenerasyonu da eş zamanlı olarak ilerlemektedir. Bu süreçler, kendisinden önceki inflamatuvar faz sırasında salınan ve doku rejenerasyonu ile yeniden düzenlenme fazına yönlendiren sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından sıkı biçimde düzenlenmektedir (253).

Yara iyileşmesinin son evresi olan yeniden düzenlenme fazı, tipik olarak yaralanmadan yaklaşık 2–3 hafta sonra başlamakta ve birkaç ay boyunca devam edebilmektedir (254). Bu evrede granülasyon dokusu kademeli olarak gerilerken, epidermis ve dermal vasküler yapı, doku mimarisini yeniden oluşturmak üzere yapısal bir reorganizasyon geçirmektedir. Eş zamanlı olarak fibroblast, miyofibroblast ve vasküler bileşenlerin sayısı azalmakta ve periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC'ler) apoptoz yoluyla yara bölgesinden uzaklaştırılmaktadır (253). Bu doğrultuda, 21. günde kurban edilen farelerin yara iyileşmesinin yeniden düzenlenme fazına girmiş olduğu değerlendirilmiştir (253, 254).

Makroskobik değerlendirme, 7. ile 15. günler arasında TGF- β 3 LP-HS, miR-132 LPX-HS ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS gruplarında yara kapanmasının yanık kontrol grubuna kıyasla anlamlı biçimde arttığını göstermiştir ($P < 0,05$). Özellikle kombinasyon tedavisi uygulanan grupta, yara kapanmasının her iki monoterapi grubuna göre daha fazla olması, TGF- β 3 ve miR-132'nin birlikte uygulanmasının sinerjistik bir terapötik etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, 21.

günde tüm deney gruplarında yara kapanma oranlarının benzer düzeye ulaşması nedeniyle gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$). Bu bulgular, TGF- β 3 ve miR-132'nin tek başına yara iyileşmesini hızlandırabildiğini, ancak kombine uygulanmalarının yara iyileşmesinin erken ve orta dönemlerinde doku onarımını daha da hızlandırdığını göstermektedir.

RT-qPCR analizinde, yanık kontrol grubu ile Boş LP-HS grubu arasında COL1 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$). Önceki *in vitro* RT-qPCR bulgularında, boş lipozom formülasyonu kontrollü hücre kültürü koşullarında içerdiği nispeten yüksek lipid konsantrasyonuna bağlı olarak orta düzeyde antifibrotik etki göstermiştir (256). Buna karşın, *in vivo* çalışmada hidrojel iskelesinin bileşiminde lipozomların oransal olarak daha düşük miktarda bulunması ve yara mikroçevresinin daha kompleks yapısı nedeniyle bu lipid kaynaklı etkinin sınırlanmış olabileceği düşünülmektedir. Nitekim Boş LP-HS grubunda, yanık kontrol grubuna kıyasla COL1, COL3 ve IL-1 α düzeylerinde İHK skorları açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0,05$). Bu bulgular, *in vitro* koşullarda gözlenen biyolojik etkinin *in vivo* ortamda büyük ölçüde baskılandığını ve doku onarımının esas olarak aktif terapötik ajanlar olan TGF- β 3 ve miR-132 tarafından yönlendirildiğini düşündürmektedir.

TGF- β 3 LP-HS, miR-132 LPX-HS ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS uygulamaları hem yanık kontrol hem de Boş LP-HS gruplarına kıyasla COL1 gen ekspresyonunu anlamlı biçimde azaltmıştır. Bu bulgu, tedavi uygulanmayan yanık modellerinde TGF- β 1 ekspresyonunun yanık sonrası ilk iki hafta boyunca yüksek seyrettiğini ve 21. günde de normal düzeylerin üzerinde kaldığını gösteren önceki çalışmalarla uyumludur (209, 257, 258). TGF- β 1 kolajen sentezinin ve fibrozisin başlıca indükleyicisi olduğundan, TGF- β 3 uygulamasının TGF- β sinyalini modüle ederek bu profibrotik etkileri dengelediği düşünülmektedir. *in vitro* bulgularımız ve yayımlanmış çalışmalarla uyumlu olarak (62, 133, 199, 200), TGF- β 3 LP-HS uygulamasının yeniden düzenlenme fazı boyunca COL1 ekspresyonunu etkin biçimde baskılayarak aşırı skar dokusu ile ilişkili kolajen birikimini azalttığını düşündürmektedir.

Benzer şekilde miR-132 LPX-HS, *in vitro* gözlemlerimizle uyumlu olarak hem yanık kontrol hem de Boş LP-HS gruplarına kıyasla COL1 ekspresyonunu anlamlı biçimde azaltmıştır. Bu bulgular, miR-132'nin yara iyileşmesi sırasında TGF- β sinyalini düzenleme ve patolojik kolajen birikimini sınırlandırmadaki rolünü daha da desteklemektedir (81). Önceki çalışmalarda ayrıca, sinaptik plastisite modellerinde miR-132'nin MMP9 mRNA'sının 3'-UTR bölgesine bağlanarak MMP9 protein ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (259, 260). Bu düzenleyici mekanizma yara iyileşmesinde henüz tam olarak ortaya konulmamış olsa da, MMP9'un hücre dışı matriks yeniden düzenlenmesinde kritik bir mediyatör olması, yara iyileşmesi sırasında da benzer bir mekanizmanın işleyebileceğini düşündürmektedir. *in vitro* RT-qPCR sonuçlarında, miR-132 LPX grubunda dermal fibroblastlarda gözlenen MMP9 gen ekspresyonundaki azalma, *in vivo* çalışmada belirlenen COL1 ekspresyonundaki azalmanın, MMP9'un baskılanmasıyla dolaylı olarak ilişkili olabileceğine işaret etmektedir. Benzer şekilde, kombinasyon tedavisi (TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS) de COL1 ekspresyonunda anlamlı bir azalma sağlamış olup, bu bulgu her iki terapötik ajanın birlikte uygulanmasının *in vivo* antifibrotik etkinliğini desteklemektedir.

COL3 gen ekspresyonu da Boş LP-HS, TGF- β 3 LP-HS, miR-132 LPX-HS ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS gruplarında yanık kontrol grubuna kıyasla anlamlı biçimde azalmıştır. Kitosanın, TGF- β ve MAPK yolakları dâhil olmak üzere doku onarımında yer alan çeşitli sinyal yolaklarını düzenlediği bildirilmiştir (211, 261). Ayrıca kitosan temelli biyomalzemelerin, kolajen tip III'ten zengin matriksten kolajen tip I'in baskın olduğu olgun dokuya geçişi destekleyerek ECM yeniden düzenlenmesini kolaylaştırdığı gösterilmiştir (262, 263). Bu çalışmalarla uyumlu olarak, Boş LP-HS uygulaması COL1 ekspresyonunu anlamlı biçimde değiştirmemiş, ancak yeniden düzenlenme fazında COL3 ekspresyonunu azaltmıştır; bu durum kitosan hidrojelinin kendisinin, içerdiği terapötik ajanlardan bağımsız olarak fizyolojik ECM olgunlaşmasına katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

In vitro bulgularımızla uyumlu olarak, TGF- β 3 LP-HS uygulaması yanık kontrol grubuna kıyasla COL3 ekspresyonunu azaltmış; ancak Boş LP-HS grubuna göre anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0,05$). Buna karşılık, hem miR-132 LPX-HS hem de TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS gruplarında Boş LP-HS grubuna kıyasla COL3 ekspresyonu anlamlı düzeyde daha düşük bulunmuştur. Bu bulgu, miR-132'nin

yeniden düzenlenme fazında kolajen tip III ekspresyonunun düzenlenmesine önemli katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde bu sonuçlar, TGF- β 3'ün kolajen yeniden düzenlenme fazındaki antifibrotik etkisini ve miR-132'nin kombine uygulandığında bu antifibrotik etkiyi daha da güçlendirdiğini göstermektedir.

Literatürle (211, 212) ve *in vitro* sonuçlarımızla uyumlu olarak, COL1/COL3 oranı TGF- β 3 LP-HS, miR-132 LPX-HS ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS gruplarında hem yanık kontrol hem de Boş LP-HS gruplarına kıyasla anlamlı biçimde azalmıştır. Buna karşılık Boş LP-HS grubunda yanık kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunamamıştır ($P>0,05$). Bu bulgular, COL1/COL3 oranındaki azalmanın esas olarak kitosan bazlı taşıyıcı sistemden çok TGF- β 3 ve miR-132'nin terapötik etkileriyle ilişkili olduğunu ve bunun daha dengeli bir ekstraselüler matris yeniden düzenlenimi ile fibrotik potansiyelin azalmasına katkı sağladığını düşündürmektedir.

IL-1 sitokin ailesinin üyeleri inflamasyonun merkezi düzenleyicileridir; IL-1 α ise prototipik bir pro-inflamatuar sitokin ve doku hasarının ardından hızla salınan hasarla ilişkili moleküler örüntü (alarmin) olarak işlev görmektedir (264). Deri hasarının ardından IL-1 α ile IL-1 reseptörü üzerinden inflamatuvar sinyalinin başlamasıyla, CCL20 gibi kemokinlerin üretimi uyarılarak immün hücrelerin bölgeye çağırılması desteklenmektedir. IL-1 α ile birlikte IL-8, TNF- α , IL-6 ve CCL2'nin kalıcı olarak yüksek düzeylerde olmasının, kronik yaralar ve uzamış inflamasyon ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (264, 265).

Literatürle uyumlu olarak, IL-1 α ekspresyonu tüm tedavi gruplarında yanık kontrole kıyasla anlamlı biçimde azalmıştır. Ayrıca TGF- β 3 LP-HS ve miR-132 LPX-HS, Boş LP-HS grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük IL-1 α ekspresyonu gözlenirken, kombine tedavi ve Boş LP-HS grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

Yirmi birinci günde belirlenen görece yüksek IL-1 α ekspresyonu, yara kapanmasının büyük ölçüde gerçekleşmiş olmasına rağmen lokal inflamatuvar yanıtın tamamen sonlanmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, TGF- β 3 LP-HS uygulaması sonrasında IL-1 α ekspresyonunda gözlenen azalma, TGF- β sinyal yolunun modülasyonu yoluyla kalıcı inflamasyonun baskılanabileceğini düşündürmektedir.

Benzer şekilde, miR-132'nin IL-1A, IL-1B, TNF, IL-8, CXCL1, CXCL5 ve CCL20 başta olmak üzere çok sayıda inflamatuvar mediyatörün ekspresyonunu baskılayarak yara iyileşmesinde inflamasyon fazından proliferasyon fazına geçişi desteklediği bildirilmiştir (81). Bu mekanizmayla uyumlu olarak, bu çalışmada miR-132 LPX-HS uygulaması da IL-1 α ekspresyonunu anlamlı düzeyde azaltmıştır. Buna karşın, kombinasyon tedavisi yanık kontrol grubuna kıyasla IL-1 α ekspresyonunu azaltmasına rağmen, etkisi Boş LP-HS grubundan anlamlı düzeyde farklı bulunmamıştır. Bu durum, TGF- β 3 ve miR-132'nin inflamatuvar sinyal yolları üzerindeki etkileşimlerinin doz, uygulama zamanı ve lokal doku mikroçevresi gibi faktörlerden etkilenebileceğini düşündürmektedir (63, 133).

Kitosanın hemostatik, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu; mikrobiyal yükü azaltarak ve inflamatuvar yanıtı düzenleyerek yara iyileşmesini desteklediği iyi bilinmektedir (262). Bu doğrultuda, Boş LP-HS grubunda gözlenen IL-1 α ekspresyonundaki azalmanın kitosan bazlı hidrojel iskelesinin doğal biyolojik özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

RASA1 ekspresyonu, *in vitro* bulgularımızla uyumlu olarak TGF- β 3 LP-HS, miR-132 LPX-HS ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS gruplarında yanık kontrole kıyasla anlamlı biçimde azalmıştır. Ras sinyali genel olarak yara iyileşmesinin erken evrelerinde fibroblast proliferasyonu, anjiyogenez ve kolajen sentezi ile ilişkilendirilse de (81, 235), Ras/ERK yolağının geç evrelerdeki sürekli aktivasyonu keratinosit migrasyonu, re-epitelizasyon ve doku yeniden düzenlenimiyle de ilişkilendirilmiştir [122,123]. Kitosanın da benzer şekilde ERK1/2 sinyalini aktive ederek epitel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu desteklediği bildirilmiştir [113]. Bu gözlemlerle uyumlu olarak, Boş LP-HS grubunda yanık kontrole kıyasla RASA1 ekspresyonu azalmıştır. Bu durum kitosan iskelenin hücresel yanıtları Ras/ERK sinyal eksenini üzerinden modüle ettiğini düşündürmüştür.

TGF- β 3 LP-HS ve Boş LP-HS grupları arasında RASA1 ekspresyonu açısından anlamlı bir farklılık gözlenmezken, miR-132 LPX-HS grubunda Boş LP-HS grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük RASA1 ekspresyonu belirlenmiştir. RASA1'in miR-132'nin doğrulanmış doğrudan hedeflerinden biri olduğu göz önüne

alındığında (78), bu bulgu beklenen bir sonuç olup uygulanan miR-132'nin biyolojik aktivitesini desteklemektedir.

Ras sinyal yolağı aktivasyonunun, hücre proliferasyonu ve migrasyonunu artırarak yara iyileşmesinin proliferasyon fazına katkı sağladığı bilinmektedir (81). Bu çalışmada, TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS grubunda RASA1 ekspresyonunun Boş LP-HS grubuna kıyasla daha yüksek bulunması, Ras sinyal yolunun aktivitesinde düzenleyici bir değişimi ve yara iyileşmesinin proliferasyon fazından yeniden düzenlenme fazına geçişi yansıtır olabilir. Bu doğrultuda, RASA1 ekspresyonundaki değişimin doku onarımının ileri evreleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Deney grupları arasında α -SMA gen ekspresyonu açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0,05$). α -SMA, miyofibroblast farklılaşmasının iyi tanımlanmış bir belirteci olup, yara iyileşmesinin geç proliferasyon fazında aktif rol almakta ve hücrel kontraktile yoluyla yara kontraksiyonuna katkı sağlamaktadır. Yeniden düzenlenme fazında ise miyofibroblastlar ile birlikte inflamatuvar ve vasküler hücrelerin önemli bir kısmı apoptoza uğramakta, bunun sonucunda hücresellik azalırken olgun ekstraselüler matriksten zengin doku oluşmaktadır (266). Bu çalışmada analizlerin 21. günde gerçekleştirilmiş olması nedeniyle, tüm gruplarda miyofibroblast baskın fazın büyük ölçüde tamamlanmış olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla, α -SMA ekspresyonunda anlamlı bir farklılık gözlenmemesi, tedaviye özgü bir etkiden ziyade yara iyileşmesinin fizyolojik ilerleyişini yansıtmaktadır. Bu nedenle, geç dönem fibrotik yeniden düzenlenmenin değerlendirilmesinde COL1, COL3 ve özellikle COL1/COL3 oranı, ekstraselüler matriks organizasyonunu daha duyarlı şekilde yansıtan belirteçler olarak esas alınmıştır.

Yirmi birinci günde gerçekleştirilen histolojik değerlendirme, yüksek H&E skorlarının genel olarak uzamış granülasyon dokusu aktivitesine ve yeniden düzenlenme fazına geçişin gecikmesine karşılık geldiğini; düşük skorların ise inflamasyonun sonlanmasını ve matriks reorganizasyonuna doğru ilerlemeyi yansıttığını göstermiştir (253, 254). Bu çalışmada, TGF- β 3 LP-HS ve miR-132 LPX-HS gruplarında yanık kontrol grubuna kıyasla histolojik skorların anlamlı düzeyde daha düşük olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Bu bulgu, her iki tedavinin de proliferatif

yanıtın daha hızlı sonlanması ve yeniden düzenlenme fazına geçişi desteklediğini düşündürmektedir. Kombinasyon grubunda (TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS) da histolojik skorlarda azalma eğilimi gözlenmesine rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$). Bu durum, tekli tedavi gruplarına kıyasla kombinasyon grubunda COL1, COL3, IL-1 α ve RASA1 ekspresyonlarının görece daha yüksek bulunmasıyla da uyumludur.

Konvansiyonel H&E boyamanın, kolajen lif organizasyonu ve hücre dışı matriks mimarisi gibi ince yapısal özelliklerin değerlendirilmesinde sınırlı çözünürlük sunduğu belirtilmelidir. Ayrıca, geç evre yara iyileşmesi sırasında meydana gelen ince moleküler değişiklikler yarı kantitatif histolojik skorlama yöntemleriyle tam olarak yakalanamayabilir (267). Gen ekspresyonu düzeyinde kombinasyon grubunda daha belirgin moleküler etkiler gözlenmesine rağmen, histolojik değerlendirmede anlamlı farklılık saptanmamış olması, histolojik analizlerin duyarlılık sınırlılıkları ile transkripsiyon sonrası düzenleyici mekanizmalarla ilişkili olabilir (80, 267). Buna karşın, makroskobik yara kapanması analizinde kombinasyon grubunda daha hızlı iyileşme gözlenmesi, histolojik farklılıkların sınırlı olmasına rağmen kombinasyon tedavisinin fonksiyonel etkinliğini desteklemektedir.

İHK analizler, Boş LP-HS, miR-132 LPX-HS ve TGF- β 3 LP + miR-132 LPX-HS grupları ile kontrol grubu arasında COL1A2, COL3A1 veya IL-1 α boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığını ortaya koymuştur ($P>0,05$). Buna karşılık, TGF- β 3 LP-HS grubunda COL1A2 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla anlamlı biçimde azalmıştır ($P<0,05$).

RT-qPCR analizinde tüm tedavi gruplarında COL1, COL3 ve IL-1 α gen ekspresyonlarında azalma belirlenmesine rağmen, bu değişiklikler İHK analizlerde protein düzeyine tutarlı biçimde yansımamıştır. Bu durum, İHK yöntemin orta düzeydeki transkripsiyonel değişiklikleri saptamadaki yarı kantitatif yapısından kaynaklanan duyarlılık sınırlılıkları ile açıklanabilir (80, 267).

Benzer şekilde, α -SMA immünboyamasında da Boş LP-HS, miR-132 LPX-HS ve kombinasyon gruplarında yanık kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık gözlenmemiş olup ($P>0,05$), bu bulgu gen ekspresyonu sonuçlarıyla uyumludur. Buna karşın, TGF- β 3 LP-HS grubunda α -SMA protein düzeyi yanık kontrol grubuna göre

anlamli düzeyde daha düşük bulunmuştur ($P<0,05$). Tedavi grupları arasındaki bu farklılık, α -SMA proteininin transkripsiyonel baskılanma sonrasında da uzun yarı ömrü nedeniyle hücre iskeletinde varlığını sürdürebilmesi ile açıklanabilir (266, 268). Kombinasyon grubunda α -SMA ekspresyonunun korunmuş olması ise, yeniden düzenlenme fazında doku kontraksiyonu ve ECM yeniden düzenlenmesini destekleyebilecek düzeyde miyofibroblast aktivitesinin devam ettiğini düşündürmektedir.

Kombinasyon grubunda histolojik ve İHK analizlerde istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların gözlenmemesi, *in vitro* bulgularla tam olarak örtüşmemektedir. Bu durum, *in vivo* yara mikroçevresinin karmaşık yapısından ve moleküler etkilerin yara iyileşmesinin farklı evrelerinde en yüksek düzeye ulaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, moleküler ve histolojik değerlendirmelerin yalnızca tek bir zaman noktasında (21. gün) gerçekleştirilmiş olması, yara iyileşme sürecinin dinamik ilerleyişinin tam olarak ortaya konulmasını sınırlandırmış olabilir.

Çalışmanın bir diğer metodolojik kısıtlılığı ise İHK analizlerde poliklonal antikorların kullanılmış olmasıdır. Poliklonal antikorlar yüksek sinyal duyarlılığı sağlamakla birlikte, birden fazla epitopu tanımları nedeniyle çapraz reaksiyon ve nonspesifik bağlanma riskini artırabilmektedir (269). Ayrıca, partiler arası değişkenlik tekrarlanabilirliği etkileyerek yarı kantitatif değerlendirmelerde tutarsızlıklara yol açabilmektedir (270, 271). Bu sınırlılıklar uygun kontrollerin kullanılması ve antikor dilüsyonlarının optimize edilmesiyle kısmen azaltılmış olsa da, gelecekte Western blot veya ELISA gibi kantitatif protein analiz yöntemlerinin kullanılması bulguların güvenilirliğini ve sağlamlığını artıracaktır (272).

Bununla birlikte, *in vivo* deneylerde kullanılan hayvan sayısı etik gereklilikler ve 3R ilkelerine uyum doğrultusunda sınırlandırılmıştır. Her ne kadar grup başına altı hayvan kullanılması G*Power analizi ile %90 istatistiksel güç sağlayacak şekilde belirlenmiş olsa da, daha küçük etki büyüklüklerinin saptanmasında sınırlılıklar söz konusu olabilir (273). Ayrıca, fare yanık modeli insan yara iyileşmesi ile birçok ortak özelliğe sahip olmakla birlikte, yara kontraksiyonunun daha belirgin olması ve immün yanıtlar arasındaki türler arası farklılıklar nedeniyle bulguların klinik uygulamalara aktarılmasında bu sınırlılıklar göz önünde bulundurulmalıdır (274).

Çalışmanın bir diğer sınırlılığı ise takip ve görüntüleme süresinin kısıtlı olmasıdır. Etik ve deneysel kısıtlamalar nedeniyle daha uzun dönem sonuçlar değerlendirilememiştir. Bununla birlikte, elde edilen bulgular yanık yaralarının tedavisine yönelik kombinasyon temelli terapötik yaklaşımların geliştirilmesine önemli katkılar sağlamaktadır.

Genel olarak değerlendirildiğinde, elde edilen bulgular TGF- β 3 monoterapisinin güçlü bir antifibrotik etki oluşturmakla birlikte, etkin doku onarımı için gerekli olan hücrel aktiviteyi de baskılayabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, önceki klinik çalışmalarda TGF- β 3'ün sınırlı klinik etkinlik göstermesini açıklayan olası mekanizmalardan biri olabilir (4). Buna karşılık, TGF- β 3 ve miR-132'nin kombinasyon halinde uygulanması, antifibrotik etkinliği korurken proliferasyon ve migrasyon süreçlerinin de devam etmesini sağlayan daha dengeli bir düzenleyici etki oluşturmuştur. Bunun sonucunda daha hızlı makroskobik yara kapanması ve daha etkin bir yara iyileşme süreci sağlanmıştır (78, 80).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında, lipozomal sistem lipid bileşenlerinin rasyonel seçimi ile başarıyla optimize edilmiş; partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyelinin belirlenmesinde DOTMA–CHOL etkileşiminin kritik rol oynadığı gösterilmiştir. Seçilen formülasyon, hem TGF- β 3 hem de miR-132 için yüksek enkapsülasyon etkinliği sağlamış, TGF- β 3 için kontrollü ve uzun süreli salım sunarken miR-132'nin hücre içine etkin taşınmasını mümkün kılmıştır. Stabilitate ve sitotoksosite çalışmaları ise geliştirilen formülasyonun fiziksel olarak stabil ve dermal fibroblastlar ile biyouyumlu olduğunu doğrulamıştır.

miR-132 ve TGF- β 3'ün yara iyileşmesi ve fibrozis üzerindeki kombine etkileri, *in vitro* fibrozis modeli kullanılarak değerlendirilmiştir. Test edilen formülasyonlar arasında, TGF- β 3 LP ve miR-132 LPX kombinasyonu COL1/COL3 oranını en etkili şekilde optimize etmiş ve belirgin bir antifibrotik etki göstermiştir. Bu bulgular, kombinasyon tedavisinin ECM yeniden düzenlenmesini fizyolojik sınırlar içerisinde desteklediğini göstermektedir.

In vivo fare yanık modelinde ise 21. günde gerçekleştirilen gen ekspresyon analizinde, tüm tedavi gruplarında yanık kontrol grubuna kıyasla COL1, COL3, IL-1 α ve RASA1 ekspresyonlarında genel bir azalma belirlenmiştir. Bununla birlikte, COL1/COL3 oranında anlamlı azalma yalnızca kombinasyon tedavisi grubunda gözlenmiş olup, bu bulgu TGF- β 3 ve miR-132'nin birlikte uygulanmasının antifibrotik potansiyelini desteklemektedir.

Elde edilen bulgular, kombinasyon tedavisinin terapötik etkinliğinin, miR-132'nin doku yenilenmesini destekleyen etkileri ile TGF- β 3'ün antifibrotik aktivitesi arasında kurulan fonksiyonel dengeden kaynaklandığını düşündürmektedir. Bu yaklaşımın, TGF- β 3 monoterapisinin önceki klinik uygulamalarında bildirilen sınırlılıkların aşılmasına katkı sağlayabileceği değerlendirilmektedir.

Bu formülasyonun terapötik potansiyelinin daha kapsamlı olarak ortaya konulabilmesi için gelecekte gerçekleştirilecek çalışmalarda *in vivo* modellerde zamana bağlı değerlendirmelere yer verilmesi önem taşımaktadır. Farklı zaman

noktalarında (3., 7., 14., 21. ve 28. günler) gerçekleştirilecek moleküler ve histolojik analizler, en belirgin biyolojik etkinin yara iyileşmesinin hangi fazında ortaya çıktığının belirlenmesine katkı sağlayacaktır. Ayrıca, doku mekanik dayanımı ve elastikiyeti gibi fonksiyonel parametrelerin değerlendirilmesi, elde edilen bulguların klinik açıdan anlamlılığını artıracaktır. Bunun yanı sıra, geliştirilen dual ilaç taşıyıcı sistemin terapötik etkinliğinin ticari yara iyileştirme ürünleriyle karşılaştırılması, klinik potansiyelinin daha objektif biçimde değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışma miR-132 ve TGF- β 3 kombinasyonunun yara iyileşmesi tedavisinde güçlü bir translasyonel potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur. Daha kapsamlı *in vivo* doğrulama ve prelinik değerlendirmelerin ardından, geliştirilen dual ilaç taşıyıcı sistemin gelecekte klinik uygulamalar için umut vadeden bir tedavi stratejisi oluşturabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Amini-Nik S, Yousuf Y, Jeschke MG. Scar management in burn injuries using drug delivery and molecular signaling: current treatments and future directions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;123:135–154.
2. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burns Trauma.* 2012;2(1):18–28.
3. Rose LF, Chan RK. The burn wound microenvironment. *Adv Wound Care.* 2016;5(3):106–117.
4. Ferguson MWJ, Duncan J, Bond J, Bush J, Durani P, So K, ve ark. Prophylactic administration of avotermin for improvement of skin scarring: three double-blind, placebo-controlled, phase I/II studies. *Lancet.* 2009;373(9671):1264–1273.
5. Occleston NL, O'Kane S, Laverty HG, Cooper M, Fairlamb D, Mason T, ve ark. Discovery and development of avotermin (recombinant human transforming growth factor beta 3): a new class of prophylactic therapeutic for the improvement of scarring. *Wound Repair Regen.* 2011;19(1):s38–s48.
6. Landen NX, Li D, Stahle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(20):3861–3885.
7. Serra F, Aielli L, Costantini E. The role of miRNAs in the inflammatory phase of skin wound healing. *AIMS Allergy Immunol.* 2021;5(4):264–278.
8. Kolanthai E, Fu Y, Kumar U, Babu B, Venkatesan AK. Nanoparticle mediated RNA delivery for wound healing. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2021;14(1):e1741.
9. Verma P, Pathak K. Nanosized ethanolic vesicles loaded with econazole nitrate for the treatment of deep fungal infections through topical gel formulation. *Nanomedicine.* 2012;8(4):489–496.
10. Su R, Fan W, Yu Q, Dong X, Qi J, Zhu Q, ve ark. Size-dependent penetration of nanoemulsions into epidermis and hair follicles: implications for transdermal delivery and immunization. *Oncotarget.* 2017;8(24):38214–38226.
11. Junquera E, Aicart E. Recent progress in gene therapy to deliver nucleic acids with multivalent cationic vectors. *Adv Colloid Interface Sci.* 2016;233:161–175.
12. Bellefroid C, Reusch C, Lechanteur A, Evrard B, Debacq-Chainiaux F, Mottet D, ve ark. Systematic study of liposomes composition towards efficient delivery of plasmid DNA as potential application of dermal fibroblasts targeting. *Int J Pharm.* 2021;593:120122.
13. Mansury D, Ghazvini K, Jamehdar S, Badiie A, Tafaghodi M, Nikpoor A, ve ark. Increasing cellular immune response in liposomal formulations of DOTAP encapsulated by fusion protein hsp α , PPE44, and esxv, as a potential tuberculosis vaccine candidate. *Rep Biochem Mol Biol.* 2019;8(2):156–166.

14. Hattori Y, Nakamura M, Takeuchi N, Tamaki K, Shimizu S, Yoshiike Y, ve ark. Effect of cationic lipid in cationic liposomes on siRNA delivery into the lung by intravenous injection of cationic lipoplex. *J Drug Target*. 2019;27(2):217–227.
15. Lechanteur A, Sanna V, Duchemin A, Evrard B, Mottet D, Piel G. Cationic liposomes carrying siRNA: impact of lipid composition on physicochemical properties, cytotoxicity and endosomal escape. *Nanomaterials (Basel)*. 2018;8(5):270.
16. Chang S, Yeh C, Chen P, Chang H. The impact of lipid types and liposomal formulations on osteoblast adiposity. *Molecules*. 2018;23(1):95.
17. Kallus S, Englinger B, Senkiv J, Laemmerer A, Heffeter P, Berger W, ve ark. Nanoformulations of anticancer FGFR inhibitors with improved therapeutic index. *Nanomedicine*. 2018;14(8):2632–2643.
18. Pinnapireddy SR, Duse L, Strehlow B, Schäfer J, Bakowsky U. Composite liposome-PEI/nucleic acid lipopolyplexes for safe and efficient gene delivery and gene knockdown. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;158:93–101.
19. Tao J, Ding WF, Che XH, Chen YC, Chen F, Chen XD, ve ark. Optimization of a cationic liposome-based gene delivery system for the application of miR-145 in anticancer therapeutics. *Int J Mol Med*. 2016;37(5):1345–1354.
20. Tavakoli S, Tamaddon A, Golkar N, Golkar N, Samani S. Microencapsulation of (deoxythymidine) 20 – DOTAP complexes in stealth liposomes optimized by Taguchi design. *J Liposome Res*. 2015;25(1):67–77.
21. Song X, Ren Y, Zhang J, Wang G. Targeted delivery of doxorubicin to breast cancer cells by aptamer functionalized DOTAP / DOPE liposomes. *Oncol Rep*. 2015;34(4):1953–1960.
22. Kim B, Hwang G, Seu Y, Choi J, Sik K, Doh K. DOTAP / DOPE ratio and cell type determine transfection efficiency with DOTAP-liposomes. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2015;1848(10):1996–2001.
23. Wieber A, Selzer T, Kreuter J. Physico-chemical characterisation of cationic DOTAP liposomes as drug delivery system for a hydrophilic decapeptide before and after freeze-drying. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012;80(2):358–367.
24. Hood R, Devoe D, Atencia J, Vreeland W, Omiatsek D. A facile route to the synthesis of monodisperse nanoscale liposomes using 3D microfluidic hydrodynamic focusing in a concentric capillary array. *Lab Chip*. 2014;14(13):2403–2409.
25. Markham A, Freear S, Johnson B, Marston G, Evans S, Abou-Saleh R, ve ark. On-chip preparation of nanoscale contrast agents towards high-resolution ultrasound imaging. *Lab Chip*. 2016;16(4):679–687.
26. Gounden V, Singh M. Hydrogels and wound healing: current and future prospects. *Gels (Basel)*. 2024;10(1):43.
27. Kazim T, Tariq A, Usman M, Ayoob MF, Khan A. Chitosan hydrogel for topical delivery of ebastine loaded solid lipid nanoparticles for alleviation of allergic contact dermatitis. *RSC Adv*. 2021;11(60):37413–37425.

28. Saleh B, Dhaliwal HK, Portillo-Lara R, Sani ES, Abdi R, Amiji MM, ve ark. Local immunomodulation using an adhesive hydrogel loaded with miRNA-laden nanoparticles promotes wound healing. *Small*. 2019;15(36):1902232.
29. Desfr  ois C, Auz  ly R, Texier I. Lipid nanoparticles and their hydrogel composites for drug delivery: a review. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018;11(4):118.
30. Harvey A, Brand A, Holgate ST, Kristiansen LV, Lehrach H, Palotie A, ve ark. The future of technologies for personalised medicine. *N Biotechnol*. 2012;29(6):625–633.
31. Wu Q, Maire M, Lerouge S, Therriault D, Heuzey MC. 3D printing of microstructured and stretchable chitosan hydrogel for guided cell growth. *Adv Biosyst*. 2017;1(9):1700058.
32. Tsegay F, Elsherif M, Butt H. Smart 3D printed hydrogel skin wound bandages: a review. *Polymers (Basel)*. 2022;14(5):1012.
33. Brebu M, Dumitriu RP, Pamfil D, Butnaru E, Stoleru E. Riboflavin mediated UV crosslinking of chitosan-gelatin cryogels for loading of hydrophobic bioactive compounds. *Carbohydr Polym*. 2024;324:121521.
34. Cretu A, Grosu-Bularda A, Bordeanu-Diaconescu EM, Hodea FV, Ratoiu VA, Dumitru CS, ve ark. Strategies for optimizing acute burn wound therapy: a comprehensive review. *Medicina (Kaunas)*. 2025;61(1):128.
35. Huang R, Hu J, Qian W, Chen L, Zhang D. Recent advances in nanotherapeutics for the treatment of burn wounds. *Burns Trauma*. 2021;9:tkab026.
36. Binaymotlagh R, Hajareh Haghighi F, Chronopoulou L, Palocci C. Liposome-hydrogel composites for controlled drug delivery applications. *Gels (Basel)*. 2024;10:284.
37. Yang Y, Chen J, Wang S. pH-responsive liposome–hydrogel composite accelerates nasal mucosa wound healing. *Pharmaceutics*. 2025;17:690.
38. Pe  a OA, Martin P. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2024;25:599–616.
39. Mamun AA, Shao C, Geng P, Wang S, Xiao J. Recent advances in molecular mechanisms of skin wound healing and its treatments. *Front Immunol*. 2024;15:1395479.
40. Kolimi P, Narala S, Nyavanandi D, Youssef AAA, Dudhipala N. Innovative treatment strategies to accelerate wound healing: trajectory and recent advancements. *Cells*. 2022;11(15):2439.
41. Yousef H, Alhajj M, Fakoya AO, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls [Internet]*, NBK470464. 2024.
42.   wier    W, Piorun K, Sk  rka-Majewicz M, Maruszevska A, Antoniewski J, Gutowska I. Burns: classification, pathophysiology, and treatment: a review. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4):3749.
43. Warby R, Maani CV. Burn Classification. *StatPearls [Internet]*, NBK539773. 2024.

44. Radzikowska-Büchner E, Łopuszyńska I, Flieger W, Tobiasz M, Maciejewski R, Flieger J. An overview of recent developments in the management of burn injuries. *Int J Mol Sci.* 2023;24(22):16357.
45. Walter AS, Volkmer E, Gauglitz G, Böcker W, Saller MM. Systematic review of molecular pathways in burn wound healing. *Burns.* 2023;49(7):1525–1533.
46. Abazari M, Ghaffari A, Rashidzadeh H, Badeleh SM, Maleki Y. A systematic review on classification, identification, and healing process of burn wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2022;21(1):18–30.
47. Markiewicz-Gospodarek A, Koziół M, Tobiasz M, Baj J, Radzikowska-Büchner E, Przekora A. Burn wound healing: clinical complications, medical care, treatment, and dressing types—current state of knowledge for clinical practice. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(3):1338.
48. Deng H, Genovese TJ, Schneider JC. A narrative review of outcomes in burn rehabilitation based on the international classification of functioning, disability, and health. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2023;34(4):867–881.
49. Zheng L, Hui Q, Tang L, Zheng L, Jin Z, Yu B, et al. TAT-Mediated acidic fibroblast growth factor delivery to the dermis improves wound healing of deep skin tissue in rat. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135291.
50. Umar AK, Sriwidodo S, Maksum IP, Wathoni N. Film-Forming spray of Water-Soluble chitosan containing Liposome-Coated human epidermal growth factor for wound healing. *Molecules.* 2021;26(17):5326.
51. Goh M, Du M, Peng WR, Saw PE, Chen Z. Advancing burn wound treatment: exploring hydrogel as a transdermal drug delivery system. *Drug Deliv.* 2024;31(1):2300945.
52. Yabanoglu-Ciftci S, Arica B, Baysal İ, Erikçi A, Uçar G. Transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3) loaded PLGA-b-PEG nanoparticles: efficacy in preventing cardiac fibrosis induced by TGF- β 1. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2018;48:223–234.
53. Banerjee J, Chan YC, Sen CK. MicroRNAs in skin and wound healing. *Physiol Genomics.* 2011;43(10):543–556.
54. Banerjee J, Sen CK. microRNA and wound healing. *Adv Exp Med Biol.* 2015;888:291–305.
55. Deng Z, Fan T, Xiao C, Tian H, Zheng Y, Li C, et al. TGF- β signaling in health, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):61.
56. Tzavlaki K, Moustakas A. TGF- β Signaling. *Biomolecules.* 2020;10(3):487.
57. Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:137823.
58. Aashaq S, Batool A, Mir SA, Beigh MA, Andrabi KI, Shah ZA. TGF- β signaling: A recap of SMAD-independent and SMAD-dependent pathways. *J Cell Physiol.* 2022;237(1):59–85.

59. Liarte S, Bernabé-García Á, Nicolás FJ. Role of TGF- β in skin chronic wounds: a keratinocyte perspective. *Cells*. 2020;9(2):306.
60. Ramirez H, Patel SB, Pastar I. The role of TGF β signaling in wound epithelialization. *Adv Wound Care*. 2014;3(7):482–491.
61. Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. *Wound Repair Regen*. 2016;24(2):215–222.
62. Gilbert RWD, Vickaryous MK, Vilorio-Petit AM. Signalling by transforming growth factor beta isoforms in wound healing and tissue regeneration. *J Dev Biol*. 2016;4(2):21.
63. Khan I, Rahman SU, Tang E, Engel K, Hall B, Kulkarni AB, ve ark. Accelerated burn wound healing with photobiomodulation therapy involves activation of endogenous latent TGF- β 1. *Sci Rep*. 2021;11:13371.
64. Fan H, Tao H, Wu Y, Hu Y, Yan Y, Luo Z. TGF- β 3 immobilized PLGA-gelatin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid hybrid scaffold for cartilage regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95A:982–992.
65. Gan Y, Li S, Li P, Xu Y, Wang L, Zhao C, ve ark. A controlled release codelivery system of MSCs encapsulated in dextran/gelatin hydrogel with TGF- β 3-loaded nanoparticles for nucleus pulposus regeneration. *Stem Cells Int*. 2016;2016:9042019.
66. Baysal I, Ozcelikay G, Yabanoglu-Ciftci S, Ucar BI, Gencer A, Arica-Yegin B. Nanoparticles and nanostructured films with TGF- β 3: preparation, characterization, and efficacy. *AAPS PharmSciTech*. 2021;22(6):213.
67. Cetik RM, Yabanoglu-Ciftci S, Arica-Yegin B, Baysal İ, Akarca-Dizakar SO, Erbay-Elibol FK, ve ark. Evaluation of the effects of transforming growth factor-beta 3 (TGF-b3) loaded nanoparticles on healing in a rat Achilles tendon injury model. *Am J Sports Med*. 2022;50(4):1066–1077.
68. Sezer A, Ozalp H, Imge Ucar-Goker B, Gencer A, Ozogul E, Cennet O, ve ark. Protective role of transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3) in the formation of radiation-induced capsular contracture around a breast implant: in vivo experimental study. *Int J Pharm*. 2024;665:124715.
69. Meier N, Berten-Schunk L, Roger Y, Hänsch R, Hoffmann A, Bunjes H, ve ark. Characterization of thin polymer layer prepared from liposomes and polyelectrolytes for TGF- β 3Release in tissue engineering. *Macromol Biosci*. 2025;25(4):e2400447.
70. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol*. 2018;9:402.
71. Shang R, Lee S, Senavirathne G, Lai EC. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet*. 2023;24:816–833.
72. de Mello AS, Ferguson BS, Shebs-Maurine EL, Giotto FM. MicroRNA biogenesis, gene regulation mechanisms, and availability in foods. *Noncoding RNA*. 2024;10(5):52.

73. Zhao C, Sun X, Li L. Biogenesis and function of extracellular miRNAs. *ExRNA*. 2019;1:38.
74. Tian H, Cheng L, Liang Y, Lei H, Qin M, Li X, ve ark. MicroRNA therapeutic delivery strategies: a review. *Biomed Pharmacother*. 2024;173:116348.
75. Siu MC, Voisey J, Zang T, Cuttle L. MicroRNAs involved in human skin burns, wound healing and scarring. *Wound Repair Regen*. 2023;31(4):439–453.
76. Badanina DM, Bubnova AM, Kozlov DS, Krylov DP, Mozherov AM, Vosough M, ve ark. Therapeutic potential of modulating gene–microRNA crosstalk in burn injury. *Int J Mol Sci*. 2025;26(20):10060.
77. Aunin E, Broadley D, Ahmed MI, Mardaryev AN, Botchkareva NV. Exploring a role for regulatory miRNAs in wound healing during ageing: involvement of miR-200c in wound repair. *Sci Rep*. 2017;7:3257.
78. Li X, Li D, Wang A, Chu T, Lohcharoenkal W, Zheng X, ve ark. MicroRNA-132 with therapeutic potential in chronic wounds. *J Invest Dermatol*. 2017;137(12):2630–2638.
79. Meng Z, Zhou D, Gao Y, Zeng M, Wang W. miRNA delivery for skin wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;129:308–318.
80. Mansour MR, Ashour NA, Gaballah AM, Elzoghby YE, Elbatawy RM, Shoraba M, ve ark. Comprehensive histopathological and immunohistochemical insights into wound healing from cellular dynamics to translational applications. *Adv Anal Pathol*. 2025;1(1):64–83.
81. Li D, Stähle M, Wang A, Liu X, Meisgen F, Grünler J, ve ark. MicroRNA-132 enhances transition from inflammation to proliferation during wound healing. *J Clin Invest*. 2015;125(8):3008–3026.
82. Herter EK, Landen NX. Non-coding RNAs: new players in skin wound healing. *Adv Wound Care*. 2017;6(3):93–106.
83. Li X, Li D, Wikstrom JD, Pivarsci A, Landen NX, Stahle M, ve ark. MicroRNA-132 promotes fibroblast migration via regulating RAS p21 protein activator 1 in skin wound healing. *Sci Rep*. 2017;7(1):7797.
84. Lei Z, Mil AV, Brandt MM, Grundmann S, Hoefer I. MicroRNA-132/212 family enhances arteriogenesis after hindlimb ischaemia through modulation of the Ras-MAPK pathway. *J Cell Mol Med*. 2015;19(8):1994–2005.
85. Bijkerk R, de Bruin RG, van Solingen C, van Gils JM, Duijs MGJJ, van der Veer EP, ve ark. Silencing of microRNA-132 reduces renal fibrosis by selectively inhibiting myofibroblast proliferation. *Kidney Int*. 2016;89(6):1268–1280.
86. Fu W, Tao T, Qi M, Wang L, Hu J, Li X, ve ark. MicroRNA-132/212 upregulation inhibits TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition of prostate cancer cells by targeting SOX4. *Prostate*. 2016;76(16):1560–1570.
87. Chamorro CI, Fossum M. Exploring the role of miR-132 in rat bladders and human urothelial cells during wound healing. *Int J Mol Sci*. 2024;25(20):11039.

88. Moioli EK, Hong L, Guardado J, Clark PA, Mao JJ. Sustained release of TGFβ3 from PLGA microspheres and its effect on early osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2006;12(3):537–546.
89. Yu F, Geng D, Kuang Z, Huang S, Cheng Y, Chen Y, ve ark. Sequentially releasing self-healing hydrogel fabricated with TGFβ3-microspheres and bFGF to facilitate rat alveolar bone defect repair. *Asian J Pharm Sci.* 2022;17(3):425–434.
90. Reifenrath J, Wellmann M, Kempfert M, Angrisani N, Welke B, Gniesmer S, ve ark. TGF-β3 loaded electrospun polycaprolacton fibre scaffolds for rotator cuff tear repair: an in vivo study in rats. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):1046.
91. Kuran SA, Adıyıl R, Zıkşahna K, Özkan M, Ihlamur M. Nanotechnology-enabled miRNA delivery systems next-generation molecular strategies in cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2025;792:152923.
92. Holjencin C, Jakymiw A. MicroRNAs and their big therapeutic impacts: delivery strategies for cancer intervention. *Cells.* 2022;11(15):2332.
93. Tenchov R, Bird R, Curtze AE, Zhou Q. Lipid nanoparticles—from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement. *ACS Nano.* 2021;15(11):16982–17015.
94. Tenchov R, Sasso JM, Zhou QA. PEGylated lipid nanoparticle formulations: immunological safety and efficiency perspective. *Bioconjug Chem.* 2023;34:941–960.
95. Lamparelli EP, Ciaglia E, Ciardulli MC, Lopardo V, Montella F, Puca AA, ve ark. Optimizing mRNA delivery: a microfluidic exploration of DOTMA vs. DOTAP lipid nanoparticles for GFP expression on human PBMCs and THP-1 cell line. *Int J Pharm.* 2025;672:125324.
96. Pattni B, Chupin V, Torchilin V. New developments in liposomal drug delivery. *Chem Rev.* 2015;115(19):10938–10966.
97. Attwood SJ, Choi Y, Leonenko Z. Preparation of DOPC and DPPC supported planar lipid bilayers for atomic force microscopy and atomic force spectroscopy. *Int J Mol Sci.* 2013;14:3514–3539.
98. Peruš M, Knez Marevci M, Kotnik P. Liposomes: recent progress on nanoparticles production and their usage in medicine. *Biomater Adv.* 2026;180:214585.
99. Pittiu A, Pannuzzo M, Casula L, Pireddu R, Valenti D, Cardia MC, ve ark. Production of liposomes by microfluidics: The impact of post-manufacturing dilution on drug encapsulation and lipid loss. *Int J Pharm.* 2024;664:124641.
100. Dziubinski M. Hydrodynamic focusing in microfluidic devices, in: *Advances in Microfluidics*. InTech, Rijeka, pp. 29–54. 2012.
101. Balbino TA, Aoki NT, Gasperini AAM, Oliveira CLP, Azzoni AR, Cavalcanti LP. L.G. de la Torre, Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. *Chem Eng J.* 2013;6(17):423–433.

102. Behrooznia Z, Nourmohammadi J, Mohammadi Z, Shabani F, Mashhadi R. Biological evaluation of 3D-Printed chitosan-based scaffolds for tissue engineering. *Carbohydr Res.* 2025;551:109416.
103. Kumi M, Wang T, Ejeromedoghene O, Wang J, Li P, Huang W. Exploring the potentials of chitin and chitosan-based bioinks for 3D-printing of flexible electronics: the future of sustainable bioelectronics. *Small Methods.* 2024;8(9):e2301341.
104. Tyrone JW, Marcus JR, Bonomo SR, Mogford JE, Xia Y, Mustoe TA. Transforming growth factor $\beta 3$ promotes fascial wound healing in a new animal model. *Arch Surg.* 2000;135(10):1154–1159.
105. Coerper S, Sigloch E, Cox D, Starlinger M, Köveker G, Becker HD. Recombinant human transforming growth factor beta 3 accelerates gastric ulcer healing in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2009;32(10):985–990.
106. Zhu L, Yang Y, Yan Z, Zeng J, Weng F. Controlled release of TGF- $\beta 3$ for effective local endogenous repair in IDD using rat model. *Int J Nanomedicine.* 2022;17:2079–2096.
107. Pakunlu RI, Wang Y, Saad M, Khandare JJ, Starovoytov V, Minko T. In vitro and in vivo intracellular liposomal delivery of antisense oligonucleotides and anticancer drug. *J Control Release.* 2006;114(2):153–162.
108. Wu Y, Crawford M, Mao Y, Lee RJ, Davis IC, Elton TS. Therapeutic delivery of microRNA-29b by cationic lipoplexes for lung cancer. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013;2(5):e84.
109. Ando H, Okamoto A, Yokota M, Asai T, Dewa T, Oku N. Polycation liposomes as a vector for potential intracellular delivery of microRNA. *J Gene Med.* 2013;15(10):375–383.
110. Chitkara D, Mittal A, Mahato RI. miRNAs in pancreatic cancer: therapeutic potential, delivery challenges and strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;81:34–52.
111. Ghasemzadeh N, Pourrajab F, Firoozabadi AD, Hekmatimoghaddam S, Haghirsadat F. Ectopic microRNAs used to preserve human mesenchymal stem cell potency and epigenetics. *EXCLI J.* 2018;17:576–589.
112. Cheung CCL. Preparation of multifunctional nanoparticles using microfluidics, Ph.D. thesis, Queen's University Belfast, Belfast, 2020.
113. Robson AL, Dastoor PC, Flynn J, Palmer W, Martin A, Smith DW, et al. Advantages and limitations of current imaging techniques for characterizing liposome morphology. *Front Pharmacol.* 2018;9(80):1–8.
114. Shende P, Ture N, Gaud RS, Trotta F. Lipid- and polymer-based plexes as therapeutic carriers for bioactive molecules. *Int J Pharm.* 2019;558:250–260.
115. Chaudhari R, Nasra S, Meghani N, Kumar A. MiR-206 conjugated gold nanoparticle based targeted therapy in breast cancer cells. *Sci Rep.* 2022;12(1):4713.

116. Shabana AM, Xu B, Schneiderman Z, Ma J, Chen CC, Kokkoli E. Targeted liposomes encapsulating miR-603 complexes enhance radiation sensitivity of patient-derived glioblastoma stem-like cells. *Pharmaceutics*. 2021;13(8):1115.
117. Yan Y, Li XQ, Duan JL, Bao CJ, Cui YN, Su ZB, ve ark. Nanosized functional miRNA liposomes and application in the treatment of TNBC by silencing Slug gene. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:3645–3667.
118. Shin JH, Shin DH, Kim JS. Let-7 miRNA and CDK4 siRNA co-encapsulated in Herceptin-conjugated liposome for breast cancer stem cells. *Asian J Pharm Sci*. 2020;15(4):472–481.
119. Tabatabaei SN, Derbali RM, Yang C, Superstein R, Hamel P. Co-delivery of miR-181a and melphalan by lipid nanoparticles for treatment of seeded retinoblastoma. *J Control Release*. 2019;298:177–185.
120. Xiong F, Mi Z, Gu N. Cationic liposomes as gene delivery system: transfection efficiency and new application. *Pharmazie*. 2011;66(3):158–164.
121. Haghirsadat F, Amoabediny G, Naderinezhad S, Forouzanfar T, Helder MN, Zandieh-Doulabi B. Preparation of PEGylated cationic nanoliposome-siRNA complexes for cancer therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(4):684–692.
122. Hurler J, Engesland A, Kermany BP, Škalko-Basnet N. Improved texture analysis for hydrogel characterization: gel cohesiveness, adhesiveness, and hardness. *J Appl Polym Sci*. 2011;125(1):180–188.
123. Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, ve ark. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*. 2007;28:869–876.
124. Ball RL, Bajaj P, Whitehead KA. Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: examining the effect of pH, temperature, and lyophilization. *Int J Nanomedicine*. 2016;12:305–315.
125. Roberts SA, Neelaveni N, Agrawal N. A novel filtration approach to create small unilamellar liposomes for drug delivery. *IEEE Healthcare Innovations and Point of Care Technologies (HI-POCT)*. 2017:64–67.
126. Roberts SA, Lee C, Singh S, Agrawal N. Versatile encapsulation and synthesis of potent liposomes by thermal equilibration. *Membranes (Basel)*. 2022;12:319.
127. Hussain MT, Forbes N, Perrie Y, Malik KP, Duru C, Matejtschuk P. Freeze-drying cycle optimization for the rapid preservation of protein-loaded liposomal formulations. *Int J Pharm*. 2020;573:118722.
128. Dimov N, Kastner E, Hussain MT, ve ark. Formation and purification of tailored liposomes for drug delivery using a module-based micro continuous-flow system. *Sci Rep*. 2017;7:12045.
129. Soni PK, Saini TR. Purification of drug loaded liposomal formulations by a novel stirred cell ultrafiltration technique. *Pharm Nanotechnol*. 2021;9:347–358.

130. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. *J Colloid Sci Biotechnol.* 2012;1(2):147–168.
131. Duraloglu C, Baysal I, Yabanoglu-Ciftci S, Arica B. Nintedanib and miR-29b co-loaded lipoplexes in idiopathic pulmonary fibrosis: formulation, characterization, and in vitro evaluation. *Drug Dev Ind Pharm.* 2024;50:671–686.
132. Englinger B, Kallus S, Senkiv J, Heilos D, Gabler L, Schoonhoven S, ve ark. Intrinsic fluorescence of the clinically approved multikinase inhibitor nintedanib reveals lysosomal sequestration as resistance mechanism in FGFR-driven lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):122.
133. Murata H, Zhou L, Ochoa S, Hasan A, Badiavas E, Falanga V. TGF-beta3 stimulates and regulates collagen synthesis through TGF-beta1-dependent and independent mechanisms. *J Invest Dermatol.* 1997;108(3):258–262.
134. Jin HY, Gonzalez-Martin A, Miletic AV, Lai M, Knight S, Sabouri-Ghomi M, ve ark. Transfection of microRNA mimics should be used with caution. *Front Genet.* 2015;6(340):1–10.
135. Justus CR, Marie MA, Sanderlin EJ, Yang LV. Transwell in vitro cell migration and invasion assays, in: O. Friedrich, D.F. Gilbert (Eds.), *Cell Viability Assays, Methods in Molecular Biology*, vol. 2644, Humana, New York, 2023.
136. Ölmez SS, Korkusuz P, Bilgili H, Şenel S. Chitosan and alginate scaffolds for bone tissue regeneration. *Pharmazie.* 2007;62(6):423–431.
137. Berretta J, Bumgardner JD, Jennings JA. Lyophilized chitosan sponges, in: Jennings, J. A., Bumgardner, J.D. (Eds.), *Chitosan Based Biomaterials Volume 1: Fundamentals*. Woodhead Publishing, Duxford, pp. 213–232. 2017.
138. Tsai ML, Chen RH. Modifying the molecular weight of chitosan, in: Jennings, J. A., Bumgardner, J.D. (Eds.), *Chitosan Based Biomaterials Volume 1: Fundamentals*. Woodhead Publishing, Duxford, pp. 149–165. 2017.
139. Luo Y, Cui L, Zou L, Zhao Y, Chen L, Guan Y, ve ark. Mechanically strong and on-demand dissoluble chitosan hydrogels for wound dressing applications. *Carbohydr Polym.* 2022;294:119774.
140. Şenel S, İkinci G, Kaş S, Yousefi-Rad A, Sargon MF, Hıncal AA. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Int J Pharm.* 2000;193(2):197–203.
141. Bonferoni MC, Giunchedi P, Scalia S, Rossi S, Sandri G, Caramella C. Chitosan gels for the vaginal delivery of lactic acid: relevance of formulation parameters to mucoadhesion and release mechanisms. *AAPS PharmSciTech.* 2006;7(4):104.
142. Mozalewska W, Czechowska-Biskup R, Olejnik AK, Wach RA, Ulański P, Rosiak JM. Chitosan-containing hydrogel wound dressings prepared by radiation technique. *Radiat Phys Chem.* 2017;134:1–7.
143. Sarisözen C, Arıca B, Orman MN, Hıncal A, Çalış S. Optimization of prednisolone acetate-loaded chitosan microspheres using a 2³ factorial design for preventing restenosis. *Drug Deliv.* 2010;17(3):178–186.

144. Shahzadi L, Bashir M, Tehseen S, Zehra M, Mehmood A, Chaudhry AA, ve ark. Thyroxine impregnated chitosan-based dressings stimulate angiogenesis and support fast wounds healing in rats: potential clinical candidates. *Int J Biol Macromol.* 2020;160:296–306.
145. Hurler J, Žakelj S, Mravljak J, Pajk S, Kristl A, Schubert R, ve ark. The effect of lipid composition and liposome size on the release properties of liposomes-in-hydrogel. *Int J Pharm.* 2013;456(1):49–57.
146. Paxton N, Smolan W, Böck T, Melchels F, Groll J, Jungst T. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication.* 2017;9(4):044107.
147. Pepelanova I, Kruppa K, Scheper T, Lavrentieva A. Gelatin-methacryloyl (GelMA) hydrogels with defined degree of functionalization as a versatile toolkit for 3D cell culture and extrusion bioprinting. *Bioengineering (Basel).* 2018;5(3):55.
148. Zhou L, Ramezani H, Sun M, Xie M, Nie J, Lv S, ve ark. 3D printing of high strength chitosan hydrogel scaffolds without any organic solvents. *Biomater Sci.* 2020;8(17):4684–4691.
149. Schwab A, Levato R, D’Este M, Piluso S, Eglin D, Malda J. Printability and shape fidelity of bioinks in 3D bioprinting. *Chem Rev.* 2020;120(19):11028–11055.
150. Cleymand F, Poerio A, Mamanov A, Elkhoury K, Ikhelf L, Jehl JP, ve ark. Development of novel chitosan/guar gum inks for extrusion-based 3D bioprinting: process, printability and properties. *Bioprinting.* 2021;21:e00122.
151. Lazaridou M, Bikiaris DN, Lamprou D. 3D bioprinted chitosan-based hydrogel scaffolds in tissue engineering and localised drug delivery. *Pharmaceutics.* 2022;14(9):1978.
152. Faria MJ, Machado R, Ribeiro A, Gonçalves H, Real Oliveira MECD, Viseu T, ve ark. Rational development of liposomal hydrogels: a strategy for topical vaginal antiretroviral drug delivery in the context of HIV prevention. *Pharmaceutics.* 2019;11(10):485.
153. Chhabra P, Tyagi P, Bhatnagar A, Mittal G, Kumar A. Optimization, characterization, and efficacy evaluation of 2% chitosan scaffold for tissue engineering and wound healing. *J Pharm Bioallied Sci.* 2016;8(4):300–308.
154. Elsner JJ, Shefy-Peleg A, Zilberman M. Novel biodegradable composite wound dressings with controlled release of antibiotics: microstructure, mechanical and physical properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;93B:425–435.
155. Intini C, Elviri L, Cabral J, Mros S, Bergonzi C, Bianchera A, ve ark. 3D-printed chitosan-based scaffolds: an in vitro study of human skin cell growth and an in vivo wound healing evaluation in experimental diabetes in rats. *Carbohydr Polym.* 2018;199:593–602.
156. İlhan E, Cesur E, Güler E, Topal F, Albayrak D, Guncu MM, ve ark. Development of *Satureja cuneifolia*-loaded sodium alginate/polyethylene glycol scaffolds

- produced by 3D-printing technology as a diabetic wound dressing material. *Int J Biol Macromol*. 2020;161:1040–1054.
157. Liu Q, Li Q, Xu S, Zheng Q, Cao X. Preparation and properties of 3D printed alginate–chitosan polyion complex hydrogels for tissue engineering. *Polymers (Basel)*. 2018;10(6):664.
 158. Qindeel M, Ahmed N, Sabir F, Khan S, Ur-Rehman A. Development of novel Ph-Sensitive nanoparticles loaded hydrogel for transdermal drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2019;45(4):629–641.
 159. Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *Malays J Med Sci*. 2017;24(5):101–105.
 160. Medina JL, Fourcaudot AB, Sebastian EA, Shankar R, Brown AW. Standardization of deep partial-thickness scald burns in C57BL/6 mice. *Int J Burns Trauma*. 2018;8(2):26–33.
 161. Feezor RJ, Paddock HN, Baker HV, Varela JC, Barreda J. Temporal patterns of gene expression in murine cutaneous burn wound healing. *Physiol Genomics*. 2004;16(3):341–348.
 162. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(17):3241–3255.
 163. Zhang X, Wei X, Liu L. Association of increasing burn severity in mice with delayed mobilization of circulating angiogenic cells. *Arch Surg*. 2010;145:259–266.
 164. Wu JC, Rose LF, Christy RJ. Full-thickness thermal injury delays wound closure in a murine model. *Adv Wound Care*. 2015;4:83–91.
 165. Mohamad N, Amina M, Pandeya M, Ahmada N, Rajab NF. Bacterial cellulose/acrylic acid hydrogel synthesized via electron beam irradiation: accelerated burn wound healing in an animal model. *Carbohydr Polym*. 2014;114:312–320.
 166. Wu X, Luo X, Gua S, Xu J. The effects of *Polygonum cuspidatum* extract on wound healing in rats. *J Ethnopharmacol*. 2012;141(3):934–937.
 167. Jacobi J, Jang JJ, Sundram U, Dayoub H, Fajardo LF, Cooke JP. Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice. *Am J Pathol*. 2002;161(1):97–104.
 168. Devulapally R, Sekar NM, Sekar TV, Foygel K, Massoud TF, Willmann JK, et al. Polymer nanoparticles mediated codelivery of antimiR-10b and antimiR-21 for achieving triple negative breast cancer therapy. *ACS Nano*. 2015;9:2290–2302.
 169. Gawel J, Milan J, Żebrowski J. Biomaterial composed of chitosan, riboflavin, and hydroxyapatite for bone tissue regeneration. *Sci Rep*. 2023;13:17004.
 170. Jamnongkan T, Kaewpirom S. Potassium release kinetics and water retention of controlled-release fertilizers based on chitosan hydrogels. *J Polym Environ*. 2010;18:413–421.

171. Azueta-Aguayo PH, Chuc-Gamboa MG, Aguilar-Pérez FJ. Effects of neutralization on the physicochemical, mechanical, and biological properties of ammonium-hydroxide-crosslinked chitosan scaffolds. *Int J Mol Sci.* 2022;23:14822.
172. Atila D, Dalgic AD, Krzemińska A. Injectable liposome-loaded hydrogel formulations with controlled release of curcumin and α -tocopherol for dental tissue engineering. *Adv Healthc Mater.* 2024;13:2400966.
173. Chollakup R, Uttayarat P, Chworos A, Smitthipong W. Noncovalent sericin-chitosan scaffold: physical properties and low cytotoxicity effect. *Int J Mol Sci.* 2020;21:775.
174. Mercy DJ, Thirumalai A, Udayakumar S, Deepika B, Janani G, Girigoswami A, ve ark. Enhancing wound healing with nanohydrogel-entrapped plant extracts and nanosilver: an in vitro investigation. *Molecules.* 2024;29:5004.
175. Hu K, Xiang L, Chen J, Qu H, Wan Y, Xiang D. PLGA-liposome electrospun fiber delivery of miR-145 and PDGF-BB synergistically promoted wound healing. *Chem Eng J.* 2021;422:129951.
176. Nie JJ, Qiao B, Duan S, Chen X, Chen B, Hao W, ve ark. Unlockable nanocomplexes with self-accelerating nucleic acid release for effective staged gene therapy of cardiovascular diseases. *Adv Mater.* 2018;30:1801570.
177. Torreggiani E, Perut F, Roncuzzi L, Zini N, Baglioli SR, Baldini N. Exosomes: novel effectors of human platelet lysate activity. *Eur Cell Mater.* 2014;28:137–151.
178. Nele V, Campani V, Moosavian SA, De Rosa G. Lipid nanoparticles for RNA delivery: self-assembling vs driven-assembling strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2024;208:115291.
179. Xue H, ve ark. Lipid-based nanocarriers for RNA delivery. *Curr Pharm Des.* 2015;21:3140–3147.
180. Inglut CT, ve ark. Immunological and toxicological considerations for the design of liposomes. *Nanomaterials (Basel).* 2020;10:190.
181. Čačić A, Amidžić Klarić D, Keser S, ve ark. A novel approach for the treatment of aerobic vaginitis: azithromycin liposomes-in-chitosan hydrogel. *Pharmaceutics.* 2023;15:1356.
182. Han J, Meade JL, Goycoolea FM. DOPC liposomal formulation of antimicrobial peptide LL17-32 with reduced cytotoxicity: a promising carrier against *Porphyromonas gingivalis*. *Pharmaceutics.* 2025;17(11):1424.
183. Luiz MT, Dutra JAP, Tofani LB, de Araújo JTC, Di Filippo LD, Marchetti JM, ve ark. Targeted liposomes: a nonviral gene delivery system for cancer therapy. *Pharmaceutics.* 2022;14:821.
184. Pavlovic N, Mijalković J, Balanč B, Luković N, Knežević-Jugović Z. Role of cholesterol in modifying the physical and stability properties of liposomes and in vitro release of vitamin B12. *Eng Proc.* 2025;99(1):10.

185. Aramaki K, Watanabe Y, Takahashi J, Tsuji Y, Ogata A, Konno Y. Charge boosting effect of cholesterol on cationic liposomes. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2016;506:732–738.
186. Nourafkan E, Yang Z, Maamra M, Kis Z. Advancing continuous encapsulation and purification of mRNA vaccines and therapeutics. *Eur J Pharm Sci.* 2025;212:107183.
187. Sharma K, Nilsuwan K, Ma L, Benjakul S. Effect of liposomal encapsulation and ultrasonication on debittering of protein hydrolysate and plastein from salmon frame. *Foods.* 2023;12:761.
188. Chotphruethipong L, Hutamekalin P, Sukketsiri W, Benjakul S. Effects of sonication and ultrasound on properties and bioactivities of liposomes loaded with hydrolyzed collagen from defatted sea bass skin conjugated with epigallocatechin gallate. *J Food Biochem.* 2021;45:e13809.
189. Ambati S, Li Y, Whittaker MK, Kennedy EJ, Missaoui WN, Lin X, ve ark. Anionic lipids direct efficient microfluidic encapsulation of stable and functionally active proteins in lipid nanoparticles. *Commun Mater.* 2025;6:749.
190. Değim Z, Çelebi N, Alemdaroğlu C, Deveci M, Öztürk S, Özoğul C. Evaluation of chitosan gel containing liposome-loaded epidermal growth factor on burn wound healing. *Int Wound J.* 2011;8(4):343–354.
191. Lu KJ, Wang W, Xu XL, Jin FY, Qi J, Wang XJ, ve ark. A dual deformable liposomal ointment functionalized with retinoic acid and epidermal growth factor for enhanced burn wound healing therapy. *Biomater Sci.* 2019;7(6):2372.
192. Rodrigues B, Kanekiyo T, Singh J. Nerve growth factor gene delivery across the blood–brain barrier to reduce beta amyloid accumulation in AD mice. *Mol Pharm.* 2020;17(6):2054–2063.
193. Nag OK, Awasthi V. Surface engineering of liposomes for stealth behavior. *Pharmaceutics.* 2013;5:542–569.
194. Jaradat E, Weaver E, Meziane A, Lamprou DA. Synthesis and characterization of paclitaxel-loaded PEGylated liposomes by the microfluidics method. *Mol Pharm.* 2023;20:6184–6196.
195. Mendonça MCP, Kont A, Kowalski PS, O'Driscoll CM. Design of lipid-based nanoparticles for delivery of therapeutic nucleic acids. *Drug Discov Today.* 2023;28:103505.
196. Andrews JP, Marttala J, Macarak E, Rosenbloom J, Uitto J. Keloids: the paradigm of skin fibrosis – pathomechanisms and treatment. *Matrix Biol.* 2016;51:37–46.
197. Ansorge M, Sapudom J, Chkolnikov M, Wilde M, Anderegg U, Möller S, ve ark. Mimicking paracrine TGFβ1 signals during myofibroblast differentiation in 3D collagen networks. *Sci Rep.* 2017;7:5664.
198. Alpoim-Moreira J, Szóstek-Mioduchowska A, Słyszewska M, Rebordão MR, Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G. 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC, decitabine) inhibits collagen type I and III expression in TGF-β1-treated equine endometrial fibroblasts. *Animals (Basel).* 2023;13:1212.

199. Hosokawa R, Nonaka K, Morifuji M, Shum L, Ohishi M. TGF-beta 3 decreases type I collagen and scarring after labioplasty. *J Dent Res*. 2003;82(7):558–564.
200. Mahmoudi Rad M, Mahmoudi Rad N, Mirdamadi Y. Expression of TGF-β3 in isolated fibroblasts from foreskin. *Rep Biochem Mol Biol*. 2015;3(2):76–81.
201. Chen L, Zhu Q, Lu L, Liu Y. MiR-132 inhibits migration and invasion and increases chemosensitivity of cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cells via targeting TGF-β1. *Bioengineered*. 2020;11(1):91–102.
202. Wang ZH, Zhang QS, Duan YL, Zhang JL, Li GF, Zheng DL. TGF-β induced miR-132 enhances the activation of TGF-β signaling through inhibiting SMAD7 expression in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;463(3):187–192.
203. Caley MP, Martins VLC, O'Toole EA. Metalloproteinases and wound healing. *Adv Wound Care*. 2015;4(4):225–234.
204. de Andrés MC, Imagawa K, Hashimoto K, Gonzalez A, Goldring MB, Oreffo ROC. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression in human chondrocytes. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2019;20(2):S37–S43.
205. Naitoh M, Hosokawa N, Kubota H, Tanaka T, Shirane H, Sawada M, et al. Upregulation of HSP47 and collagen type III in the dermal fibrotic disease, keloid. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280(5):1316–1322.
206. Syed F, Ahmadi E, Iqbal SA, Singh S, McGrouther DA, Bayat A. Fibroblasts from the growing margin of keloid scars produce higher levels of collagen I and III compared with intralesional and extralesional sites: clinical implications for lesional site-directed therapy. *Br J Dermatol*. 2011;164(1):83–96.
207. Yanagawa Y, Hiraide S, Iizuka K. Isoform-specific regulation of transforming growth factor-β mRNA expression in macrophages in response to adrenoceptor stimulation. *Microbiol Immunol*. 2016;60(1):56–63.
208. Yin Y, Yang Y, Zhang Y, Shang Y, Li Q, Yuan J. MiR-132-3p suppresses peritoneal fibrosis induced by peritoneal dialysis via targeting TGF-β1/Smad2/3 signaling pathway. *PLoS One*. 2024;19:e0301540.
209. Xue K, Zhang J, Li C, Li J, Wang C, Zhang Q, et al. The role and mechanism of transforming growth factor beta 3 in human myocardial infarction-induced myocardial fibrosis. *J Cell Mol Med*. 2019;23(6):4229–4243.
210. Mercy DJ, Girigoswami K, Girigoswami A. Emerging approaches in keloid scar healing: the synergistic role of nanoparticles and phytochemicals. *Chem Eng J*. 2025;522:168048.
211. Singh D, Rai V, Agrawal DK. Regulation of collagen I and collagen III in tissue injury and regeneration. *Cardiol Cardiovasc Med*. 2023;7(1):5–16.
212. Wittig C, Szulcek R. Extracellular matrix protein ratios in the human heart and vessels: how to distinguish pathological from physiological changes? *Front Physiol*. 2021;12:708656.

213. Jin J, Li H, Chen Z, Liu Q, Chen J, Tao Z, ve ark. Endocytosis-mediated healing: recombinant human collagen type III chain-induced wound healing for scar-free recovery. *Regen Biomater*. 2025;12:rbae149.
214. Toriseva M, Kähäri VM. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(22):3951–3970.
215. Sabino F. U. Auf dem Keller, Matrix metalloproteinases in impaired wound healing. *Metalloproteinases Med*. 2015;2:1–8.
216. Toriseva MJ, Ala-aho R, Karvinen J, Baker AH, Marjomäki VS, Heino J, ve ark. Collagenase-3 (MMP13) enhances remodeling of three-dimensional collagen and promotes survival of human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2007;127(1):49–59.
217. Wang Y, Jiao L, Qiang C, Chen C, Shen Z, Ding F, ve ark. The role of matrix metalloproteinase 9 in fibrosis diseases and its molecular mechanisms. *Biomed Pharmacother*. 2024;171:116116.
218. Dayer C, Stamenkovic I. Recruitment of matrix metalloproteinase-9 (MMP9) to the fibroblast cell surface by lysyl hydroxylase 3 (LH3) triggers transforming growth factor- β (TGF- β) activation and fibroblast differentiation. *J Biol Chem*. 2015;290(22):13763–13778.
219. Kobayashi T, Kim HJ, Liu X, Sugiura H, Kohyama T, Fang Q, ve ark. Matrix metalloproteinase-9 is required for cellular migration and pulmonary alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306(11):L1006–L1015.
220. Korbecki J, Maruszcwska A, Bosiacki M, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. The potential importance of CXCL1 in the physiological state and in noncancer diseases of the cardiovascular system, respiratory system and skin. *Int J Mol Sci*. 2022;24(1):205.
221. Culley OJ, Louis B, Philippeos C, Oulès B, Tihy M, Segal JM, ve ark. Differential expression of insulin-like growth factor 1 and Wnt family member 4 correlates with functional heterogeneity of human dermal fibroblasts. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:628039.
222. Fang WB, Mafuvadze B, Yao M, Zou A, Portsche M, Cheng N. TGF- β negatively regulates CXCL1 chemokine expression in mammary fibroblasts through enhancement of Smad2/3 and suppression of HGF/c-Met signaling mechanisms. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135063.
223. Wu CL, Yin R, Wang SN, Ying R. A review of CXCL1 in cardiac fibrosis. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:674498.
224. Kamala KA, Kanetkar SR, Datkhile KD, Sankethguddad S. Expression of Ki67 biomarker in oral submucous fibrosis with clinico-pathological correlations: a prospective study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2022;23(1):253–259.
225. Prabhu V, Rao BSS, Rao ACK, Prasad K, Mahato KK. Photobiomodulation invigorating collagen deposition, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 expression during dermal wound repair in mice. *Lasers Med Sci*. 2022;37(1):171–180.

226. Liu F, Luo Y, Chen H, Xu S, Zhang D, Sang H, ve ark. Comparison of the efficacy of seven types of microneedles for treating a rabbit hypertrophic scar model. *Nanoscale Adv.* 2023;5(3):927–933.
227. Herndon D, Capek KD, Ross E, Jay JW, Prasai A, Ayadi AE, ve ark. W.J. Meyer 3rd, C.C. Finnerty, Reduced postburn hypertrophic scarring and improved physical recovery with yearlong administration of oxandrolone and propranolol. *Ann Surg.* 2018;268:431–441.
228. Patel GK, Wilson CH, Harding KG, Finlay AY, Bowden PE. Numerous keratinocyte subtypes involved in wound re-epithelialization. *J Invest Dermatol.* 2006;126(2):497–502.
229. Du L, Lv R, Yang X, Cheng S, Ma T, Xu J. Hypoxic conditioned medium of placenta-derived mesenchymal stem cells protects against scar formation. *Life Sci.* 2016;149:51–57.
230. Zhang Y, Li Y, Wang Q, Su B, Xu H, Sun Y, ve ark. Role of RASA1 in cancer: a review and update. *Oncol Rep.* 2020;44:2386–2396.
231. Bellazzo A, Collavin L. Cutting the brakes on Ras-cytoplasmic GAPs as targets of inactivation in cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(10):3066.
232. Su J, Morgani SM, David CJ, Wang Q, Er EE, Huang YH, ve ark. TGF- β orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1. *Nature.* 2020;577(7791):566–571.
233. Cao Y, Chu C, Li X, Gu S, Zou Q, Jin Y. RNA-binding protein QKI suppresses breast cancer via RASA1/MAPK signaling pathway. *Ann Transl Med.* 2021;9(2):104.
234. Xiaojie W, Banda J, Qi H, Chang AK, Bwalya C, Chao L, ve ark. Scarless wound healing: current insights from the perspectives of TGF- β , KGF-1, and KGF-2. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2022;66:26–37.
235. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004;18(7):816–827.
236. Vazquez-de-Lara LG, Tlatelpa-Romero B, Romero Y, Fernández-Tamayo N, Vazquez-de-Lara F, Justo-Janeiro JM, ve ark. R. de-la-Rosa Paredes, J.G. Cisneros-Lira, C. Mendoza-Milla, F. Moccia, R. Berra-Romani, Phosphatidylethanolamine induces an antifibrotic phenotype in normal human lung fibroblasts and ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Int J Mol Sci.* 2018;19:2758.
237. Cauvi DM, Hawisher D, Derunes J, Aniegbuna I, De Maio A. Cholesterol within phosphatidylcholine liposomes attenuates the expression of cytokines. *FASEB J.* 2025;39(13):e70812.
238. van Alem CMA, Metselaar JM, van Kooten C, Rotmans JI. Recent advances in liposomal-based anti-inflammatory therapy. *Pharmaceutics.* 2021;13(7):1004.
239. van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2017;1859(9):1558–1572.

240. Hasan MK, Widhopf II GF, Ghia EM, Kipps TJ. Wnt5a induces ROR1 dependent NF- κ B activation to enhance MMP9 expression and invasiveness in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2025;39:1661–1669.
241. Kato C, Kajiwara T, Numazaki M, Takagi H, Kojima N. Oligomannose-coated liposomes activate ERK via Src kinases and PI3K/Akt in J774A.1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;372(4):898–901.
242. Abdulmalek SA, Mahmoud FA, Awad D, Saleh AM, Elkady AI, Ghareeb DA, ve ark. Thymoquinone-conjugated liposomes improve cytotoxic and proapoptotic effects against hepatocellular cancer by altering the EGFR/ERK/MEK signaling axis. *Discov Oncol*. 2025;16(1):1924.
243. Zhou Y, Hancock JF. Ras nanoclusters: versatile lipid-based signaling platforms. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(4):841–849.
244. Tlatelpa-Romero B, Vázquez-de-Lara Cisneros LG, Cañadas O, Blanco-Rivero A, Olmeda B, Pérez-Gil J, ve ark. R. de-la-Rosa Paredes, S. Ruiz-Salgado, R. Berra-Romani, A.A. Collantes-Gutiérrez, M.S. Pérez-Fernández, M.G. Hernández-Linares, G. Guerrero-Luna, Modulation of pulmonary fibrosis by pulmonary surfactant-associated phosphatidylethanolamine in vitro and in vivo. *Int J Mol Sci*. 2025;26:7132.
245. Peterson JM, Jay JW, Wang Y, Joglar AA, Prasai A, Palackic A, ve ark. Galunisertib exerts antifibrotic effects on TGF- β -induced fibroproliferative dermal fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2022;23:6689.
246. Son B. Regulation of tissue regeneration by immune microenvironment–fibroblast interactions. *Int J Mol Sci*. 2025;26:11950.
247. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol*. 2014;32(8):773–785.
248. Cardoso S, Narciso F, Monge N, Bettencourt A, Ribeiro IAC. Improving chitosan hydrogels printability: a comprehensive study on printing scaffolds for customized drug delivery. *Int J Mol Sci*. 2023;24:973.
249. Mourtas S, Haikou M, Theodoropoulou M, Tsakiroglou C, Antimisiaris SG. The effect of added liposomes on the rheological properties of a hydrogel: a systematic study. *J Colloid Interface Sci*. 2008;317:611–619.
250. Le NTT, Cao VD, Nguyen TNQ, Le TTH, Tran TT, Hoang Thi TT. Soy lecithin-derived liposomal delivery systems: surface modification and current applications. *Int J Mol Sci*. 2019;20:4706.
251. Kaul L, Grundmann CE, Köll-Weber M. A thermosensitive, chitosan-based hydrogel as delivery system for antibacterial liposomes to surgical site infections. *Pharmaceutics*. 2022;14:2841.
252. Xu S, Zhou Z, Liu Z, Sharma P. Concurrent stiffening and softening in hydrogels under dehydration. *Sci Adv*. 2023;9:eade3240.
253. Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin acute wound healing: a comprehensive review. *Int J Inflam*. 2019;2019:3706315.

254. Yang N, Venezuela J, Almathami S, Dargusch M. Zinc-nutrient element based alloys for absorbable wound closure devices fabrication: current status, challenges, and future prospects. *Biomaterials*. 2022;280:121301.
255. Siu WS, Ma H, Leung PC. Review on current advancements in facilitation of burn wound healing. *Bioengineering (Basel)*. 2025;12(4):428.
256. Sezer A, Arica B, Baysal İ, Yabanoglu-Ciftci S. Factorial design-guided optimization of liposome/lipoplex fabrication using microfluidic chip technology for anti-fibrotic wound healing. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2026;125:108694.
257. Alemzadeh E, Oryan A, Mohammadi AA. Hyaluronic acid hydrogel loaded by adipose stem cells enhances wound healing by modulating IL-1 β , TGF- β 1, and bFGF in burn wound model in rat. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(2):555–567.
258. Askin S, Kaynarpinar M. Efficacy of formulation with potential as herbal medicine on second degree burn wound: biochemical and molecular evaluation. *J Cosmet Dermatol*. 2025;24(3):e70122.
259. Jasińska M, Miłek J, Cymerman IA, Łęski S, Kaczmarek L, Dziembowska M. miR-132 regulates dendritic spine structure by direct targeting of matrix metalloproteinase 9 mRNA. *Mol Neurobiol*. 2016;53(7):4701–4712.
260. Kuzniewska B, Rejmak K, Nowacka A. Disrupting interaction between miR-132 and Mmp9 3'UTR improves synaptic plasticity and memory in mice. *Front Mol Neurosci*. 2022;15:924534.
261. Cui R, Lu Q, Teng Y, Li K, Li N. Chitosan promoted the corneal epithelial wound healing via activation of ERK pathway. *Curr Eye Res*. 2017;42(1):21–27.
262. Baxter RM, Dai T, Kimball J, Wang E, Hamblin MR, Wiesmann WP, ve ark. Chitosan dressing promotes healing in third degree burns in mice: gene expression analysis shows biphasic effects for rapid tissue regeneration and decreased fibrotic signaling. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(2):340–348.
263. Molaei R, Hosseinkhani A, Saberian M. Molecular regulation of tissue remodeling through chitosan-based hydrogels in wound healing dynamics. *Tissue Eng Part B Rev*. 2025;31(3):1–15.
264. Cavalli G, Colafrancesco S, Emmi G, Imazio M, Lopalco G, Maggio MC, ve ark. Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*. 2021;20(3):102763.
265. Piipponen M, Li D, Landén NX. The immune functions of keratinocytes in skin wound healing. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8790.
266. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314–321.
267. Berthiaume Fox KA, Galvin ER, Kness-Knezinskis E, Hostler AC, Chen K, Gurtner GC. Decoding wound healing: cellular insights and technological advances. *npj Biomed Innov*. 2026;3:1.

268. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007;127(3):526–537.
269. Eyzaguirre E, Haque AK. Application of immunohistochemistry to infections. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:424–431.
270. Hoel IM, Ali IAM, Ishtiaq S. Immunochemistry-based diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a strategy for large-scale production of MPT64-antibodies for use in the MPT64 antigen detection test. *Antibodies (Basel).* 2021;10:34.
271. Elliott S, Swift S, Busse L. Epo receptors are not detectable in primary human tumor tissue samples. *PLoS One.* 2013;8:e68083.
272. O’Hurley G, Sjöstedt E, Rahman A. Garbage in, garbage out: a critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Mol Oncol.* 2014;8:783–798.
273. Mukherjee P, Roy S, Ghosh D. Role of animal models in biomedical research: a review. *Lab Anim Res.* 2022;38:18.
274. Hao D, Nourbakhsh M. Recent advances in experimental burn models. *Biology (Basel).* 2021;10:526.

8. EKLER

EK-1: Etik Kurul İzin Belgesi



KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
BAŞVURU BİLGİLERİ	Protokol Numarası	639
	Protokol Adı	Kişiselleştirilmiş Tedaviye Yönelik 3 Boyutlu Yazıcı aracılığı ile Hazırlanan miR-132 ve TGF-β3 Yüklü Lipopleks İçeren Dual Etkili Kitosan Hidrojel İskelelerinin Tedavi Etkinliğinin Yanık Yarasında Değerlendirilmesi: Bir <i>in vivo</i> Deneysel Çalışma
	Başvuru Tarihi	04.10.2022
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
	Yardımcı Araştırmacılar	Prof. Dr. Betül ARICA YEĞİN Dr. Öğr. Üyesi İpek BAYSAL Ecz. Aysima SEZER Ecz. Ceren DURALOĞLU
KARAR BİLGİLERİ	Onay Numarası	639
	Onay Tarihi	18.10.2022
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı	35 adet, Erkek, C57BL/6 fare
	Onay Bilgileri	Proje amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş, çalışmanın gerçekleşmesinde etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.
KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ	Etik Kurul Başkanı A.Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL	e- imzalı
	Etik Kurul Başkan Yardımcısı Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Doç. Dr. M. Kürşat DERİCİ	e- imzalı
	Sorumlu Veteriner Hekim Orkun TARKUN	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Biyolog Fatma Nur İNÇEH	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Hekim Murat Okan HATİPOĞLU	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Biyolog Canan ÇAKIR ÇOBAN	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Zeynep AYDIN TARAKÇI	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Adil KIŞ	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Uzman Diğdem YÖYEN ERMLİŞ	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Ali VAROL	e- imzalı

Etikimza Belge No : kolon2h06ud4ac80260c

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır

Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.

Merkez Ofis : Uzun Çarşı Caddesi, 1308. Sokak No:6 (Odtü Teknokent) Yenimahalle - Ankara

Şube Ofis : İ.O.S.B 21.Cadde 520.Sokak No:2/2 Yenimahalle – Ankara

Telefon : 0 (312) 394 70 94 | Faks : 0(312) 995 06 94

www.kobay.com.tr- bilgi@kobay.com.tr

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

ÜÇ BOYUTLU YAZICI ARACILIĞI İLE HAZIRLANAN MİR-132 VE TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-B3 YÜKLÜ LİPOZOM İÇEREN DUAL ETKİLİ KİTOSAN HİDROJEL İSKELELERİNİN TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN YANIK YARASINDA DEĞERLENDİR

ORJİNALLİK RAPORU

%**9**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**7**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**6**

YAYINLAR

%**3**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Çankırı Karatekin University Öğrenci Ödevi	% 1
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
5	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	research.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
8	abis-files.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	Arpaç, Büsra. "Oral İl̇nsülin Verilisi İl̇çin Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Degerlendirilmesi.", Ankara Universitesi (Turkey), 2024 Yayın	<% 1
10	shmyo.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
11	acikerisim.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
12	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
13	Takafumi Toyohara, Shin-Ichi Mae, Shin-Ichi Sueta, Tatsuyuki Inoue et al. "Cell Therapy Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Renal Progenitors Ameliorates Acute Kidney Injury in Mice", Stem Cells Translational Medicine, 2015 Yayın	<% 1

EK-3: Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Aysima SEZER
 Ödev başlığı: Üç Boyutlu Yazıcı Aracılığı ile Hazırlanan miR-132 ve Transform...
 Gönderi Başlığı: ÜÇ BOYUTLU YAZICI ARACILIĞI İLE HAZIRLANAN MİR-132 VE T...
 Dosya adı: Aysima_SEZER_tez_01.09.2026.docx
 Dosya boyutu: 43.17M
 Sayfa sayısı: 208
 Kelime sayısı: 45,863
 Karakter sayısı: 324,412
 Gönderim Tarihi: 01-Eyl-2026 02:43ÖS (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 3013694192



9. ÖZGEÇMİŞ