



**POTANSİYEL PROBİYOTİK *LACTOBACILLUS PLANTARUM* GD2
TARAFINDAN ÜRETİLEN EKZOPOLİSAKKARİT'İN (EPS) YARA
İYİLEŞME ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Abdullah DEMİR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Abdullah DEMİR

10/02/2022

POTANSİYEL PROBİYOTİK *LACTOBACILLUS PLANTARUM* GD2 TARAFINDAN ÜRETİLEN EKZOPOLİSAKKARİT'İN (EPS) YARA İYİLEŞME ÖZELLİKLERİNİN

ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Abdullah DEMİR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2022

ÖZET

Cilt yaraları, yaşam kalitesini düşüren, amputasyon ve ölüm ile sonuçlanabilen önemli sağlık problemlerinin başında gelmektedir. Klinikte yara iyileşmesi için kullanılan ürünlerin yetersizliği ve yüksek yan etkileri, araştırmacıları yeni terapötik ajanların ve biyomalzemelerin keşfine yönlendirmiştir. Bu yüksek lisans tez çalışmasında, probiyotik *Lactobacillus plantarum* GD2 suşunun, bu suştan elde edilen liyofilize ekzopolisakkaritin (L-EPS) ve sinbiyotiğin (canlı bakteri ve L-EPS kombinasyonu) yara iyileşmesinin farklı fazlarına etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Uygulamaların, L929 fare fibroblast hücrelerinde oluşturulan *in vitro* yara modelinde fibroblast migrasyonu üzerine etkisi belirlenirken, kollajen tip 1 alfa 1 (COL1A1) ve fibronektin (FN) seviyeleri ELISA yöntemi, mRNA ekspresyon düzeyleri qRT-PCR ile tespit edilmiştir. Uygulamaların, dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1)/Smad sinyal yolağı ile ilişkili 4 gen üzerindeki modülatör etkileri ile tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ile indüklenmiş L929 hücrelerinde yara inflamasyonu ile ilişkili genler üzerindeki etkileri qRT-PCR ile belirlenmiştir. Uygulamaların L929 hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi flow sitometri ile tespit edilmiş olup, pro-anjiyojenik etkileri *in ovo* koryoallantoik membran (CAM) modelinde incelenmiştir. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin *in vitro* yara modelinde yara iyileşmesini hızlandırdığı (* p <0,05), L929 hücrelerinde COL1A1 oluşum düzeyini ve gen ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır (* p <0,05). Uygulamalar içerisinde L-EPS ve sinbiyotiğin TGF- β 1, Smad2, Smad3 ve Smad4 genlerinin ekspresyonunu artırarak TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (* p <0,05). Bununla birlikte, TNF- α ile indüklen L929 hücrelerinde L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin artan interlökin 1 beta (IL-1 β), interlökin 6 (IL-6) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gen ekspresyonlarını düşürerek, anti-inflamatuar etki gösterdikleri belirlenmiştir (* p <0,05). Ayrıca, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin hem sağlıklı hem de TNF- α ile indüklenen L929 hücrelerinde proliferatif etkiye sahip olduğu görülmüştür (* p <0,05). *In ovo* CAM modelinde ise hem L-EPS hem de sinbiyotiğin pro-anjiyojenik etki gösterdikleri saptanmıştır (* p <0,05). *L. plantarum* GD2 suşunun, bu suştan elde edilen L-EPS'nin ve sinbiyotiğin yara iyileşme fazlarında farklı mekanizmalar ile çok yönlü iyileştirici etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Çalışmalarda, L-EPS ve sinbiyotik uygulamaları birçok mekanizmada öne çıkmıştır. Sonuç olarak, etki mekanizması ortaya konmuş canlı probiyotik bakterinin, probiyotik kaynaklı L-EPS'nin ve sinbiyotiğin yara iyileşmesinde etkili ajan olabilme potansiyelleri bulunurken, buna ilaveten L-EPS'nin yara iyileştirici biyomalzeme geliştirilmesinde kullanılabilme potansiyeli de bulunabilir.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : L929 fare fibroblast hücre hattı, Yara iyileşmesi, Probiyotik, Sinbiyotik, Ekzopolisakkarit (EPS), Biyomalzeme
Sayfa Adedi : 139
Danışman : Prof. Dr. Belma ASLİM

INVESTIGATING WOUND HEALING PROPERTIES OF EXOPOLYSACCHARIDE (EPS) PRODUCED BY THE POTENTIAL PROBIOTIC *LACTOBACILLUS*

PLANTARUM GD2

(M. Sc. Thesis)

Abdullah DEMİR

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2022

ABSTRACT

Skin wounds are one of the major health problems that reduce the quality of life and might result in amputation and death. The insufficiency and severe side effects of the products used in the clinic for wound healing have prompted researchers to discover novel therapeutic agents and biomaterials. The purpose of this master's thesis research is to determine the effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* GD2 strain, lyophilized exopolysaccharide (L-EPS) obtained from this strain, and synbiotic (combination of live bacteria and L-EPS) on various phases of wound healing. While determining the effects of the treatments on fibroblast migration with *in vitro* wound model created in L929 mouse fibroblasts, collagen type 1 alpha 1 (COL1A1) and fibronectin (FN) levels were determined by ELISA method, and mRNA expression levels were determined by qRT-PCR. Modulatory effects of treatments on 4 genes associated with transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1)/Smad signaling pathway and effects on genes related to wound inflammation in tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)-induced L929 cells were determined by qRT-PCR. Flow cytometry was used to determine the proliferative effects of the treatments in L929 cells, and the pro-angiogenic effects were examined using the *in ovo* chorioallantoic membran (CAM) model. It was found that L-EPS, live bacteria, and synbiotic accelerated wound healing in *in vitro* wound model (* p <0.05), and increased the production level and mRNA expression of COL1A1 in L929 cells (* p <0.05). It was determined that L-EPS and synbiotic are efficient on TGF- β 1/Smad signaling pathway by increasing the expression of TGF- β 1, Smad2, Smad3 and Smad4 genes in the conducted treatments (* p <0.05). It was further detected that L-EPS, live bacteria and synbiotic showed anti-inflammatory effects by down-regulating the increased interleukin 1 beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expressions in TNF- α -induced L929 cells (* p <0.05). In additionally, L-EPS, live bacteria and synbiotic were found to have proliferative effect on both healthy and TNF- α -induced L929 cells (* p <0.05). L-EPS and synbiotic were both shown to exert pro-angiogenic effects in *in ovo* CAM model (* p <0.05). *L. plantarum* GD2 strain, as well as both L-EPS and synbiotics produced from this strain, have multifaceted healing effect, including several mechanisms in the wound healing phases. L-EPS and synbiotic applications came to the fore in studies on many wound healing mechanisms. In conclusion, probiotic bacteria, probiotic-obtained L-EPS, and synbiotic have the potential to be an efficient agent in wound healing, and moreover, L-EPS may have the potential to be used in the development of wound-healing biomaterials.

Science Code : 20309

Key Words : L929 mouse fibroblast cell line, Wound healing, Probiotic, Synbiotic, Exopolysaccharide (EPS), Biomaterial

Page Number : 139

Supervisor : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü araştırma olanağı sağlayan, deneyimleri ve fikirleri ile bana her konuda yol gösteren değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Belma ASLİM'a en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a, elektron mikroskop deneylerimde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Zekiye SULUDERE'ye teşekkür ederim. Tez sürecimde, hem deneysel çalışmalarımındaki yardımları hem de manevi destekleri ile her zaman yanımda olan değerli hocam Öğr. Gör. Serap NİĞDELİOĞLU DOLANBAY'a ve ekip arkadaşım Merve İÇİN'e en içten duygularıyla teşekkür ederim. Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda birlikte çalıştığım ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olduklarını hissettiren değerli arkadaşlarım Buse DENGİZ, Belgin GÜLDESTE, Jaafar AKEF ve Sahra Setenay BARAN başta olmak üzere tüm Biyoteknoloji ekibine ve Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri personeli Sayın Doğan KARA'ya teşekkürü borç bilirim. Yüksek lisans eğitimim boyunca sevgileri ve sonsuz destekleri ile yanımda olduklarını hissettiren, Ankara'da beni yalnız bırakmayan ve manevi aile üyelerim olan Rabia TIĞLI, Buse BAHAR, Utku ÖZBEY, Gözde ŞÜKÜR, Buket ATASAYAR, Zeynep GÜZELOĞLU ve Cihan ŞİKER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bugünlere gelmemde destekleri büyük olan ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim annem Nigar DEMİR, babam Harun DEMİR, kardeşlerim Samet DEMİR ve Beren Nisa DEMİR'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tez çalışması, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından 05/2020-08 No'lu proje ile desteklenmiştir. Tez çalışmama sağladıkları maddi katkılardan dolayı Gazi Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Cildin Tanımı, Fizyolojisi ve Önemi.....	5
2.2. Yara İyileşmesi ve Onarım Mekanizmaları ile İlgili Genel Bilgiler	6
2.2.1. Genel bakış: Yara oluşumu ve yara tipleri	6
2.2.2. Yara iyileşmesinin fazları.....	7
2.2.3. Yara iyileşmesinin inflamasyon fazı	8
2.2.4. Yara iyileşmesinin proliferasyon fazı (granülasyon doku formasyonu) ...	9
2.2.5. Yara iyileşmesinin remodeling fazı.....	14
2.3. Yara İyileşmesinde Büyüme Faktörlerinin Rolü.....	16
2.4. Kronik Yaralar.....	17
2.5. Yara İyileşmesinde Kullanılan Tedavi Stratejileri	19
2.5.1. Güncel tedavi yaklaşımları	19
2.5.2. Yara iyileşmesinde biyomalzemelerin kullanımı	20
2.6. Probiyotikler	21
2.6.1. Probiyotiklerin cilt onarımı ve yara iyileşmesinde.....	22
kullanılma potansiyeli	22
2.6.2. Spesifik probiyotik biyoaktif moleküllerinin yara iyileşmesindeki rolü...	28
2.7. Polisakkaritler.....	29

	Sayfa
2.7.1. Probiyotik polisakkaritlerin yara iyileşmesinde kullanılma potansiyeli ...	30
2.8. Ekzopolisakkaritler (EPS'ler).....	31
2.8.1. EPS'lerin yara iyileşmesinde kullanılma potansiyelleri.....	31
2.9. Sinbiyotikler	32
2.10. Yara İyileşmesi Çalışmalarında Kullanılan Deney Modelleri.....	33
2.10.1. <i>İn vitro</i> yara modeli	33
2.10.2. TNF- α ile indülenen <i>in vitro</i> inflamasyon modeli.....	33
2.10.3. <i>İn ovo</i> koryoallantoik membran (CAM) modeli.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Gereç.....	35
3.1.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizma.....	35
3.1.2. Çalışmada kullanılan hücre hattı	35
3.2. Yöntem	36
3.2.1. <i>L. plantarum</i> GD2 suşunun kültür koşulları ve muahafazası	36
3.2.2. <i>L. plantarum</i> GD2'nin probiyotik kültürlerinin hazırlanışı.....	37
3.2.3. EPS'nin izolasyonu, miktar tayini ve hazırlanışı	38
3.2.4. Sinbiyotiklerin hazırlanışı	40
3.2.5. Hücre kültürünün hazırlanması ve ortam koşulları	40
3.2.6. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) testleri...	41
3.2.7. <i>İn vitro</i> yara modelinin oluşturulması (scratch assay) ve yara kapanma analizi	43
3.2.8. L929 hücrelerinde kollajen ve fibronektin oluşum düzeylerinin ELISA kiti ile belirlenmesi	45
3.2.9. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin gen düzeyinde etkilerinin belirlenmesi	47
3.2.10. Flow sitometri analizi	51
3.2.11. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin <i>in ovo</i> koryoallantoik membran (CAM) modelinde pro-anjiyojenik etkilerinin tespit edilmesi	53

	Sayfa
3.2.12. İstatistiksel analizler	54
4. DENEYSEL BULGULAR	55
4.1. <i>Lactobacillus Plantarum</i> GD2 Suşunun L-EPS Miktarı	55
4.2. L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotik Uygulamalarının Hücre Canlılığı Üzerine Sitotoksik Etkileri	55
4.2.1. L-EPS uygulamasının L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksite sonuçları .	55
4.2.2. Canlı bakteri uygulamasının L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksite sonuçları	56
4.2.3. Sinbiyotik uygulamasının L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksite sonuçları	57
4.3. TNF- α ile İndüklenen L929 Hücrelerinde L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotiğin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	59
4.4. <i>In Vitro</i> Yara Modeli (Scratch Assay) ile Belirlenen Yara İyileşmesi Sonuçları	61
4.4.1. L-EPS'nin <i>in vitro</i> yara iyileşmesi üzerine etkisinin belirlenmesi	61
4.4.2. Canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamasının <i>in vitro</i> yara iyileşmesi üzerine etkisinin belirlenmesi	64
4.5. L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotiğin L929 Fibroblast Hücrelerinde Kollajen ve Fibronektin Üzerine Etkisi	67
4.5.1. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının COL1A1 ve FN oluşum düzeyleri üzerine etkisi	68
4.5.2. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının COL1A1 ve FN mRNA ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi	70
4.6. L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotiğin TGF β -1/Smad Sinyalizasyonu Üzerindeki Modülatör Etkilerinin Belirlenmesi	73
4.7. TNF- α ile İndüklenen İnflamasyon Modelinde L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotiğin Anti-inflamatuvar Etkileri	77
4.8. L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotiğin Fibroblast Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Flow Sitometri ile Belirlenmesi	81
4.9. L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotiğin Pro-anjiyojenik Potansiyellerinin <i>in ovo</i> Koryoallantoik Membran (CAM) Modelinde İncelenmesi	84
5. TARTIŞMA	91

	Sayfa
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	109
KAYNAKLAR	115
ÖZGEÇMİŞ	139



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Yara iyileşmesinde rol alan büyüme faktörleri ve yara iyileşmesindeki görevleri.....	17
Çizelge 2.2. Cilt sağlığı üzerinde faydalı olduğu bilinen en yaygın probiyotikler.....	23
Çizelge 3.1. L929 hücre hattının özellikleri	35
Çizelge 3.2. MRS broth besiyerinin içeriği	36
Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan probiyotik kültürlerinin hacimleri ve konsantrasyonları.....	38
Çizelge 3.4. Çalışmalarda kullanılan hücre kültürü besiyeri içerikleri	41
Çizelge 3.5. Sağlıklı L929 hücrelerinin canlılığının belirlenmesinde kullanılan uygulama grupları.....	42
Çizelge 3.6. TNF- α ile indüklenen L929 hücrelerinin canlılığının belirlenmesinde kullanılan uygulama grupları.....	43
Çizelge 3.7. <i>In vitro</i> yara modelinde kullanılan uygulama grupları.....	44
Çizelge 3.8. COL1A1 ve FN ELISA çalışmasında kullanılan uygulama grupları.....	46
Çizelge 3.9. COL1A1, FN, TGF- β 1, Smad2, Smad3, Smad4 mRNA ekspresyonlarının analizinde kullanılan uygulama grupları.....	47
Çizelge 3.10. IL-1 β , IL-6 ve iNOS mRNA ekspresyonlarının analizinde kullanılan uygulama grupları.....	48
Çizelge 3.11. qRT-PCR koşulları	50
Çizelge 3.12. qRT-PCR analizinde kullanılan primerler ve dizileri.....	50
Çizelge 3.13. Flow sitometri analizinde kullanılan uygulama grupları.....	52
Çizelge 3.14. <i>In ovo</i> CAM modelinde kullanılan uygulama grupları.....	53
Çizelge 4.1. TNF- α ile indüklenen L929 hücrelerinde L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları sonucu elde edilen en düşük ve en yüksek % hücre ölümü değerleri, n: 3, OD $\pm$ SD	61
Çizelge 4.2. L929 hücrelerinde TNF- α ile indüklenme sonu artan IL-1 β , IL-6 ve iNOS mRNA ekspresyon düzeylerindeki L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları ile tespit edilen azalma miktarlarının katsayıları.....	80

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. İnsan derisinin yapısı ve organizasyonu.....	5
Şekil 2.2. Hücrelerin, hasarlanmalara ve farklı faktörlere karşı adaptasyonları.....	7
Şekil 2.3. Yara iyileşmesinin zamana göre gerçekleşen fazları	7
Şekil 2.4. Yaralanma sonrası TRPV1 ve TRPA1 kanallarının aracılığıyla indüklenen nosiseptif inflamasyon.....	9
Şekil 2.5. Yaralanma sonrası keratinositlerin ve fibroblastların çift parakrin sinyalizasyonu	10
Şekil 2.6. Yara anjiyogenezinin şematik gösterimi	11
Şekil 2.7. TGF- β 'nın, doku onarımı sırasında fibrotik cevapları tetikleme mekanizmaları	13
Şekil 2.8. TGF- β 1/Smad sinyal yolağı	14
Şekil 2.9. Yara iyileşmesinin farklı fazlarında kollajenin fonksiyonel rolleri. H: Hemostaz, I: İnflamasyon fazı, P: Proliferasyon fazı, M: Olgunlaşma (remodeling) fazı	15
Şekil 2.10. Normal cilt ile skar oluşumu olan cildin karşılaştırması	16
Şekil 2.11. Akut ve kronik yara iyileşmesi arasındaki hücresel ve moleküler farklılıklar	18
Şekil 2.12. Bağırsak-beyin-cilt eksenini aracılığıyla yara iyileşmesini etkileyen bağırsak mikrobiyota hipotez modeli	22
Şekil 2.13. Probiyotiklerin cilt ve mukozal yüzeylerde patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal etkileri	24
Şekil 2.14. Kronik yara iyileşmesinde canlı biyo-terapötiklerin rolü. AMP: antimikrobiyal peptit, APC: antijen sunan hücreler, CALT: kütanöz ilişkili lenfoid dokular, MDR: çoklu ilaç direnci, SCFA: kısa zincirli yağ asidi ...	25
Şekil 3.1. Glukoz standart eğrisi. OD: Optik dansite.....	39
Şekil 3.2. COL1A1 standart eğrisi. OD: Optik dansite	46
Şekil 3.3. FN standart eğrisi. OD: Optik dansite	46
Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan primerler ile hedef gen bölgelerinin erime eğrileri. (a) COL1A1, (b) FN, (c) TGF- β 1, (d) Smad2, (e) Smad3, (f) Smad4, (g) IL-1 β , (h) IL-6, (i) iNOS, (j) GAPDH	51

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. L-EPS uygulanmış L929 hücrelerinin % hücre canlılığı sonuçları, n: 3, OD $\pm$ SD	56
Şekil 4.2. Canlı bakteri uygulanmış L929 hücrelerinin % hücre canlılığı sonuçları. DMEM (a) ve mDMEM (b) uygulamaları, n: 3, OD $\pm$ SD	57
Şekil 4.3. Sinbiyotik uygulanmış L929 hücrelerinin % hücre canlılığı sonuçları, DMEM (a) ve mDMEM (b) uygulamaları, n: 3, OD $\pm$ SD	58
Şekil 4.4. TNF- α ile indüklenen L929 hücrelerinde L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları sonucu elde edilen % hücre canlılığı sonuçları, (a) 10 ng/mL, (b) 20 ng/mL ve (c) 50 ng/mL TNF- α ile indüklenen L929 hücreleri, n: 3, OD $\pm$ SD	60
Şekil 4.5. L-EPS uygulanmış L929 hücrelerinde <i>in vitro</i> yara kapanma sonuçları, (a) yara kapanma mikrografları (4x), (b) % yara kapanma değerleri, n: 5, OD $\pm$ SD	63
Şekil 4.6. L-EPS uygulanmış L929 hücrelerinde <i>in vitro</i> yara kapanmasının SEM görüntüleri (5 kv, 100x). (a) 18 saat DMEM uygulaması (kontrol grubu), (b) 24 saat DMEM uygulaması (kontrol grubu), (c) 18 saat 1000 μ g/mL L-EPS uygulaması, (d) 24 saat 1000 μ g/mL L-EPS uygulaması	64
Şekil 4.7. DMEM besiyerinde uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin L929 hücrelerinde <i>in vitro</i> yara kapanma sonuçları, (a) yara kapanma mikrografları (4x), (b) % yara kapanma değerleri, n: 5, OD $\pm$ SD	66
Şekil 4.8. mDMEM besiyerinde uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin L929 hücrelerinde <i>in vitro</i> yara kapanma sonuçları, (a) yara kapanma mikrografları (4x), (b) % yara kapanma değerleri, n: 5, OD $\pm$ SD	67
Şekil 4.9. L929 hücrelerine uygulanan L-EPS'nin COL1A1 ve FN oluşum düzeyi üzerindeki etkisi. (a) COL1A1 sonuçları, (b) FN sonuçları, n: 3, OD $\pm$ SD ..	69
Şekil 4.10. DMEM ve mDMEM besiyerinde uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin COL1A1 ve FN oluşum düzeyi üzerindeki etkileri. (a) COL1A1 sonuçları, (b) FN sonuçları, n: 3, OD $\pm$ SD	70
Şekil 4.11. 750 ve 1000 μ g/mL L-EPS'nin 18 ve 24 saat uygulamalarının L929 hücrelerinde COL1A1 ve FN mRNA ekspresyonları üzerindeki etkisi. (a) COL1A1 sonuçları, (b) FN sonuçları, n: 3, OD $\pm$ SD	71
Şekil 4.12. DMEM ve mDMEM besiyerinde uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin COL1A1 ve FN mRNA ekspresyonları üzerindeki etkileri. (a) COL1A1 sonuçları, (b) FN sonuçları, n: 3, OD $\pm$ SD	72
Şekil 4.13. L929 hücrelerine uygulanan L-EPS'nin TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerindeki modülatör etkisi. (a) TGF- β 1, (b) Smad2, (c) Smad3 ve (d) Smad4 mRNA ekspresyonu sonuçları, n: 3, OD $\pm$ SD	75

Şekil	Sayfa
Şekil 4.14. L929 hücrelerine 24 saat uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerindeki modölatör etkisi. (a) TGF- β 1, (b) Smad2, (c) Smad3 ve (d) Smad4 mRNA ekspresyonu sonuçları, Sonuçlar, n: 3, OD $\pm$ SD	76
Şekil 4.15. 20 ng/mL TNF- α ile 30 dk., 1 saat ve 3 saat indüklenen L929 hücrelerinde 18 saat DMEM uygulaması sonrası tespit edilen IL-1 β mRNA ekspresyon seviyeleri.....	78
Şekil 4.16. TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerine uygulanan L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin IL-1 β mRNA ekspresyonu üzerine etkileri, n: 3, OD $\pm$ SD	79
Şekil 4.17. TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerine uygulanan L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin IL-6 mRNA ekspresyonu üzerine etkileri, n: 3, OD $\pm$ SD ..	79
Şekil 4.18. TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerine uygulanan L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin iNOS mRNA ekspresyonu üzerine etkileri, n: 3, OD $\pm$ SD	80
Şekil 4.19. 750 ve 1000 μ g/mL L-EPS'nin 24 saat uygulanması sonucu sağlıklı ve TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerinde elde edilen proliferasyon sonuçları. (a) Flow sitometri analizi sonuçları, (b) % bölünme değerleri, n:3, OD $\pm$ SD.....	83
Şekil 4.20. Canlı bakteri ve sinbiyotiğin 24 saat uygulanması sonucu sağlıklı ve TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerinde elde edilen proliferasyon sonuçları. (a) Flow sitometri analizi sonuçları, (b) % bölünme değerleri, n:3, OD $\pm$ SD	84
Şekil 4.21. 750 ve 1000 μ g/mL L-EPS'nin 12 ve 24 saat uygulamalarının pro-anjiyogenik etkileri. (a) L-EPS'nin anjiyogenez üzerine etkisinin <i>in ovo</i> CAM modelinde mikroskopik gösterilimi (1x) ve (b) uygulama sonrası ölçülen total damar uzunluğu kat sayısı değerleri, n: 3, OD $\pm$ SD.....	87
Şekil 4.22. Canlı bakteri ve sinbiyotiğin 12 ve 24 saat uygulamalarının pro-anjiyogenik etkileri. (a) Uygulamaların anjiyogenez üzerine etkisinin <i>in ovo</i> CAM modelinde mikroskopik gösterilimi (1x) ve (b) uygulama sonrası ölçülen total damar uzunluğu kat sayısı değerleri, n: 3, OD $\pm$ SD...	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler Açıklamalar

\$	Dolar
%	Yüzde
<	Küçüktür
>	Büyüktür
≤	Küçük veya eşittir
°	Derece
°C	Santigrat derece
μm	Mikrometre
cfu/mL	Koloni oluşturan birim/mililitre
Dk	Dakika
g	Gram
g/L	Gram/Litre
m ²	metrekare
ng/mL	nanogram/mililitre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Δ	Delta
μg	Mikrogram
μg/mL	Mikrogram/mililitre
μL	Mikrolitre

Kısaltmalar Açıklamalar

ADAM	Bir disintegrin ve metalloproteaz
ADAMT	Trombospondin motifli bir disintegrin ve metalloproteaz
aFGF	Asidik fibroblast büyüme faktörü

Kısaltmalar	Açıklamalar
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
CAM	Koryoallantoik membran
CGRP	Kalsitonin geni ile ilişkili peptit
COL1A1	Kollajen tip 1 alfa 1
DETC	Dendritik epidermal T hücreleri
ECM	Ekstrasellüler matriks
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EMT	Epitel-mezenkimal geçiş
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FN	Fibronektin
GAG	Glikozaminoglikan
HA	Hiyalüronik asit
IL-1	İnterlökin 1
IL-1β	İnterlökin 1 beta
IL-6	İnterlökin 6
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KGF	Keratinosit büyüme faktörü
MMP	Matriks metalloproteinaz
MTT	Tiazolil mavi
NO	Nitrik oksit
OD	Optik dansite, ortalama değer
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
ROS	Reaktif oksijen türevleri
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü
TGF-β1	Dönüştürücü büyüme faktörü 1
TGF-β2	Dönüştürücü büyüme faktörü 2
TGF-β3	Dönüştürücü büyüme faktörü 3
TGF-βRI	Dönüştürücü büyüme faktörü reseptör tip I
TGF-βRII	Dönüştürücü büyüme faktörü reseptör tip II
TIMP	Metalloproteinazların doku inhibitörü
TLR	Toll-benzeri reseptör
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa

Kısaltmalar	Açıklamalar
TRP	Geçici reseptör potansiyel kanalı
TRPA1	Geçici reseptör potansiyel ankirin 1
TRPV1	Geçici reseptör potansiyel vanilloid 1
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü
$\gamma\delta$ T hücreleri	Gama delta T hücreleri



1. GİRİŞ

Yara; cilt, mukoza ve doku organizasyonun bir veya bir kaçının bozulması olarak tanımlanır (Kujath ve Michelsen, 2008). Yaralanmaya sebep olan faktörlere örnek olarak; fiziksel ve kimyasal yanıklar, basınç, arteriyel ve/veya venöz vasküler zayıflama, immün yetmezlik, malignite, bağ dokusu bozuklukları ve diyabet gibi metabolik hastalıklar verilebilir (Shankar ve diğerleri, 2014; Pavel ve diğerleri, 2020). Enfeksiyonlu yanık yaraları (Rowan ve diğerleri, 2015), nöropati ve vasküler bozukluklar ile ilişkili diyabetik yaralar (Xs, 2018), yaşlanan nüfusa bağlı olarak artan yatan hasta popülasyonundaki basınç yaraları (Boyko ve diğerleri, 2018) ve cilt kanserine bağlı gelişen yaralar (Pavel ve diğerleri, 2020) günümüzde hala önemli sağlık problemlerinin başında gelmektedir.

Yaralar, akut ve kronik yaralar olarak kategorize edilmektedir (Whitney, 2005). Cilt yaralarının iyileşmesi, hücre migrasyonunun ve proliferasyonunun birbiriyle ilişkili mekanizmalarını, kollajen ve fibronektin gibi ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerinin sentezini, neovaskülarizasyonu, iyileşme sürecini koordine eden büyüme faktörlerini ve sitokinleri içeren kompleks bir süreç olup, yara iyileşmesi inflamasyon, proliferasyon ve remodeling olmak üzere üç temel faz ile gerçekleşir (Gushiken ve diğerleri, 2021). Yara iyileşme süreci akut yaralarda olduğu gibi normal devam etmediğinde yaralar gecikir veya kronikleşir (Han ve Ceilley, 2017). Kronik yaraların iyileşmesi genellikle inflamatuvar fazda durur ve iyileşme sürecindeki fazların mekanizmaları olağan şekilde ilerlemez (Frykberg ve Banks, 2015). Diyabet, kanser ve vaskülopati gibi hastalıkların neden olduğu kronik yaraların artışına paralel olarak artan hasta sayısı klinik, ekonomik ve sosyal problemlerin artmasına neden olmaktadır (Negut ve diğerleri, 2018; Zhang ve diğerleri, 2020). Hem içsel hem de dışsal faktörlere duyarlı olan cildin bütünlüğünde meydana gelen fizyolojik bozukluklar, uzuv kaybına hatta ölüme neden olabilmektedir (Murphree, 2017). Tedavisi zor olan bu yaralar ile mücadele etmek için klinikte temel olarak sistemik antibiyotik tedavileri, çeşitli pansumanlar ve yara iyileşmesini desteklemek için yapılan operatif debridmanlar kullanılır. Bu rutin tedavi yöntemlerinin, uzun bir tedavi sürecine ve yüksek maliyetlere neden olması ile birlikte, operatif debridmanların anestezi gerektirmesi ve sistemik antibiyotik kullanımının yüksek yan etkilere sebep olması nedeniyle, yara iyileşme patofizyolojisinin aşamalarını çoklu hedefleyen ve yan etkileri düşük yeni terapötik ajanların bulunmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir (Zhang ve diğerleri, 2020).

Yara iyileşmesinde biyomalzemelerin kullanımı; yara bölgesi için nemli bir ortam sağlama, yarayı patojenlerden koruma, antibakteriyel ve antioksidan etki oluşturabilme, kolay uygulanabilme imkanı ve farklı mekanik özellikler ile iyileşmeyi destekleyebilme gibi avantajları bakımından son yıllarda ilgi çekici olmuştur (Yu ve diğerleri, 2022). Yara iyileşmesinde hem doğal hem de sentetik biyomalzemeler kullanılabilmekte olup, kullanılan doğal biyomalzemelerde biyo-uyumluluk, biyo-bozunurluk ve sitotoksik olmama özellikleri aranmaktadır. Kollajen, jelatin, hiyalüronik asit (HA), kitosan, aljinat, elastin ve ipek fibroin yara iyileşmesinde biyomateryal olarak kullanılan biyopolimerlerden bazılarıdır (Nour ve diğerleri, 2019). Diğer yara tedavi stratejilerine kıyasla biyomalzemelerin kullanımı daha verimli olsa da bu uygulamaların en büyük kısıtlaması yüksek maliyetli olmasıdır. Yara tedavilerinin zorlukları ve yüksek klinik harcamaları göz önünde bulundurulduğunda, en az muadilleri kadar etkili olabilecek ekonomik yara biyomalzemelerinin üretilmesi, hastaların hayat kalitesinin yükselmesi ve yara bakımlarının neden olduğu sağlık yükünün azaltması bakımından önem arz etmektedir (Bahar, 2021).

Probiyotik mikroorganizmaların hastalıkların önlenmesinde farmakolojik olarak kullanımını tanımlayan ifade olarak canlı biyoterapötikler kavramı, 2012 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından resmi olarak yeni bir tıbbi ürün kategorisinde bildirilmiş olup, probiyotiklerin terapötik olarak canlı uygulanmaları dikkat çekici olmuştur (Cordailat-Simmons ve diğerleri, 2020). Probiyotikler; amino asitler, vitaminler, bakteriyosinler, enzimler, küçük peptitler, kısa zincirli yağ asitleri ve polisakkaritler gibi zengin metabolit içerikleri ile biyoaktif moleküllerin üreticisi olma potansiyelleri bakımından öne çıkmaktadır (Indria ve diğerleri, 2019). Günümüze kadar probiyotiklerin ve metabolitlerinin; antioksidan, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, anti-obezite, anti-diyabetik, anti-kanser, nöroprotektif, immünomodülatör, anti-alerjik ve doku onarımını teşvik etme gibi farklı yararlı etkileri literatürde bildirilmiştir (Fijan, 2016; Lukic ve diğerleri, 2017; Plaza-Díaz ve diğerleri, 2017; Wang ve diğerleri, 2017; Michael ve diğerleri, 2019; Tukenmez ve diğerleri, 2019; Mazhary ve diğerleri, 2020; Sirin ve Aslim, 2020; Ranjha ve diğerleri, 2021). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, probiyotiklerin kozmetik alanlarda kullanımı, cilt lekelerini giderici etkileri, cilt yenilenmesi ve yara iyileştirici etkileri dikkat çekmektedir (Al-Ghazzewi ve Tester, 2014).

Ekzopolisakkarit (EPS); bitkiler, mantarlar, algler ve bakteriler tarafından üretilen, şeker ve şeker türevlerinin monosakkarit rezidülerinden oluşan biyopolimerdir. Ekstrasellüler ortama

salgılanan EPS'ler, tek tip monosakkarit içeren homopolisakkarit ve D-glukoz, D-galaktoz, L-ramnoz, N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin, glukoronik asit gibi yapıları içeren heteropolisakkarit olmak üzere iki grup altında toplanır (Nwodo ve diğerleri, 2012; Schmid ve diğerleri, 2015). Marin bakterilerinden elde edilen EPS'ler ile yapılan çalışmalar, EPS'nin insan dermal fibroblastlarında güçlü bir antioksidan etki sağladığını, fibroblast migrasyonunu indüklediğini (Sun ve diğerleri, 2020), keratinositlerin ve fibroblastların proliferasyonunu arttırdığını (Sahana ve Rekha, 2019) ve hücre adezyonunu desteklediğini göstermiştir (Sahana ve Rekha, 2020). Bununla birlikte, literatürde probiyotik kaynaklı EPS'lerin cilt yaraları üzerindeki etkilerini gösteren sadece iki çalışma bulunmasıdır. Bu çalışmalar, probiyotik EPS'lerinin antioksidan ve antibakteriyel özelliklerini, *in vivo* yara kapanması ve kollajen birikimi üzerindeki etkisini (Trabelsi ve diğerleri, 2017), anti-elastaz ve anti-kollajenaz aktivitelerini (Shirzad ve diğerleri, 2018) gösteren, sınırlı miktarda deneysel çalışma kapsayan araştırmalardır. Ayrıca EPS'lerin biyo-uyumlu ve biyo-parçalanabilir olmaları, düşük sitotoksik etkide olmaları ve kimyasal işlevsellikleri dikkate alındığında, probiyotik kaynaklı EPS'lerin yara iyileştirici etken madde veya yara biyomalzemesi olma potansiyeli de bulunmaktadır (Banerjee ve diğerleri, 2021; Hivechi ve diğerleri, 2021). Bu potansiyellerine rağmen günümüze kadar probiyotik EPS'lerinin, yara iyileşme fazlarındaki birçok mekanizma üzerindeki etkisinin ortaya konulduğu bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda sinbiyotiklerin (probiyotik ve prebiyotik kombinasyonu), probiyotik uygulamalarına göre daha etkili ve sağlık için faydalı doğal kombinasyonlar olarak öne çıkmasına rağmen (Pandey ve diğerleri, 2015; Batista ve diğerleri, 2020), literatürde sinbiyotiklerin yara iyileşmesi üzerine etkisini gösteren herhangi bir çalışma mevcut değildir. Literatürde bahsedilen bu eksikliklerin giderilebilmesi amacıyla aşağıdaki hedefler ve amaçlar belirlenmiştir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında;

1. Yara iyileşmesinde kullanılabilecek yeni bir etken madde veya biyomalzeme geliştirici yeni bir ajan bulmak amacıyla *Lactobacillus plantarum* GD2 suşu ve bu suştan elde edilen liyofilize EPS (L-EPS) ve sinbiyotiğin (canlı probiyotik bakteri ve L-EPS kombinasyonu) fibroblast hücreleri üzerinde yara iyileştirme potansiyellerinin çoklu mekanizmalar (inflamasyon, proliferasyon, migrasyon, ekstrasellüler matriks üretimi, neovaskülarizasyon) üzerinden ortaya konulması,

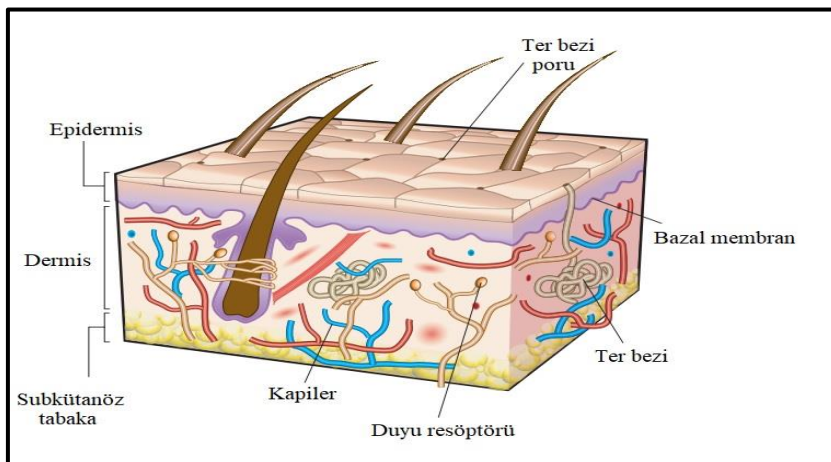
2. Üç farklı probiyotik kaynağı içerisinde, yara iyileşmesinde hangisinin daha etkili olduğu ve etkin oldukları uygun doz ve sürelerin belirlenmesi,
3. Probiyotik kaynaklı uygulamaların, fibroblast migrasyonu üzerine etkisinin incelenerek yara kapanmasında ne derece etkin olduklarının ortaya konulması,
4. Probiyotik kaynaklı uygulamaların, fibroblastlar aracılığıyla kollajen ve fibronektin sentezi üzerindeki etkilerinin araştırılıp, yara bölgesinde ECM oluşumunu sağlayarak yara iyileşmesinde etkin olabilme potansiyellerinin tespit edilmesi,
5. Probiyotik kaynaklı uygulamaların, dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1)/Smad sinyal yolağı üzerinde etkisini ortaya koyarak, uygulamaların bu sinyal yolağı aracılığıyla yara iyileşmesindeki proliferasyon, migrasyon ve ECM üretimi aşamaları üzerindeki ilişkisinin açığa çıkarılması,
6. Probiyotik kaynaklı uygulamaların, yara inflamasyonu üzerindeki etkilerinin incelenerek inflamasyon kaynaklı geç iyileşen veya iyileşmeyen yaralardaki anti-inflamatuar etkilerinin ortaya konulması,
7. Probiyotik kaynaklı uygulamaların, hem sağlıklı hem de inflamasyonun indüklendiği fibroblastlar üzerindeki proliferatif etkilerinin gösterilmesi,
8. Probiyotik kaynaklı uygulamaların, pro-anjiyojenik özelliklerinin belirlenerek yara bölgesinde yeni kan damarlarının oluşumuyla yaranın mikroçevresini besleyerek iyileşmesini destekleyebilecek yeni ajan ve/veya biyomalzeme olma potansiyellerinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

Yukarıdaki hedefler doğrultusunda bu yüksek lisans tez çalışmasında, karmaşık bir patofizyolojiye sahip olan yara iyileşmesinde çoklu mekanizmalar ile farklı yara tiplerinde kullanılabilecek ve tek bir ajan olarak kullanılıp çok yönlü etki gösterebilme potansiyeli olan probiyotik kaynaklı yeni terapötik ajanların ve/veya biyomalzeme üretiminde kullanılabilecek polimerin bulunması amaçlanmıştır. Probiyotik kaynaklı uygulamaların yara iyileşmesinde; TGF- β 1/Smad sinyal yolağı aracılığıyla fibroblast migrasyonu, proliferasyonu ve kollajen sentezini indükleyici etkilerinin yanı sıra anti-inflamatuar ve pro-anjiyojenik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bu sayede, alternatiflerine göre yara iyileşmesinde çok yönlü etkilere sahip olan bu uygulamaların yeni terapötik ajanlar olarak, ayrıca L-EPS'nin yara iyileşmesinde kullanılabilecek yeni bir biyomalzeme olarak önü açılacak ve çalışmamız yara tedavisine yönelik yeni ajanlar keşfetmeyi hedefleyen çalışmalara örnek teşkil edecektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Cildin Tanımı, Fizyolojisi ve Önemi

Cilt (deri), yetişkin insanlar için tahmini toplam ağırlığı 5 kg ve yüzeyi yaklaşık 2 m² olan, memeli vücudunun en büyük organıdır (Summerfield ve diğerleri, 2015). İnsan derisi epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere farklı şekilde özelleşmiş 3 katmandan oluşmaktadır (Wong ve diğerleri, 2016). Epidermis, temel olarak keratinosit katmanlarından oluşsa da antijen sunan dendritik Langerhans hücreleri, melanositler ve Merkel hücreleri dahil olmak üzere epitel olmayan hücreler de içerir. Epidermis, interasellüler sıvıların dermal vaskülatürden difüzyonu ile beslenir (Abdo ve diğerleri, 2020). Keratinositler farklılaştıkça epidermiste; stratum spinosum, stratum granulosum, stratum corneum olarak bilinen bazal tabakanın üzerinde üç katman oluşturur (Maibach ve Honari, 2014). Dermis, derinin mezenşimal bileşeni olup epidermisten bazal membran ile ayrılır (Rippa ve diğerleri, 2019). Fibroblastlar, dermiste en çok bulunan hücrelerdir. Bu hücrelerin karakteristik özelliği, ekstrasellüler matriksi (extracellular matrix, ECM) sentezleme ve yeniden modelleme (remodeling) yeteneğidir. Remodeling, metalloproteinazlarının ve inhibitörlerinin sentezi ile desteklenmektedir (Thulabandu ve diğerleri, 2018). Kollajen tip 1 sentezleme yeteneği fibroblastların karakteristik özelliğidir (Thulabandu ve diğerleri, 2018; Rippa ve diğerleri, 2019). Hipodermis (subkutan yağ); adipositler, makrofajlar, vaskülatür, sinirler ve fibroblastlardan oluşur ve işlevi epidermal ile dermal tabakaları desteklemektir (Jahrom ve diğerleri, 2018). İnsan derisinin yapısı Şekil 2.1’de şematize edilmiştir.



Şekil 2.1. İnsan derisinin yapısı ve organizasyonu (Macneil, 2007)

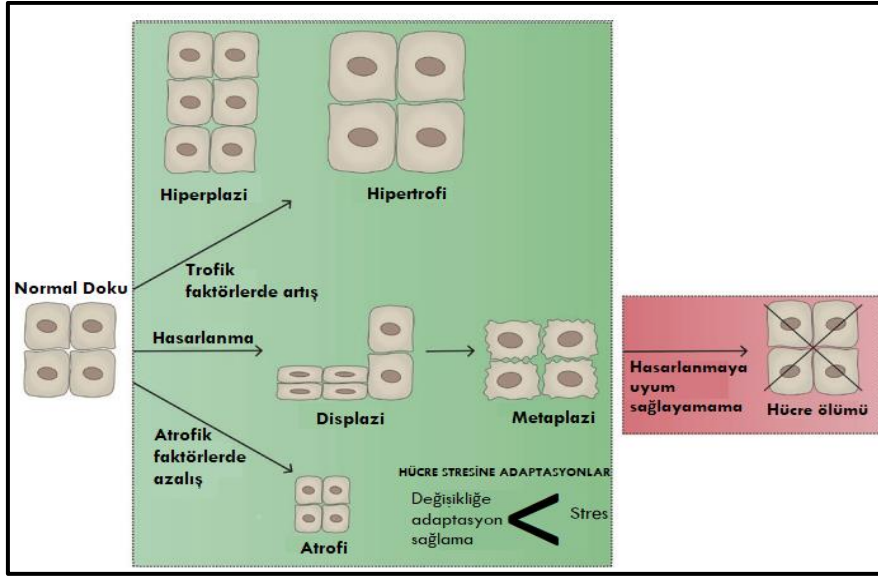
Cilt; vücut ve dış çevre arasında bir bariyer oluşturarak vücudu ekzojen kimyasal ve fiziksel faktörlere karşı koruyan, metabolik süreçlerde yer alan, patojenik mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattında rol alan, termoregülatör işlev gören ve immünolojik süreçlere katılan önemli bir yapılanmadır (Boer ve diğerleri, 2016). Hem içsel hem de dışsal faktörlere duyarlı olan cildin bütünlüğünde meydana gelecek değişimler uzuv kaybına, hatta ölüme neden olabilmektedir (Murphree, 2017). Farklı etkenler ile meydana gelen cilt hastalıkları, dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen ve küresel hastalık yükünün önde gelen nedenlerinden biridir (Lim ve diğerleri, 2017). Önemli cilt problemlerinden biri olan yaraların tedavisi için Medicare Sağlık Sigortası (Amerika Birleşik Devletleri) 28,1-96,8 milyar \$ sağlık harcamasını rapor etmiştir. Artan sağlık hizmetleri maliyetleri, yaşlanan popülasyon, biyofilmler gibi tedavisi zor enfeksiyon risklerinin tanımlanması ve dünya çapında devam eden diyabet ve obezite tehdidi gibi faktörler yara tedavileri için klinik, sosyal ve ekonomik zorluklara neden olmaktadır (Sen, 2019).

2.2. Yara İyileşmesi ve Onarım Mekanizmaları ile İlgili Genel Bilgiler

2.2.1. Genel bakış: Yara oluşumu ve yara tipleri

Yara; cilt, mukoza ya da doku organizasyonun bir veya bir kaçının bozulması olarak tanımlanabilir (Kujath ve Michelsen, 2008). Yaralanmaya sebep olan faktörlere örnek olarak; fiziksel ve kimyasal yanıklar, basınç, arteriyel ve/veya venöz vasküler zayıflama, immün yetmezlik, malignite, bağ dokusu bozuklukları, diyabet gibi metabolik hastalıklar, beslenme yetersizlikleri ve psikososyal bozukluklar verilebilir (Shankar ve diğerleri, 2014). Yaralar, spesifik yara tipleri ile birlikte genel olarak akut ve kronik olarak kategorize edilir (Whitney, 2005). Akut yaraların iyileşme süresi yaklaşık 3 ay iken kronik yaraların iyileşme süresi 3 aydan fazladır (Korting ve diğerleri, 2011).

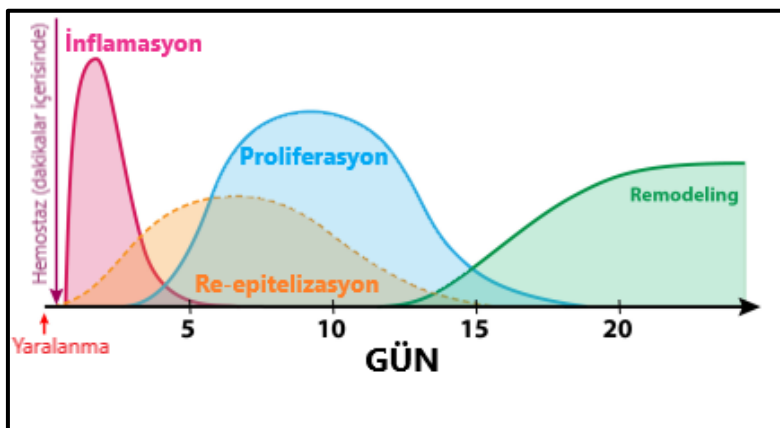
Yara iyileşme süreci, yaralanan dokunun onarımı için kan hücreleri, sitokinler ve büyüme faktörlerinin rol aldığı hücresel ve moleküler süreçlerin organizasyonunu gerektirir (Kim ve Nair, 2019; Yang ve diğerleri, 2020). Bu organizasyona adaptasyon sağlayamayan hücrelerin apoptoz veya nekroz yolları ile ölümü gerçekleşir (Ogawa, 2019) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Hücrelerin, hasarlanmalara ve farklı faktörlere karşı adaptasyonları (Ogawa, 2019: 4)

2.2.2. Yara iyileşmesinin fazları

Yara iyileşmesinin majör fazları; inflamasyon, proliferasyon (granülasyon doku formasyonu) ve remodeling fazları olup bu fazların birbiri ile entegre sürelerde gerçekleştiği bilinmektedir (Jun ve diğerleri, 2015; Yeh ve diğerleri, 2017; Sveen ve diğerleri, 2019). Yara iyileşmesinin zamana göre gerçekleşen fazları Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



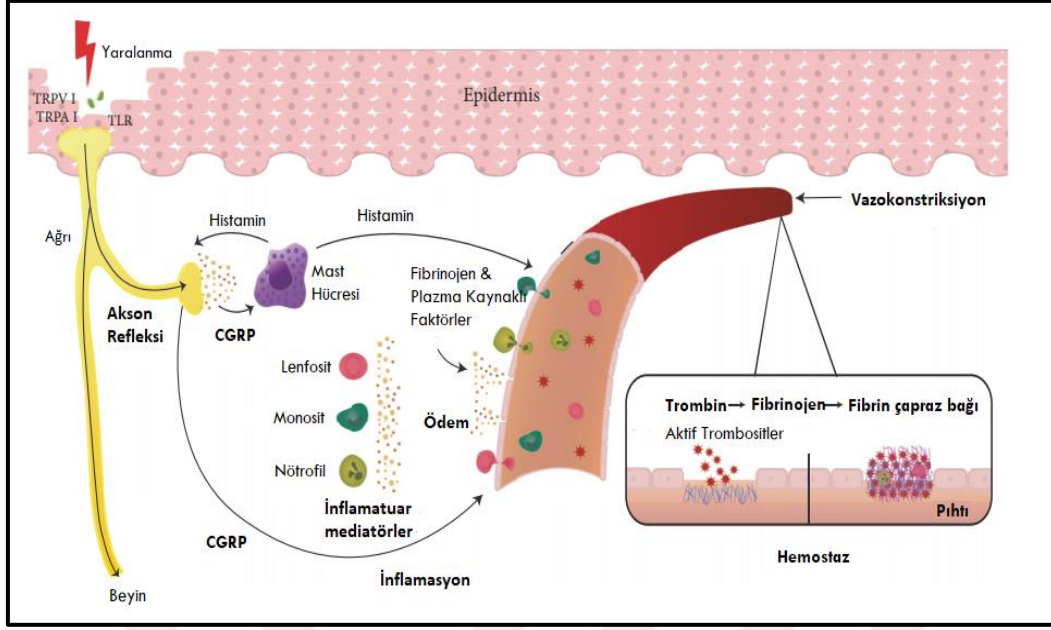
Şekil 2.3. Yara iyileşmesinin zamana göre gerçekleşen fazları (DesJardins-Park ve diğerleri, 2019)

2.2.3. Yara iyileşmesinin inflamasyon fazı

Yara iyileşmesinin inflamasyon fazı; vazokonstriksiyon (kan damarlarının büzülmesi) ve hemostaz ile başlayarak vazodilatasyon (kan damarlarının genişlemesi), kapiller permeabilitenin artışı, kemotaktik büyüme faktörlerinin salgılanması ve inflamasyonun tetiklenmesi ile karakterize edilebilir (Kujath ve Michelsen, 2008; Atkin ve diğerleri, 2019).

Yaralanma sonrası, geçici reseptör potansiyel kanalları (transient receptor potential channel, TRP) olan geçici reseptör potansiyel vanilloid 1 (TRPV1) ve geçici reseptör potansiyel ankirin 1 (TRPA1) aktif hale gelip yara iyileşmesinin nörojenik inflamasyonunu başlatarak inflamasyon sürecini tetikler (Gouin ve diğerleri, 2017). Nositif (ağrı verici) inflamasyonu başlatan TRP kanallarının aktivasyonu aksiyon potansiyelini oluşturarak kalsitonin geni ile ilişkili peptidin (calcitonin gene-related peptide, CGRP) salınımını indükler (Akopian, 2017; Patapoutian ve diğerleri, 2010). Bir nöropeptit olan CGRP, kan hücreleri ve inflamatuvar hücrelerin yara iyileşme sürecindeki aktivasyonunu düzenler. İndüklenen CGRP yaralanmadan hemen sonra mast hücreleri, histamin gibi mediyatörleri salgılayarak vasküler geçirgenliği sağlar (Wulff ve Wilgus, 2013; Aich ve diğerleri, 2015). Toll-benzeri reseptör (toll-like receptor, TLR) sinyali ise hızlı bir immün cevabı aktive eder. Sinir sistemi ve spesifik nöromediyatörler, TLR'lerin aktivasyonunda rol oynar (Granstein ve Luger, 2009: 89, 102). Yaralanma sonrası TRPV1 ve TRPA1 kanallarının aracılığıyla aktifleşen inflamasyon süreci Şekil 2.4'te şematize edilmiştir.

Yara iyileşmesinin inflamasyon fazında aktif rol alan inflamatuvar hücreler; nötrofiller, monositler, makrofajlar ve lenfositlerdir (Ellis ve diğerleri, 2018). Nötrofillerin yara iyileşmesindeki esas görevi, patojenlere açık olan yara bölgesini koruyarak enfeksiyonu önlemektir (Wilgus ve diğerleri, 2013). Monosit hücrelerinden türevlenen makrofajlar ise inflamatuvar fazda önemli etkilere sahiptir (Kloc ve diğerleri, 2019; Kim ve Nair, 2019; Koh ve Dipietro, 2020). Pro-inflamatuvar makrofajlar olarak bilinen M1 makrofajları, yara bölgesinde bulunan bakterilerin, yabancı partiküllerin ve ölü hücrelerin fagositoz ile temizlenmesi için yara bölgesine sızar. M2 makrofajları ise fibroblastların, keratinositlerin ve endotel hücrelerin migrasyonunu ve proliferasyonunu tetikler (Krzyszczek ve diğerleri, 2018). Bununla birlikte makrofajlar, yara onarımında rol alan efektör hücrelerini yara yatağına toplar (Ogawa, 2019: 4,9).



Şekil 2.4. Yaralanma sonrası TRPV1 ve TRPA1 kanallarının aracılığıyla indüklenen nosiseptif inflamasyon (Cañedo-Dorantes ve Cañedo-Ayala, 2019)

Yara iyileşmesinin inflamatuvar fazındaki diğer önemli hücre grubu, dendritik epidermal T hücreleridir (dendritic epidermal T cell, DETC). DETC olan gama delta ($\gamma\delta$) T hücreleri doku hasarına erken cevap vererek dokuyu enfeksiyona karşı korumaktır. $\gamma\delta$ T hücrelerinin bir diğer önemli özelliği ise keratinosit büyüme faktörünü (keratinocyte growth factor, KGF) indükleyerek keratinosit hücrelerinin proliferasyonunu tetiklemesidir (Havran ve Jameson, 2010).

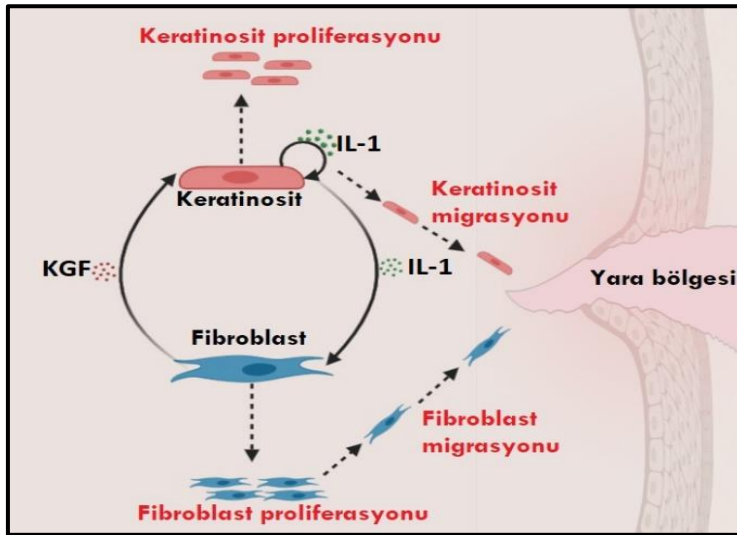
Fibroblastlar, yara iyileşmesinin inflamasyon fazında aktif rol oynayan diğer bir hücre grubudur (Mescher, 2017). M1 makrofajları; fibroblast pro-inflamatuvar sitokinlerinin ve kemokinlerinin, matriks metalloproteinazların (matrix metalloproteinase, MMP) ve inhibitörlerinin salınımını indükler. Ayrıca, M1 makrofajları ile aktifleşen fibroblastlar tarafından pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimi aşağı-regüle (down-regüle) edilir (Stunova ve Vistejnova, 2018).

2.2.4. Yara iyileşmesinin proliferasyon fazı (granülasyon doku formasyonu)

Yara iyileşmesinin proliferasyon fazı; keratinositler ile fibroblastların migrasyonu ve proliferasyonu, anjiyogenez, granülasyon doku formasyonu ve ECM'nin yeniden şekillenmesi ile karakterize edilir (Tang ve diğerleri, 2014; Das ve diğerleri, 2016; Keyes ve diğerleri, 2016; Yeh ve diğerleri, 2017).

Keratinositler ile fibroblastların proliferasyonu ve migrasyonu

Keratinositler ve fibroblastlar, proliferasyon ve migrasyon aşamaları ile birlikte çift parakrin sinyal döngüsü oluşturarak yara iyileşme sürecine katkıda bulunan önemli hücrelerdir. anahtar hücrelerdir (Werner ve diğerleri, 2007; Wojtowicz ve diğerleri, 2014). Proliferatif fazda keratinositler, büyüme faktörleri, integrinler ve MMP'lerin aktivasyonu ile yara bölgesine göç eder ve hiperproliferasyon ile yara bölgesini doldurur (Raja ve diğerleri, 2007). Cilt bariyerin bozulmasına yanıt olarak keratinositler, keratinosit migrasyonunu ve proliferasyonunu aktive eden, hem otokrin hem de parakrin sinyal molekülü olarak işlev gören interlökin-1'in (IL-1) salınımını indükler. IL-1 aynı zamanda çift parakrin sinyalizasyonunun bir örneğidir. Bunun sebebi, IL-1 ile indüklenen fibroblastların KGF'nin salınımını sağlaması ve salınan KGF'nin keratinosit proliferasyonunu ve migrasyonunu indüklemesidir (Wojtowicz ve diğerleri, 2014). Keratinositlerin çift parakrin indüksiyonu ile tetiklenen fibroblastlar da yara iyileşme sürecine proliferasyon ve migrasyon ile katkı sağlar (Werner ve diğerleri, 2007; Velnar ve Ailey, 2009). Keratinositlerin ve fibroblastların yara iyileşmesinin proliferasyon fazındaki çift parakrin sinyalizasyonu Şekil 2.5'te şematize edilmiştir.



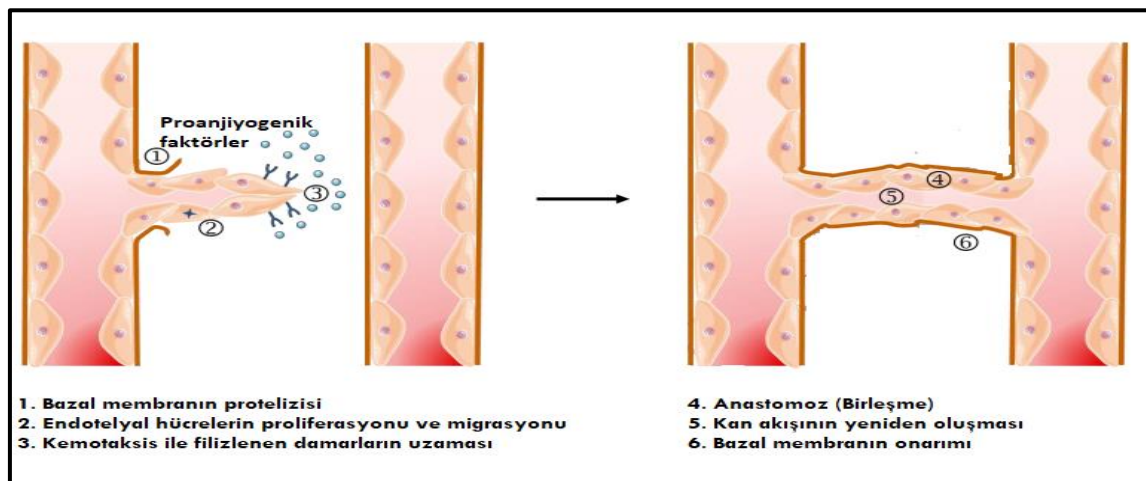
Şekil 2.5. Yaralanma sonrası keratinositlerin ve fibroblastların çift parakrin sinyalizasyonu

Yara anjiyogenezi

Anjiyogenezi, yara iyileşmesi için kritik öneme sahiptir. Hasarlanan dokuda oluşan kan damarları, yara dokusuna besin ve oksijen taşınmasını sağlar (Li, Zhang ve Kirsner, 2003).

Yaralanma sonrasında yoğun bir şekilde yeni kılcal damarların oluşumu ve hasarlanan kan damarlarının onarımını takiben yara bölgesinde yeni bir vasküler ağın oluşumu sağlanır (Honnegowda ve diğerleri, 2015). Yaralanma sonrası hasarlanan dokudaki yetersiz perfüzyon, kronik yaraların patofizyolojisinin altında yatan önemli problemlerden biridir (Demidova-Rice ve diğerleri, 2012; Shahin ve diğerleri, 2020).

Yara anjiyogenezi, belirli bir moleküler ve hücrel kaskad ile oluşur (Honnegowda ve diğerleri, 2015). Yara onarımındaki proliferasyon fazının önemli belirteçlerinden biri olan yara anjiyogenezinde; vasküler endotel büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor, VEGF), anjiyopietin, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (transforming growth factor beta, TGF- β) fonksiyonel rol oynar (Li ve diğerleri, 2003). Endotel hücrelerinde bulunan anjiyogenik büyüme faktörlerini bağlayan reseptörlerine büyüme faktörleri bağlanarak intrinsik (hücre içi) sinyal yolağı aktif hale gelir. Aktifleşen ve çoğalan endotel hücreleri, proteolitik enzimlerin salınımı ile ana damarların bazal membranını çözerek filizlenir. Bu aşamadan sonra endotel hücreler, hücre yüzey adezyon molekülleri olan integrinler aracılığıyla yara yatağına göç eder ve MMP'ler, çevre doku matriksini filizlenen damarların doğrultusuna göre yıkar. Vasküler filizler, tübüler kanalları oluşturduktan sonra yeni kan damarları stabil hale gelerek anjiyogenezi tamamlanır (Tonnesen ve diğerleri, 2000; Li ve diğerleri, 2003; Honnegowda ve diğerleri, 2015). Şekil 2.6'da bu aşamalar şematik olarak gösterilmiştir.



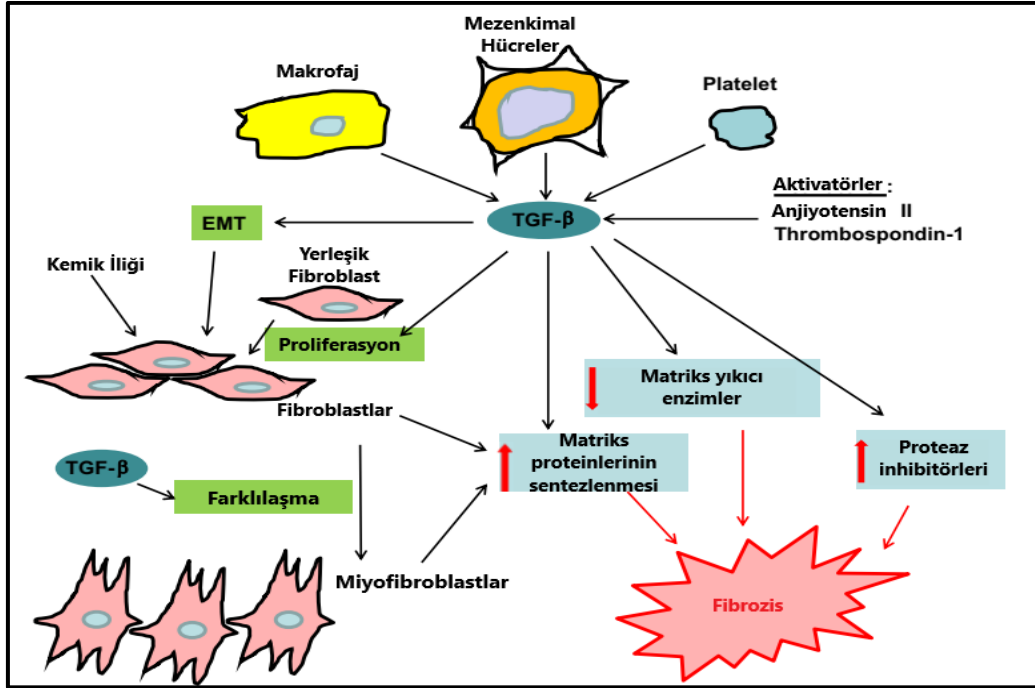
Şekil 2.6. Yara anjiyogenezinin şematik gösterimi (Guerra ve diğerleri, 2018)

Granülasyon doku formasyonu ve ECM'nin yeniden şekillenmesi

Yaralanmanın ardından 2-4 gün sonra oluşan granülasyon dokusu; kan pıhtısı, fibroblastlar ve fibroblastların progenitör hücreleri, yara bölgesinde bulunan fibroblastların oluşturduğu gevşek bağ dokusunun ECM'si, olgunlaşmamış kollajen (tip III), yeni oluşan kan damarları ve inflamatuvar hücreleri içerir (Häkkinen ve diğerleri, 2012).

EMT, migrasyon potansiyeli sağlayan bir süreç olup, keratinositlerin ve lokal deri epitel hücrelerinin epidermal bariyerini yeniden oluşturması amacıyla yara yatağına migrasyonunu sağlayarak kutanöz yara iyileşmesinin moleküler olaylar zincirine katkı sağlar (Haensel ve Dai, 2018). TGF- β 'nın etkisi aracılığıyla, yerleşik fibroblastların proliferasyonu, migrasyonu ve EMT süreci meydana gelirken, fibroblastlar yara bölgesindeki miyofibroblastlara farklılaşır ve daha fazla ECM üretimi gerçekleşir. ECM birikimi, TGF- β aracılığıyla MMP'lerin ve bunların inhibitörlerinin ekspresyonu üzerindeki inhibe edici ve uyarıcı etkileri ile düzenlenir (Şekil 2.7) (Jiang ve diğerleri, 2014).

MMP'ler, MMP ailesine ait bir disintegrin ve metalloproteazlar (a disintegrin and metalloproteinases, ADAMs), trombospondin motifli ADAM'ler (ADAMs with thrombospondin motifs, ADAMTs) ile TIMP'ler, ekstrasellüler matriks organizasyonunun en önemli elemanlarıdır (Arpino ve diğerleri, 2015). MMP ailesi, ECM'nin yıkımını sağlayan kalsiyum bağımlı çinko içeren bir enzim grubudur (Shiomi ve diğerleri, 2013; Caley ve diğerleri, 2015). MMP'lerin aktivitesi keratinositler, fibroblastlar, endotel ve inflamatuvar hücreler gibi farklı hücre tipleri ile kontrol edilir. Bu kontrol mekanizması MMP'lerin regülasyonundan sorumlu hücrelerin sitokinlere, büyüme faktörlerine, hormonlara, onkogenlere, etkileşimde olunan diğer hücrelere veya ECM'ye cevap olarak gen ekspresyonlarının modülasyonu ile sağlanır (Sabino ve Auf dem Keller, 2015). TIMP'ler ise MMP'lerin aktivitesini inhibe eden doku inhibitörleri olup ECM yapılanmasında fonksiyonel rollere sahiptir (Yussof ve diğerleri, 2012).

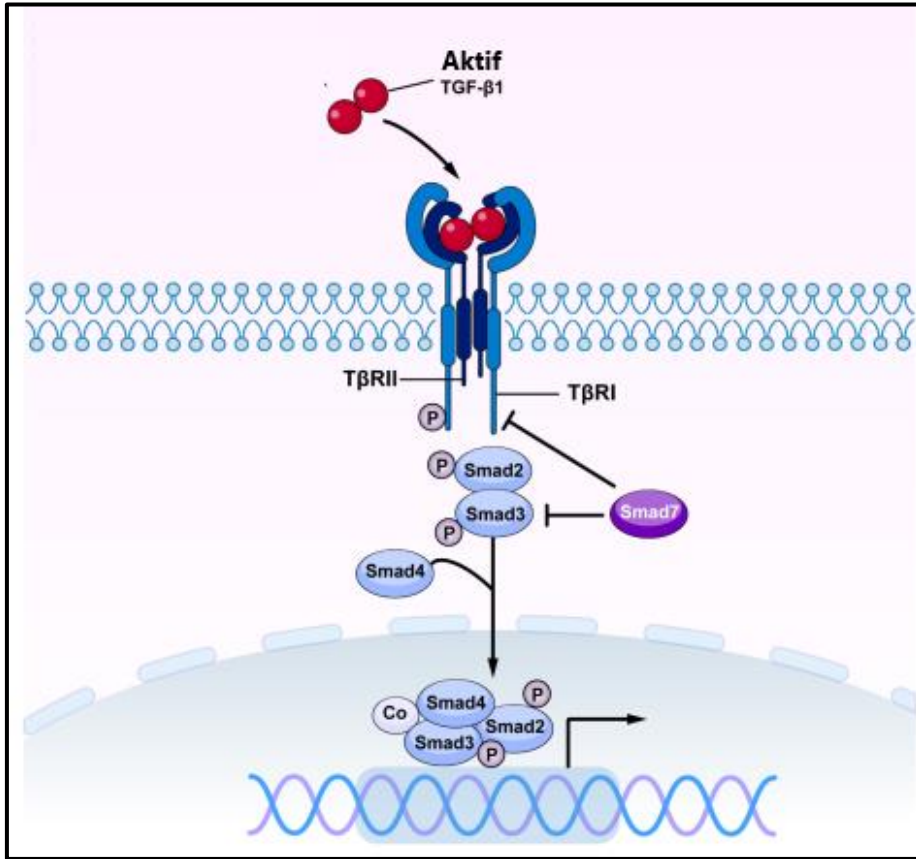


Şekil 2.7. TGF-β'nın, doku onarımı sırasında fibrotik cevapları tetikleme mekanizmaları (Jiang ve diğerleri, 2014)

TGF-β, yara iyileşmesinin kilit elemanlarından biri olup granülasyon doku oluşumunda ve ECM yapılanmasında aktif rol almaktadır (Shai ve Maibach, 2005: 7, 15; Verrecchia ve Mauviel, 2007). TGF-β; yara anjiyogenezini, fibroblastların proliferasyonunu, migrasyonunu, miyofibroblastlara farklılaşmasını ve ECM birikimini indükler (Shai ve Maibach, 2005: 7, 15). Bununla birlikte, kollajen, proteoglikan ve fibronektin genlerinin transkripsiyonunun uyarılması aracılığıyla matriks proteinlerinin üretimini artırır. Ek olarak, matriksin degradasyonundan sorumlu olan proteazların salınımını azaltır ve MMP'lerin doku inhibitörlerinin (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) sentezini indükler. Böylece ECM yıkımını önlemiş olur (Fitridge ve Thompson, 2011: 423, 449).

Ciltte bir yaralanmanın meydana gelmesinden hemen sonra birçok sinyal yolağı devreye girer ve yara iyileşme mekanizmaları tetiklenir. TGF-β1/Smad sinyal yolağı, yara iyileşmesinde rol oynayan bu mekanizmalardan biri olup, hasarlanan cilt dokusunun onarımı bu sinyal yolağı ile dermis düzeyinde başlatılır (Bielefeld ve diğerleri, 2013). Yaralanma sonrasında TGF-β1, transmembran TGF-β1 reseptörlerine bağlanarak Smad2 ve Smad3 proteinlerinin fosforilasyonuna ve dimerizasyona neden olur. Fosforile olan Smad2/3 dimeri (R-Smadlar) Smad4 (Co-Smad) ile birleşerek, heteromerik Smad2/3/4 kompleksini oluşturur ve bu kompleks, nuklear por kompleksinde bulunan nukleoporinler aracılığıyla

transkripsiyon faktörü olarak nukleusa transloke olur (Yamada ve diğerleri, 2013). TGF- β 1'in reseptörleri ile olan bu etkileşimi, yara iyileşmesinin aşağı-akış (down-stream) sinyallenmesini indükleyerek yara iyileşmesi esnasında fibroblast proliferasyonu, migrasyonu ve kollajen sentezi üzerinde fonksiyonel rol oynar. Smad7 ise bu sinyal yolağına ket vurur (Bielefeld ve diğerleri, 2013; Finnson ve diğerleri, 2013; Gilbert ve diğerleri, 2016). TGF- β 1/Smad sinyal yolağı Şekil 2.11'de şematize edilmiştir.

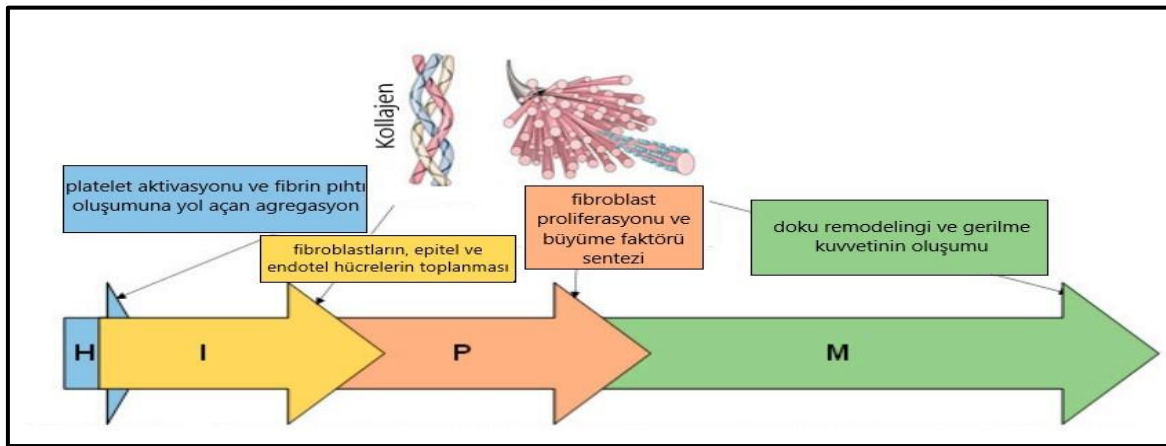


Şekil 2.8. TGF- β 1/Smad sinyal yolağı (Gu ve diğerleri, 2020)

2.2.5. Yara iyileşmesinin remodeling fazı

ECM, temel olarak üç biyomolekül sınıfından oluşur: glikozaminoglikanlar (GAG); proteoglikanlar; kollajen, elastin, fibronektin, vitronektin ve laminin gibi lifli proteinler (Kaoud, 2018: 65, 75). Yara iyileşme sürecinin erken inflamatuvar fazında oluşan fibrin pıhtının yerini proliferatif fazda tip III kollajen ve kan damarları bakımından zengin olan granülasyon doku alırken, yara iyileşmesinin son aşamasında granülasyon dokunun yerini tip I kollajen ve skar dokusu alır (Li ve diğerleri, 2007).

Üçlü heliks formunda bir protein olan kollajen, esas olarak fibroblastlardan üretilir (Schwarz, 2015). Bugüne kadar 28 farklı tanımlanan kollajen olması ile birlikte (León-López ve diğerleri, 2019), tip I kollajen deride en fazla bulunan kollajen tipidir (~% 70). Yara iyileşmesinin önemli bileşenlerinden olan kollajen; inflamatuvar cevabın kontrolü, hücresel mitogenez, farklılaşma ve migrasyonu etkileyen fonksiyonlarla müteakip; doku onarımı, ECM sentezi, inflamatuvar sitokinler ile büyüme faktörlerinin sentezi ve salınımı, remodeling enzimleri olan MMP'ler ve TIMP'ler ile interaksiyon kurma gibi kritik hücresel ve moleküler olaylar zincirine katılır (Şekil 2.8) (Rangaraj ve diğerleri, 2011). Tüm dokularda bulunan ve büyük bir glikoprotein olan fibronektin ise yara iyileşmesinde fonksiyonel rol oynayan diğer bir biyomoleküldür. Fibronektin, ECM'nin temel yapı taşlarından biri olup, spesifik fonksiyon domainleri ve bağlanma bölgeleri ile yara iyileşmesindeki farklı süreçlerde yer alır; farklı hücre tipleri, sitokinler ve ECM ile etkileşim halindedir (Lenselink, 2015; Sawicka ve diğerleri, 2015). Elastin, normal cildin sertliğini ve elastikiyetini oluşturmaya yardımcı olurken fibrin, vitronektin ve laminin yara iyileşmesinde hemostaz, homeostaz ve hücre migrasyonunda anahtar araçlardır (Iorio ve diğerleri, 2015; Tracy ve diğerleri, 2016).

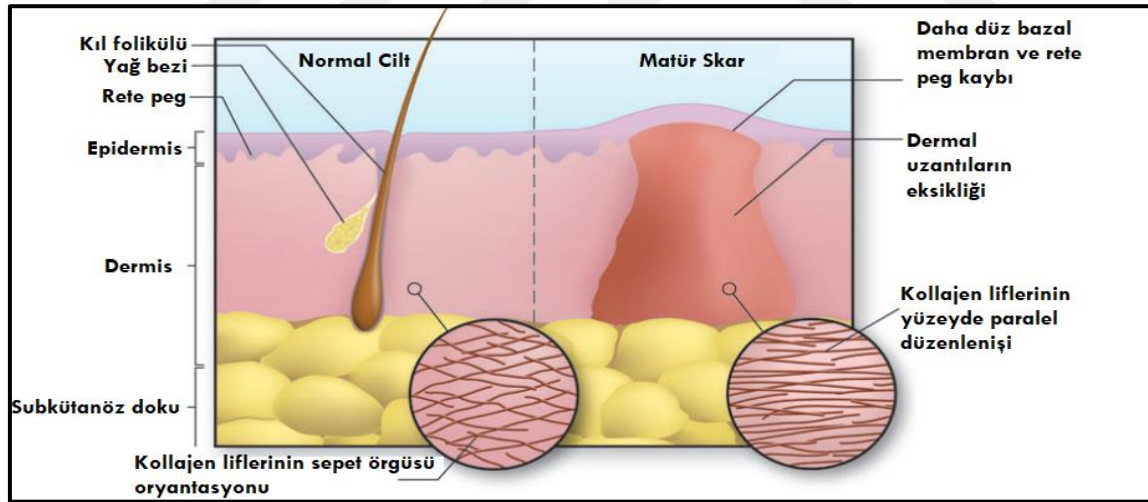


Şekil 2.9. Yara iyileşmesinin farklı fazlarında kollajenin fonksiyonel rolleri. H: Hemostaz, I: İnflamasyon fazı, P: Proliferasyon fazı, M: Olgunlaşma (remodeling) fazı (Mathew-Steiner ve diğerleri, 2021)

Yara iyileşmesinin son aşaması olan remodeling fazı, hasar oluşumundan 2-3 hafta sonra başlayıp bir yıl veya daha uzun sürede gerçekleşen fazdır (Gonzalez ve diğerleri, 2016). Fibroblast sayısının ve vasküler yoğunluğun azaldığı remodeling fazında epidermal keratinositlerin proliferasyon, migrasyon ve farklılaşma potansiyeli artar (Shai ve Maibach, 2005: 7, 15; Olczyk ve diğerleri, 2014). Kollajen tip III'ün yerini kollajen tip I'in alması ile

birlikte, kollajen liflerinin istenilen dizilime gelmesi sonucu skar doku oluşur (Shai ve Maibach, 2005: 7,15).

Olgunlaşmış fibroblastlar olarak bilenen miyofibroblastlar, kollajene bağlanarak skar yapısının küçülmesini sağlar (Reinke ve Sorg, 2012). Normal ciltte kollajen sepet örgüsü (basket-weave) oryantasyonu ile düzenlenirken skar dokusundaki kollajen, cilt yüzeyine paralel demetler halinde uzanır. Kutanöz skar, kıl folikülleri ve yağ bezleri gibi dermal uzantılar içermemekle birlikte bu yapılar kök hücre bakımından yoksundur. Ayrıca skar dokuda epidermisin bazal membranı normalden daha düzdür çünkü normal koşullarda dermise uzanan rete peg yapılarını skar yapısı içermez (Şekil 2.10). Cilt yüzeyinin üzerinde yükselen skar dokusu, hiperpigmente eğilimindedir ancak skar olgunlaştıkça bu fizyolojik durumlar zamanla düzelebilmektedir (Jampani ve diğerleri, 2014; Marshall ve diğerleri, 2018). Ancak, yara iyileşmesi sırasında yetersiz rejeneratif kapasite ve miyofibroblastların kontrolsüz farklılaşması sonucunda, ECM proteinlerinin birikmesinden kaynaklanan patolojik skar oluşumları gerçekleşmektedir (Li ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.10. Normal cilt ile skar oluşumu olan cildin karşılaştırması (Marshall ve diğerleri, 2018)

2.3. Yara İyileşmesinde Büyüme Faktörlerinin Rolü

Büyüme faktörleri yara iyileşmesinin inflamasyon, proliferasyon ve remodeling fazlarının tüm mekanizmalarında kritik rollere sahip olan, hücre büyümesi, farklılaşması, proliferasyonu, migrasyonu ve metabolizmasında rol oynayan biyoaktif polipeptitlerdir

(Behm ve diğerkleri, 2011; Gainza ve diğerkleri, 2015). Yara iyileşmesinden rol oynayan büyüme faktörlerinin görevleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Yara iyileşmesinde rol alan büyüme faktörleri ve yara iyileşmesindeki görevleri

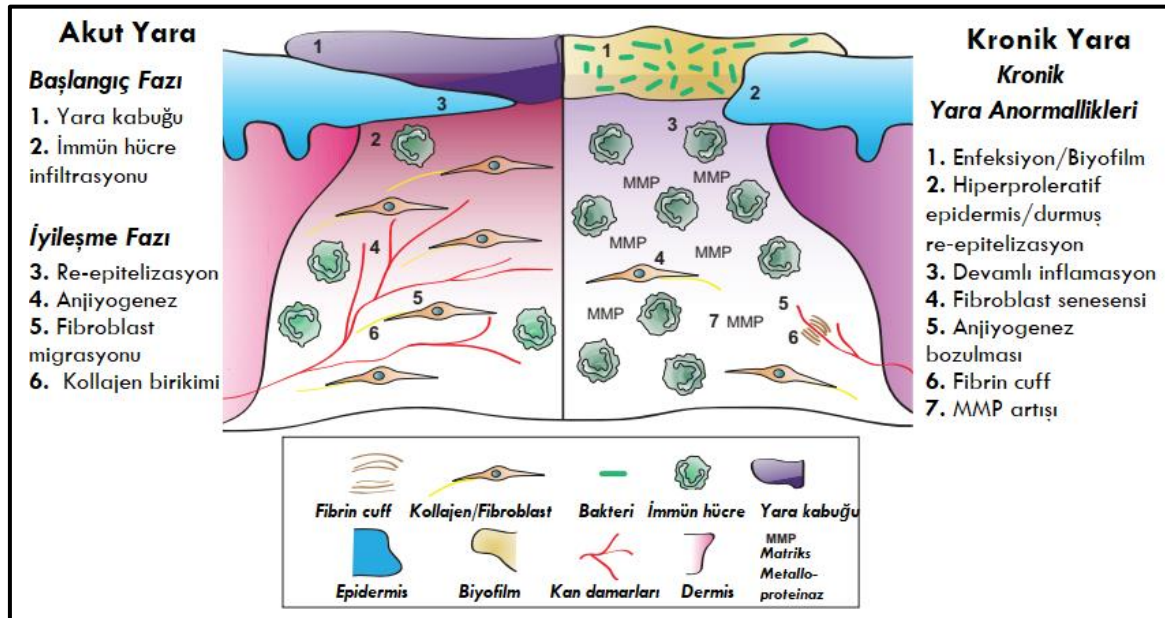
Büyüme faktörü	Yara iyileşmesindeki görevleri
Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)	Fibroblastları, nötrofilleri, monositleri ve düz kas hücrelerini yara bölgesine çekme (kemotaktik etki), makrofaj indüksiyonu, sitokin salınımı, ECM sentezi (Tengood ve diğerkleri, 2011; Shah ve diğerkleri, 2014; Park ve diğerkleri, 2017).
Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF)	Fibroblast proliferasyonunu ve anjiyogenezi indüklemeye, kollajenaz sentezinin uyarılmasını (Xu ve diğerkleri, 2016).
Asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF)	Fibroblast proliferasyonunun ve yara anjiyogenezinin tetiklenmesi, miyofibroblast farklılaşmasını inhibe ederek farklı skar türlerinin oluşumunu azaltma (Akita ve diğerkleri, 2013; Matsumoto ve diğerkleri, 2013).
Keratinosit büyüme faktörü (KGF)	Keratinositlerin migrasyonu, proliferasyonu ve sağkalımı (Chomiski ve diğerkleri, 2016).
Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)	Endotelial hücre migrasyonu, proliferasyonu, sağkalımı, kemotaktik ajanların üretimi, granülasyon doku formasyonu, anjiyogenez, mikrovasküler geçirgenlik (Honnegowda ve diğerkleri, 2015; Savari ve diğerkleri, 2019).
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	Keratinositlerin, fibroblastların ve vasküler endotel hücrelerinin proliferasyonu, granülasyon dokusu formasyonu, epitelizasyon, anjiyogenez, skar oluşumunun düzenlenmesi (M. Kuroyanagi ve Y. Kuroyanagi, 2017).
Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF-β)	Makrofaj ve fibroblast kemotaksisi, ECM bileşenlerinin sentezi ve anjiyogenez, hücre proliferasyonu, migrasyonu, inflamasyon ve re-epitelizasyon (Zi ve diğerkleri, 2014; Gilbert ve diğerkleri, 2016; Lichtman ve diğerkleri, 2016).

2.4. Kronik Yaralar

Yara iyileşme süreci normal olarak ilerlemediği takdirde bu durum kronik yaraların oluşumu ile sonuçlanır (Han ve Ceilley, 2017). Genellikle kronik yaraların iyileşmesi inflamatuvar fazda durur. Etiyolojisindeki moleküler seviyelerde olan farklılıklar ile birlikte kronik yaralar; aşırı miktardaki pro-inflamatuvar sitokinlerin, proteazların, reaktif oksijen türlerin (reactive oxygen species, ROS), enfeksiyonların ve fonksiyon kaybına uğramış kök hücrelerin mevcudiyeti ile karakterize edilir (Frykberg ve Banks, 2015). Kronik yara iyileşmesinin biyolojik sürecinin karmaşık olmasının yanı sıra diyabet gibi kronik metabolik hastalıklar, nörolojik defektler, vasküler yetmezlik, beslenme yetersizlikleri ve yaş gibi kriterler kronik yara oluşumunu etkileyen faktörlerdir (Leaper ve diğerkleri, 2015). Klinikte en çok rastlanılan kronik yara tipleri; venöz veya arteriyel sorunlardan kaynaklanan bacak

ülserleri, diyabetik ayak ülserleri ve yatak yaraları olarak da bilinen basınç ülserleridir (Atkin ve diğerleri, 2019).

Kronik yaraların patogeneziindeki kilit faktörlerden biri obligat bakteri kolonizasyonudur. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve β -hemolitik streptokoklar gibi yara patojenleri yara gecikmesine neden olur. Bu gecikmenin sebeplerinden biri, patojenlerin sebep olduğu inflamatuvar sitokinlerin, proteazların ve ROS'un yükselmesi ile lökositlerin yara bölgesine göçü sonucu oluşan sürekli inflamasyonun varlığıdır. Bir diğer sebep ise proteazların ve ROS'un, ECM ve büyüme faktörlerini etkilemesi ve hücre migrasyonunu engellemesidir (Zhao ve diğerleri, 2016). Bununla birlikte, MMP'lerin bazılarının aşırı ekspresyonu ve aktivasyonu, kronik yaraların geç iyileşme etkenlerinden biridir (Lazaro ve diğerleri, 2016). Ayrıca kronik yaralarda, hiperproliferatif olarak durmuş ve tamamlanmamış re-epitelizasyon ile zayıf fibroblast ve kan damarı infiltrasyonu içeren bir granülasyon doku oluşumu gerçekleşir. Ek olarak, yara içerisinde oksijen difüzyonunu önleyen ve yara bölgesinde hipoksiye neden olan fibrin cuff yapıları da bulunabilir (Nunan ve diğerleri, 2014). Kronik yaralardaki anormallikler ve akut yaralar ile arasındaki iyileşmeye bağlı hücresel ve moleküler farklılıklar Şekil 2.11'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.11. Akut ve kronik yara iyileşmesi arasındaki hücresel ve moleküler farklılıklar (Nunan ve diğerleri, 2014)

Cilt yaralarının iyileşmesinde meydana gelen aksamalarındaki en büyük etkenlerden birisi pro-inflamatuar sitokin olan tümör nekroz faktör alfanın (TNF- α) yara dokusundaki yüksek miktarlarıdır. Yüksek miktardaki TNF- α varlığı, özellikle diyabetik yaralardaki bozulmuş iyileşme mekanizmaları ile yakından ilişkili olup (Buck ve diğerleri, 1996), yara iyileşmesindeki gecikme TNF- α 'nın neden olduğu fibroblast apoptozunun tetiklenmesi ve fibroblast proliferasyonunun inhibe edilmesi ile karakterize edilir (Wang ve diğerleri, 2014). Ayrıca, yüksek TNF-a seviyeleri, tip I kollajen ve fibronektin gibi ECM proteinlerinin üretimini engeller. Bu durum ise ECM depozisyonunda azalmaya ve yara iyileşmesinin engellenmesine neden olur. Bununla birlikte, venöz bacak ülserleri gibi kronik yaralarda yüksek TNF- α varlığı ile artan nitrik oksit (NO) üretimi, peroksinitrit yoluyla yara iyileşmesinin gecikmesine ve granülasyon dokunun hasarlanmasına sebep olur (Al-Rikabi ve diğerleri, 2021). Nitrik oksit üretiminden sorumlu olan indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS); TNF-a, interlökin 1 (IL-1) ve interlökin 6 (IL-6) gibi pro-inflamatuar sitokinler tarafından sinerjistik olarak uyarılır ve aşırı miktarlarda üretilen iNOS yara iyileşmesinin olumsuz yönde etkilenmesine sebep olur (Luk ve diğerleri, 2005).

2.5. Yara İyileşmesinde Kullanılan Tedavi Stratejileri

Toplumda yaraların prevalansı, kronik yaralar için 1000'de 4,5 iken akut yaralar için 1000'de 10,5 olarak bildirilmiştir (Agarwal ve diğerleri, 2009). Amerika Birleşik Devletleri'nde, iyileşmeyen yaralardan muzdarip yılda ~ 3-6 milyon insan bulunmaktadır. Bununla birlikte, iyileşmeyen yaralar yılda 3 000 000 000 \$'dan fazla olduğu tahmin edilen yüksek sağlık harcamalarına neden olur (Menke ve diğerleri, 2007). Günümüzde, gelişmiş ülkelerde yaraların tedavisi hala en büyük sorunlardan biri olmaya devam etmektedir. Yaraların kimyasallar ile tedavisi pahalı olup yan etkileri yüksektir. Bu nedenle, kullanılan kimyasallardan kaynaklanan komplikasyonları azaltmak ve yara iyileşme sürecini hızlandırmak için, daha az yan etkisi olan ucuz ve etkili ilaçların keşfedilmesi, yara tedavileri için oldukça önemlidir (Baum ve Arpey, 2005).

2.5.1. Güncel tedavi yaklaşımları

Yara tedavileri için klinikte temel olarak sistemik antibiyotik tedavileri, çeşitli pansumanlar ve yara iyileşmesini desteklemek için yapılan operatif debridmanlar kullanılır. Bu rutin tedavi yöntemlerinin, uzun bir tedavi sürecine ve yüksek maliyetlere neden olması ile

birlikte, operatif debridmanların anestezi gerektirmesi ve sistemik antibiyotik kullanımının yüksek yan etkilere sebep olması nedeniyle, yara iyileşme patofizyolojisinin aşamalarını çoklu hedefleyen ve yan etkileri düşük yeni terapötik ajanların bulunmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir (Zhang ve diğerleri, 2020). Ayrıca bahsedilen bu rutin tedavi yöntemlerine ek olarak, kısmi kalınlıkta deri greftleri, donör keratinositlerinin kullanımı, kültüre edilmiş epitel otogreftleri, biyobran örtüleri, hiyalüronik asit (HA) ve kitosan gibi polisakkarit bazlı yara örtüleri de kullanılmaktadır (Dreifke ve diğerleri, 2015).

2.5.2. Yara iyileşmesinde biyomalzemelerin kullanımı

Yara iyileşmesinde kullanılan diğer bir terapötik strateji yöntemi biyomalzemelerin kullanımıdır. Farklı içerikli hidrojeller, elektrospin matlar ve farklı malzemelerden yapılmış yapı iskeleleri yara iyileşmesinde biyomalzeme kullanımının bazı örnekleridir. Ayrıca, kök hücreler, fibroblastlar ve keratinositler ile geliştirilen farklı hücre bazlı biyomalzemelerin kullanımı da söz konusudur (Selvakumar ve diğerleri, 2020).

Yara iyileşmesinde kullanılacak biyomalzemelerde aranan özellikler şu şekildedir: nemli bir ortam sağlayabilme ve nemliliği sürdürebilme, epidermal proliferasyonu ve migrasyonu artırma, lökosit göçünü artırma, anjiyogenezi ve bağ dokusu sentezini destekleme, yaralı dokusunda gaz alışverişine izin verme, uygun doku sıcaklığını sağlayabilme, antibakteriyel özellikte olma, debridman özelliği gösterebilme, yaradan kolay çıkarılabilme, biyo-uyumlu olma, toksik ve alerjen olmama (Dhivya ve diğerleri, 2015). Bu özelliklere ek olarak, yara bölgesindeki hücre hareketliliğinin desteklenebilmesi ve endotel hücreleri gibi zayıf adezyon yeteneğine sahip hücrelerin adezyonunun sağlanabilmesi açısından, yüzey pürüzlülüğünün olması kullanılan biyomalzemelerde aranan bir özelliktir (Mastrullo ve diğerleri, 2020; Niculescu ve Grumezescu, 2022). Ayrıca mikro-gözeneklilik, hücre invazyonu ve endotel filizlenmesi açısından biyomalzemelerde aranan diğer önemli bir parametredir (Wang ve diğerleri, 2021).

Yara iyileştirici biyomalzemelerde doğal ve sentetik polimerler kullanılabilir. Doğal polimerlere kollajen, kitin, kitosan, aljinik asit, sodyum aljinat, dekstran, glukon, jelatin, HA ve bakteriyel sellüloz; sentetik polimerlere ise poliüretan, metil metakrilat, poli(N-vinilpirolidon), polietilen glikol, poli(N-izopropilakrilamid) ve polikarpolakton örnek olarak verilebilir (Kamoun ve diğerleri, 2017; Murray ve diğerleri, 2019). Diğer yara tedavi stratejilerine kıyasla biyomalzemelerin kullanımı daha verimli olsa da bu uygulamaların en

büyük kısıtlaması yüksek maliyetli olmasıdır (Bahar, 2021). Ayrıca, yara örtüsü olarak kullanılan bazı sentetik malzemelerin dezavantajı yara örtüsünün çıkarılmasının gerekmesidir, bu da yara dokusuna daha fazla zarar verebilmektedir (Murray ve diğerleri, 2019).

2.6. Probiyotikler

Etimolojik olarak Yunancadan türetilen ve yaşam için anlamına gelen probiyotik, canlı konakçılar üzerinde faydalı etkileri bulunan organizmaları isimlendirmek için kullanılmaktadır (Kechagia ve diğerleri, 2013; Pandey ve diğerleri, 2015). Bağırsak mikrobiyotası, çeşitli bakteri türleri ve suşları bakımından oldukça zengin, farklı ekolojik nişlerden oluşan bir ekosistem olup insan sağlığı ve metabolizmasının modülasyonunda önemli rollere sahiptir (Aureli ve diğerleri, 2011; Hughes, 2020). Bağırsak mikrobiyotası ve konakçı arasında önemli bir simbiyoz ile homeostaz bulunur ve probiyotikler gıdadan enerjinin, minerallerin ve biyoaktif bileşiklerin eldesinde fonksiyonel rol oynar (Chistiakov ve diğerleri, 2015).

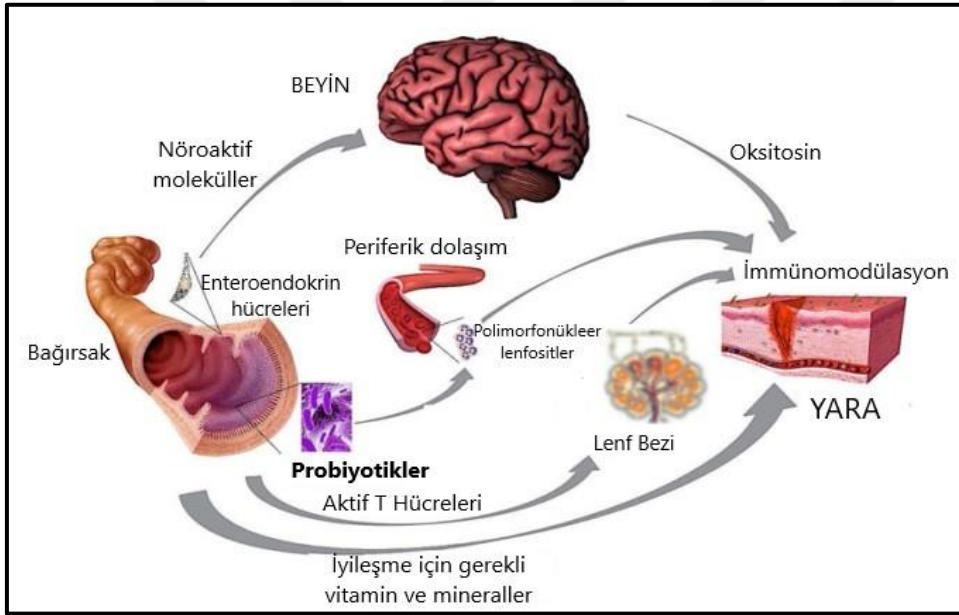
Probiyotikler; bakteriosin, enterosin, ekzopolisakkarit (EPS), laktik asit, bütirik asit, propiyonik asit, asetik asit, inülin, levan, lizin, arjinin, triptofan, tirozin, folat, tiamin (B1 vitamini), riboflavin (B2 vitamini), piridoksin (B6 vitamini), B9 vitamini, B12 vitamini, amilaz, β -galaktosidaz, süper oksit dismutaz ve katalaz gibi biyoaktif bileşenlerin üreticisidir (Indira ve diğerleri, 2019). Faydalı bileşenleri ve etkileri bakımından değerlendirildiğinde probiyotiklerin preklini ve klini çalışmalar ile pek çok farklı etkisi gösterilmiştir (Bertazzoni ve diğerleri, 2013; Jia ve diğerleri, 2018; Nazir ve diğerleri, 2018; Taherian ve diğerleri, 2019; Liu ve diğerleri, 2020). İnsan sağlığı üzerindeki bağışıklık güçlendirici etkileri bilinen probiyotiklerin; antioksidan, anti-kanser, nöroprotektif, antimikrobiyal, anti-diyabetik ve doku onarımı gibi farklı etkileri de ispatlanmıştır (Fijan, 2016; Lukic ve diğerleri, 2017; Plaza-Diaz ve diğerleri, 2017; Wang ve diğerleri, 2017; Mazhary ve diğerleri, 2019; Michael ve diğerleri, 2019; Vivarelli ve diğerleri, 2019; Wang ve diğerleri, 2020).

Araştırmalar, mikroflorası değişen ciltteki yara bölgesinin, probiyotiklerin topikal uygulanması ile enfeksiyonun önlenerek ve inflamasyonun regüle edilerek yara iyileşmesinin teşvik edebileceğini göstermektedir (Knackstedt ve diğerleri, 2020). Bununla

birlikte, probiyotiklerin antimikrobiyal (Sinha ve diğerleri, 2019; Dubey ve diğerleri, 2021) ve anti-inflamatuar (Khan ve diğerleri, 2019) etkileri ile yara iyileşmesinde kullanılabilecek biyoterapötikler olabilecekleri literatürde gösterilmiştir.

2.6.1. Probiyotiklerin cilt onarımı ve yara iyileşmesinde kullanılma potansiyeli

Bağırsak-beyin-deri eksenini kavramı probiyotiklerin, cilt inflamasyonu ve homeostazı gibi faktörleri etkileyerek mikrobiyom modülasyonunu düzenleyen, cilt üzerinde oldukça önemli fonksiyonlara sahip etkilerini ortaya koymaktadır (Lew ve Liong, 2013; Lukic ve diğerleri, 2017). Bağırsak-beyin-cilt eksenini aracılığıyla yara iyileşmesini etkileyen bağırsak mikrobiyota hipotezi Şekil 2.13'te şematize edilmiştir.



Şekil 2.12. Bağırsak-beyin-cilt eksenini aracılığıyla yara iyileşmesini etkileyen bağırsak mikrobiyota hipotezi (Lukic ve diğerleri, 2017)

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda probiyotiklerin; kozmetik alanlarda kullanımı, cilt lekeleri giderici etkileri, cilt yenilenmesi ve yara iyileşmesi üzerine etkileri dikkat çekmektedir (Al-Ghazzewi ve Tester, 2014). 31-62 yaş grubundaki Japon kadınları üzerinde yapılan bir çalışmada, ısı ile öldürülmüş *Lactococcus lactis* H16 suşunun oral tüketimi ile cilt üzerine etkileri araştırılmıştır. 8 hafta boyunca, ısı ile öldürülmüş *L. lactis* H16 oral alımının plasebo grubu ile karşılaştırıldığında, çevre koşulları da değerlendirmeye katıldığında (mevsimsel değişiklikler gibi), cilt elastikiyetini arttırdığı tespit edilmiştir (Kimoto-Nira ve diğerleri, 2012). *Lactobacillus plantarum* HY7714 ile yapılan başka bir çalışmada, 41-59 yaş

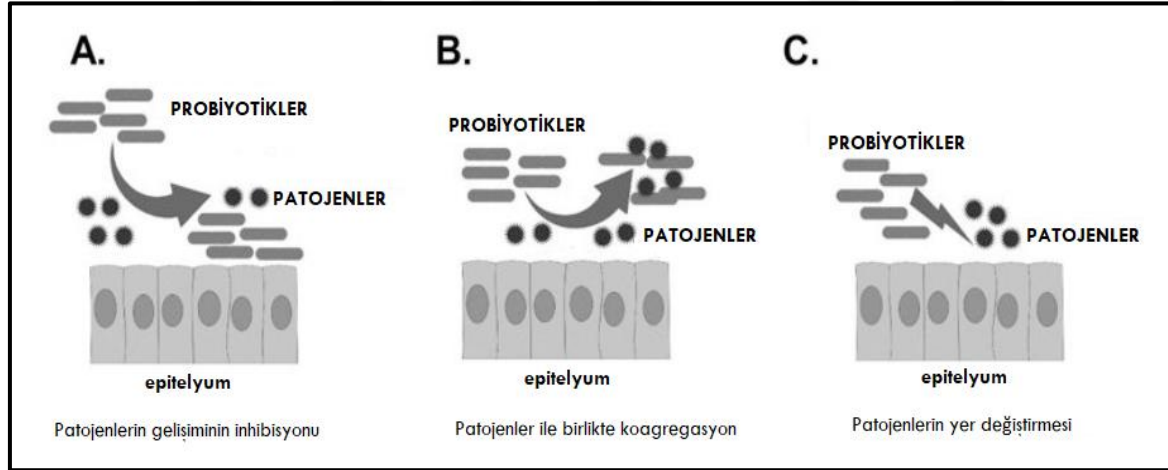
grubundaki gönüllülerin 12 hafta boyunca probiyotik alımı sağlanarak cilt hidrasyonu, kırıxıklığı, parlaklığı ve elastikiyeti değerdendirilmiştir. Araştırma sonucu elde edilen bulgular, *L. plantarum* HY7714 kullanımının cilt hidrasyonunu, parlaklığını ve elastikiyetini destekleyerek bu probiyotiğın yaşlanma karşıtı olarak kullanılabilecek bir nutrizozmetik ajan olabileceğini doğırlamıştır (Lee ve diğerdeleri, 2015). Doku onarımı ve yara iyileştirici etkileri bakımından probiyotikler, probiyotiklerin filtratları ve metabolitleri ile ilgili çalışmaları, probiyotiklerin önem kazanmasıyla birlikte farklı çalışmalara ışık tutmuştur (Peral ve diğerdeleri, 2009; Huseini ve diğerdeleri, 2011; Ramos ve diğerdeleri, 2012; Poutahidis ve diğerdeleri, 2013; Ong ve diğerdeleri, 2019). Geçmişten günümüze, probiyotiklerin ve farklı probiyotik ürünlerinin cilt sağlığı üzerindeki etkilerini gösteren bazı çalışmaları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Cilt sağlığı üzerinde faydalı olduğı bilinen en yaygın probiyotikler (Bekiaridou ve diğerdeleri, 2021).

Kullanılan probiyotik veya probiyotik ürünü	Uygulama şekli	Çalışmanın türü	Hedef	Bulgular
<i>Streptococcus thermophilus</i> ekstraktı	Krem	İnsan	Ön kol derisi	Stratum corneumda artan seramid seviyesi
<i>S. thermophilus</i> ekstraktı	Krem ile karıştırılmış sonike bakteri	<i>In vitro</i>	İnsan keratinosit hücre hattı	Seramid seviyesinde artış
<i>S. thermophilus</i> ekstraktı	Krem	İnsan	Ön kol derisi	Seramid seviyesinde artış, yüksek cilt hidrasyonu, lipid bariyerinde iyileşme
Kefir	Vaselin ile karışım	Hayvan	Yara	Yara iyileşmesini destekleme
Kefir	Jel	Hayvan	Yara	Yara iyileşmesini destekleme, granülasyonu ve neovaskülarizasyonu artırma
<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Öserinli merhem	Hayvan	Yara	Anti-inflamatuar etki, yara iyileşmesinde hızlanma
<i>L. brevis</i>	Öserinli merhem	Hayvan	Yara	Miyofibroblast artışı, anti-inflamatuar etki, yara iyileşmesinde hızlanma
<i>L. plantarum</i>	Öserinli <i>L. plantarum</i> kültürü	Hayvan	Yara	Anti-inflamatuar etki, re-epitelizasyon ve re-vakülarizasyon
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Mikroboncuklu sodyum nitrat içeren biyomalzeme	Hayvan	Enfekte yara	Yara kapanmasını destekleme

Probiyotik bakterilerin antimikrobiyal etkileri daha önce yapılan çalışmalarda ispatlanmış olup yara iyileşmesi üzerindeki antimikrobiyal etkileri de gösterilmiştir (Al-Mathkhury ve Al-Aubeidi, 2008; Tejero-Sariñena ve diğerdeleri, 2012; Fijan, 2016; Denkova ve diğerdeleri,

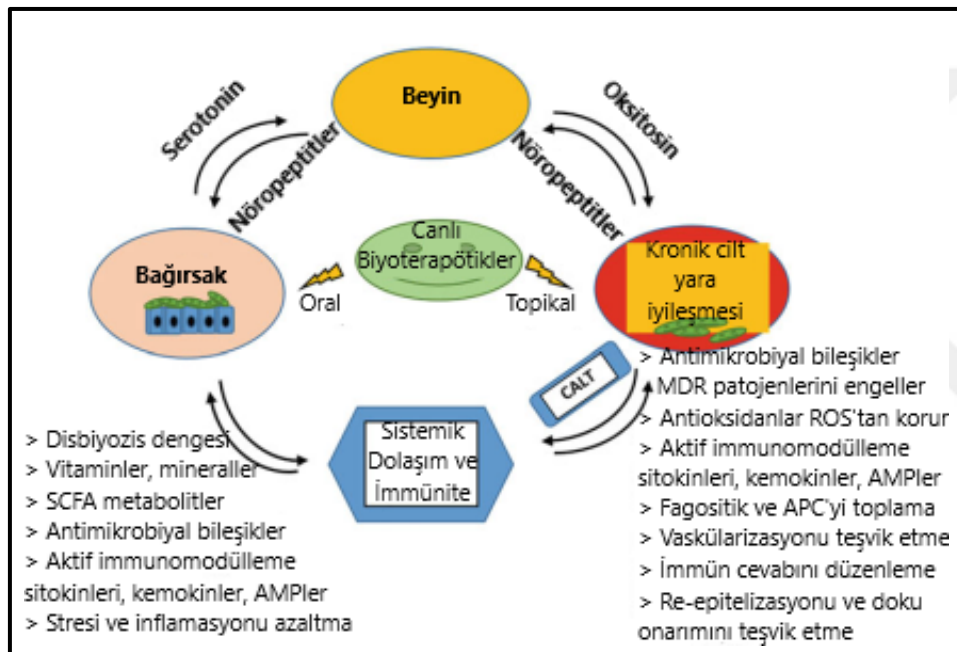
2017; Lukic ve diğerleri, 2017; Chen ve diğerleri, 2019; Monteiro ve diğerleri, 2019; Nagarajan ve diğerleri, 2019; Prabhurajeshwar ve Chandrakanth, 2019; Savitskaya ve diğerleri, 2019). Transkriptomik, metabolomik, proteomik ve metagenomik analizleri, probiyotiklerin konakçı için faydalı olduğunu, konakçı mukozal ve sistemik bağışıklık yanıtlarını değiştirebildiklerini ve konakçıyı patojenlere karşı koruyabildiklerini ortaya koymuştur. Probiyotik preparatlarda en çok kullanılan mikrobiyal cinslerden *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*, patojenlerin büyüme inhibisyonu, adezyonu ve koagregasyonu aracılığıyla biyofilmlerin mikrobiyal ekolojisini düzenler. Bununla birlikte probiyotikler, patojenlerin büyümesini önleyen ve/veya patojen quorum sensing sistemine müdahale eden biyoaktif moleküller salgılayarak ciltte ve mukozal yüzeylerde antimikrobiyal etki yaratır. Aynı zamanda patojenler ile birlikte koagregasyon oluşturarak agregat komplekslerinin patojenin mukozal yüzeylerden uzaklaştırılmasına yardımcı olur. Epitel hücre reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanmaları sonucu probiyotikler, patojenler ile ciltte ve mukozal yüzeylerde yer değiştirerek antimikrobiyal etki oluşturur (Şekil 2.14) (Lukic ve diğerleri, 2017).



Şekil 2.13. Probiyotiklerin cilt ve mukozal yüzeylerde patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal etkileri (Lukic ve diğerleri, 2017)

Probiyotik mikroorganizmaların hastalıkların önlenmesinde farmakolojik olarak kullanımını tanımlayan ifade olarak canlı biyoterapötikler (live biotherapeutics, LBPs) kavramı, 2012 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından resmi olarak yeni bir tıbbi ürün kategorisinde bildirilmiş olup, probiyotiklerin terapötik olarak canlı uygulanmaları dikkat çekici olmuştur (Cordaillat-Simmons ve diğerleri, 2020). Kronik yaraların tedavisi için probiyotikler, LBP olarak ağızdan (besin takviyesi olarak) veya yara bölgesine topikal olarak

uygulanabilir. LBP olan probiyotiklerin aracılığıyla, stres giderici nöropeptitlerin beyinde salınımı ile kronik yara bölgeleri de dahil olmak üzere sistemik inflamatuvar yanıtı modüle edebilir ve iyileşme süreçleri indüklenebilir. Probiyotiklerin oral kullanımı, inflamatuvar yanıtları sistemik olarak aşağı regüle (down-regüle) edebilir ve hızlı kollajen birikiminin yanı sıra cilt allostazını teşvik ederek yara iyileşme sürecini hızlandırabilir. Spesifik probiyotiklerin topikal uygulaması ise yara mikrobiyomunun değişmesini, gelişmiş re-epitelizasyonu ve immün yanıt modülasyonunu tetikler (Kumar ve Kothari, 2021: 301, 330). LBP'lerin kronik yara iyileşmesindeki rolleri Şekil 2.15'te verilmiştir.



Şekil 2.14. Kronik yara iyileşmesinde canlı biyo-terapötiklerin rolü. AMP: antimikrobiyal peptit, APC: antijen sunan hücreler, CALT: kutanöz ilişkili lenfoid dokular, MDR: çoklu ilaç direnci, SCFA: kısa zincirli yağ asidi (Kumar ve Kothari, 2021: 303-330)

Yara enfeksiyonlarında dominant patojen bakteri türü *S. aureus*'tur (Bessa ve diğerleri, 2013; Mohammed ve diğerleri, 2017). *L. plantarum* USM8613 suşunun, fırsatçı patojen *S. aureus*'un inhibisyonu ve yara bölgelerinde β -defensinin indüklenmiş ekspresyonu vasıtasıyla doğuştan gelen bağışıklığın artırılması sonucu yara iyileşmesini desteklediği gösterilmiştir. Ayrıca, bu suşun protein bakımından zengin süpernatant fraksiyonu ile yapılan çalışmada, yara iyileşmesinin inflamasyon fazından başlayarak re-epitelizasyona kadar geçen süreçte yara iyileşmesine katkı sağlayarak onarımı hızlandırdığı tespit

edilmiştir. Aynı çalışmada, süpernatant fraksiyonunun, *S. aureus*'un direncini otoliz yolakları aracılığıyla azalttığı saptanmıştır (Ong ve diğerleri, 2019).

Lactobacillus reuteri ile yapılan bir yanık yarası çalışmasında, yaradan izole edilen bakteriler üzerinde *L.reuteri*'nin antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmada, invazif yanık yarası enfeksiyonuna baskın olarak neden olan patojenin *P. aeruginosa* olduğu tespit edilmiş olup, *L. reuteri* filtratının *P. aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Hadid ve Al-Mukhtar, 2016). Yapılan başka bir araştırmada *L. reuteri*'nin, *S. aureus* enfeksiyonunun neden olduğu keratinosit ölümünden hücreleri koruduğu ortaya konmuştur (Prince ve diğerleri, 2012). Yanık yarasından izole edilen *P. aeruginosa* enfeksiyonuna karşı, probiyotik ve antibiyotik kombinasyonları, tek başına antibiyotik tedavisine kıyasla yara enfeksiyonlarını daha hızlı inhibe etmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar, *Lactobacillus plantarum* 299v suşunun yara patojeni olan *P. aeruginosa* üzerindeki baskılayıcı etkisinin siprofloksasinden daha yüksek olduğunu göstermektedir (Moghadam ve diğerleri, 2018). Ek olarak, *Lactobacillus acidophilus*'un liyofilize filtrat uygulamasının, *Pseudomonas* ve *Enterobacter* enfeksiyonlarını antibiyotiklere kıyasla önemli derecede azalttığı tespit edilmiştir (González ve Quiñones-Gutiérrez, 2018).

N-formil peptit reseptörleri (FPR'ler), memeli hücre yüzeyinde bulunan reseptörler olup bakteriyel peptitlere ve küçük moleküllere bağlanarak mukozal yara iyileşmesinde rol alan kilit elemanlarından biridir. FPR1, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADHP) oksidaz 1 (NOX1) yolağı aracılığıyla ROS üreterek fokal adezyon kinaz (FAK) ile ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz/mitojen tarafından aktive edilen kinaz (ERK/MAPK) yolağının hızlıca fosforilasyonunu sağlar (Alam ve diğerleri, 2014). FAK ve ERK/MAPK yolakları ise doku onarımında önemli rollere sahiptir (Ghilardi ve diğerleri, 2020). Yapılan çalışmalar, *Lactobacillus rhamnosus* GG suşunun (LGG) 2 gün içerisinde yara yatağının hızlıca re-epitelizasyonunu sağlayarak, mukozal yaralanmadaki etkinliğini FPR1 ve NOX1 sinyalizasyonları aracılığıyla gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur (Alam ve diğerleri, 2014). LGG lizatı ile yapılan diğer çalışmalar, keratinosit proliferasyonunun ve migrasyonunun lizat uygulaması ile indüklenerek yara iyileşmesinin re-epitelizasyonunu arttırdığını göstermiştir (Mohammedsaeed ve diğerleri, 2015).

Diyabetik ayak sendromu, diyabetik periferik nöropati ve periferik arter hastalığı ile indüklenerek ayak ülseri oluşumu ile sonuçlanan, çeşitli patolojileri içeren bir sendromdur.

Diyabetik ayak ülserlerinin meydana gelmesi sonucunda ileri safhalarda yara enfeksiyonu ve osteomiyelit kaçınılmaz olup, bu durumlar ampütasyona neden olur (Amin ve Doupis, 2016). 12 hafta boyunca *L. acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *L. fermentum* ve *Bifidobacterium bifidum* içeren kapsül kullanımı ile tedavi edilen diyabetik ülser hastalarının ülser uzunluğunda, genişliğinde ve derinliğinde plasebo grubuna göre önemli derecede azalma gözlemlenmiştir (Mohseni ve diğerleri, 2018).

In vitro çalışmalar, *L. plantarum* TWK10 ile fermente edilmiş soya sütünden yapılan etanol ekstraktının diyabetik yara iyileşmesini desteklediğini göstermiştir (Chuang ve diğerleri, 2019). Uygun miktarlarda NO yara bölgesinde onarım için pek çok faydalı rollere sahip olsa da (Witte ve Barbul, 2002) patolojik ağrı verici inflamasyonda yüksek oranda sentezlenmesi bir stres faktörüdür (Muniandy ve diğerleri, 2018). *L. plantarum* ile fermente edilmiş soya sütünün etanol ekstaktı, inflamasyon tetikleyici ajan olan lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenmiş fare makrofaj hücrelerine uygulandığında, hücrelerin sentezlediği NO miktarının artan ekstrakt konsantrasyonu ile giderek azalıp uygun seviyeye gelmesini sağlar. Bununla birlikte *L. plantarum* ile fermente edilmiş soya sütü etanol ekstraktının muamelesi, hem düşük hem de yüksek glukoz miktarı içeren besiyerindeki insan fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu arttırmaktadır. *In vivo* çalışmalar ise etanol ekstraktının streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde yara bölgesini önemli derecede kapattığını göstermektedir (Chuang ve diğerleri, 2019). Ek olarak diyabetin sitokin markırlarından olan IL-6 ve TNF- α protein ekspresyon seviyeleri (Mirza ve diğerleri, 2012), etanol ekstraktının uygulanması ile azalmıştır. Kronik yaraların diğer bir markırı olan matris metalloproteinaz 9 (MMP-9) (Jindatanmanusan ve diğerleri, 2018) protein seviyesi, etanol ekstratı muamelesi sonucu sıçan yaralarında azalmıştır (Chuang ve diğerleri, 2019).

Yara iyileşmesinin en belirgin özelliklerinden biri vasküler ağın yeniden oluşması olup, iyileşmeyen veya geç iyileşen yaraların patogenezinde vaskülarizasyonun gecikmesi ya da oluşmaması önemli bir faktördür (Veith ve diğerleri, 2019). *L. acidophilus* suşları ile yapılan bir çalışmada, laktik asit bakterilerinin süpernatantının kemirgen kulaklarına subkütanöz enjeksiyonu sonucu kan damarlarının çoğaldığı tespit edilmiştir (Halper ve diğerleri, 2003).

Fosfoinositid-3-kinaz/Protein kinaz B (PI3K/Akt) sinyal yolağı hücre sağkalımını, hücre büyümesini ve apoptozun inhibe edilmesini düzenleyen bir sinyal yolağı olup, beta-katenin (β -katenin) yara onarımında; hücre hareketliliğini, adezyonunu, TGF- β 1 salınımını ve MMP

ekspresyonunun aktivasyonunu indükler. *L. reuteri* ekstraktları ile yapılan bir çalışmada, 50 µg/mL ekstrakt uygulamasının PI3K/Akt/β-katenin/TGF-β1 sinyalini indükleyerek *in vitro* ve *in vivo* yara iyileşmesini desteklediği tespit edilmiştir (Han ve diğerleri, 2019).

2.6.2. Spesifik probiyotik biyoaktif moleküllerinin yara iyileşmesindeki rolü

Probiyotikler; bakteriosin, enterosin, ekzopolisakkarit (EPS), farklı organik asitler, amino asitler, vitaminler ve enzimler gibi biyomoküllerin sentezini gerçekleştiren, metabolit üretimi açısından yüksek kapasiteli mikroorganizmalardır (Indira ve diğerleri, 2019). Probiyotiklerin ürettikleri metabolitler ve hücre duvarı fragmentleri, cilt bariyeri üzerinde farklı olumlu etkilere sahiptir (Lew ve Liong, 2013).

Plantarin A, *L. plantarum* tarafından sentezlenen bir katyonik peptit formu olup antimikrobiyal membran geçirgenleştirme aktivitesine sahiptir (Diep ve diğerleri, 1994; Kristiansen ve diğerleri, 2005). Bu katyonik peptit, rakip mikroorganizmalar üzerinde quorum sensing mekanizmasıyla mikrobiyal antagonizma etkisi yaratır (Cagno ve diğerleri, 2010). Yapılan *in vitro* çalışmalarda, *L. plantarum*'dan elde edilen Plantarin A'nın 0,01-10 µg/mL uygulamasının 48 ve 72. saatlerde insan keratinositlerinde proliferasyonu önemli derecede artırdığı ve HA'ya göre insan keratinositlerinde migrasyonu daha fazla tetiklediği tespit edilmiştir. İnsan keratinositlerinin Plantarin A muamelesi sonucu, TGF-β1, VEGF ve FGF-7 transkripsiyon seviyelerinin arttığı saptanmıştır (Pinto ve diğerleri, 2011).

Histamin, bağışıklığın reaktivitesinde rol oynayan önemli bir immünomodülatördür (O'Mahony ve diğerleri, 2011). Hücre membranındaki transmembran G proteini kenetli reseptörlerine (G-protein-coupled receptor) bağlanarak intrasellüler sinyalleri aktif hale getiren histamin, immünomodülasyonun yanı sıra hemapoez, nörotransmisyon, bağırsak iskemisi ve yara iyileşmesinde fonksiyonel rol oynar (Kovacova-Hanusova ve diğerleri, 2015). *L. reuteri*'nin ürettiği histamin, protein kinaz A/ERK yolağı aracılığıyla kronik yaralarda yüksek seviyelerde bulunan pro-inflamatuar sitokin olan TNF'nin baskılanmasını sağlar (Gohel ve diğerleri, 2008; Thomas ve diğerleri, 2012).

Asetik asit, tıpta binlerce yıldır kullanılan ve sirke içerisinde % 3-5 konsantrasyonunda bulunan bir asittir. Antiseptik uygulamalar, yara enfeksiyonlarının giderilmesinde önemli bir role sahiptir (Atiyeh ve diğerleri, 2009). Hipokrat, yaraların tedavisinde kullanılmak üzere

asetik asiti önermiştir (Bjarnsholt ve diğerleri, 2015). Akut ve kronik yaralarda *P. aeruginosa* enfeksiyonunu (Turner ve diğerleri, 2014) asetik asit önemli derecede azaltmaktadır. Bununla birlikte asetik asit, antibiyotik direnci olan *P. aeruginosa* suşlarının tedavisinde topikal bir ajan olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Nagoba ve diğerleri, 2013). Asetik asit ayrıca yara enfeksiyonlarında oluşan biyofilmleri ortadan kaldırarak yara iyileşme sürecini desteklemektedir (Bjarnsholt ve diğerleri, 2015). Bu bilgiler doğrultusunda asetik asit üreticisi olan laktik asit bakterilerinin yara tedavisinde potansiyel bir baktériyoterapi ajanı olabilecekleri söylenebilir (Ramos ve diğerleri, 2015).

Tıpkı asetik asit gibi hidrojen peroksit de iyi bir antiseptiktir (Linley ve diğerleri, 2012). Hidrojen peroksit; membran potansiyelinin değişimi, yeni moleküllerin üretimi, farklı intrinsik sinyallerin aktivasyonu ve inaktivasyonunu sağlayan intrasellüler redoks dengesinin önemli bir bileşimidir. Hidrojen peroksitin topikal antiseptik özelliği, uygulanan bölgeye oksidasyon inflak etmesi ve lokal oksijen üretimi ile karakterize edilir. Yüksek konsantrasyonlarda hidrojen peroksit uygulanması doku bütünlüğünü bozsa da uygun konsantrasyonlardaki kullanımı yara iyileşme sürecine katkı sağlayabilmektedir (Wasserbauer ve diğerleri, 2008; Zhu ve diğerleri, 2017). Yapılan *in vitro* bir çalışmada, hidrojen peroksitin ERK sinyalizasyonunu indükleyerek keratinosit migrasyonunu ve proliferasyonunu uyardığı saptanmıştır (Loo ve diğerleri, 2011). Ayrıca hidrojen peroksitin, VEGF salınımını uyararak anjiyogenezi desteklediği bilinmektedir (Cho ve diğerleri, 2001; Wasserbauer ve diğerleri, 2008; Kanta, 2011; Loo ve diğerleri, 2012). Bu bilgiler ışığında, laktik asit bakterilerinin metabolit olarak ürettikleri hidrojen peroksit aracılığıyla yara iyileşme sürecinde önemli rollerinin olabileceği düşünülmektedir (Ramos ve diğerleri, 2015).

2.7. Polisakkaritler

Polisakkaritler, yara iyileşmesini destekleyen ve farklı yara biyomalzemelerinde kullanılan polimerlerdir (Maver ve diğerleri, 2018: 9, 24). Özellikle aljinat, kitin/kitosan, bakteriyel sellüloz ve türevleri fiber teknolojisi ile üretilen yara örtü malzemelerinin ham maddesini oluşturur (Rathinamoorthy ve Sasikala, 2011). Günümüze kadar yapılan çalışmalar bitkilerden, alglerden, funguslardan ve mikroorganizmalardan elde edilen farklı yapılardaki polisakkaritlerin yara iyileşmesinde etkili olduğunu göstermiştir (Bae ve diğerleri, 2005;

Ramawat ve Merillon, 2015: 2137, 2150; Shanmugam ve Abirami, 2019; Veeraperumal ve diğerleri, 2020).

2.7.1. Probiyotik polisakkaritlerin yara iyileşmesinde kullanılma potansiyeli

Önemli bir ECM bileşeni olan GAG'ler; hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşiminde, hücre proliferasyonu ve migrasyonunda, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin sinyalizasyonunda fonksiyonel rollere sahip polisakkaritlerdir (Dogan, 2019: 65, 73). HA, glukuronik asit ve N-asetil-glukozamin ünitelerinin bir araya gelmesi ile oluşan bir GAG türevidir. Kıkırdak, göz dokusu ve cilt içeriğinin önemli bileşenlerinden biri olan HA, doku onarımında rol oynayan kritik bir biyomoleküldür (Neuman ve diğerleri, 2015). HA yara iyileşmesinde proliferasyon, migrasyon ve remodeling süreçlerini destekler (Nyman ve diğerleri, 2019). Ek olarak HA, gama (γ) radyasyonunun neden olduğu cilt hasarının onarımına önemli katkılar sağlamaktadır (Huang ve diğerleri, 2019). Yapılan çalışmalar, milk broth ortamında *S. thermophilus* YIT2084 suşunun, skimmed milk besiyerinde *Lactobacillus rhamnosus* FTDC 8313 ve *Lactobacillus gasseri* FTDC 8131 suşlarının HA ürettiklerini göstermiştir. Bu durum belirli probiyotik organizmalardan elde edilen HA'nın yara iyileşmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir (Lew ve Liong, 2013). β -glukanlar; bakterilerin, fungusların, alglerin, mayaların ve tahıllı bitkilerin hücre duvarında bulunan, 1,3;1,4 veya 1,6 β -glikozidik bağları ile D-glukoz monomerlerinden oluşan bir polisakkarittir (Bashir ve Choi, 2017). Prebiyotik etkileri de bulunan β -glukanlar özellikle probiyotik mayaların hücre duvarının önemli bileşenlerindendir ve farklı ortam koşulları ile sentezi indüklenebilmektedir (Bzducha-Wróbel ve diğerleri, 2013; Arena ve diğerleri, 2017). β -glukanlar ile yapılan çalışmalar bu polisakkaritin; sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve kemokinlerin üretiminin indüksiyonunda, hücre proliferasyonunun ve migrasyonunun tetiklenmesinde, kollajen sentezinde, anjiyogenezde ve re-epitelizasyonda rol aldığını, ayrıca antioksidan, antibakteriyel, anti-inflamatuar etkileri ile yara iyileşmesi ve doku onarımının pek çok fazına olumlu yönde katkılar sağladığını ortaya koymuştur (Majtan ve Jesenak, 2018). Probiyotik bakterilerin ve mayaların hücre duvarını çevreleyen, dallanmış bir glukogalakтан polisakkariti olan kefiranın, *Streptococcus pyogenes*'e karşı yara bölgesinde antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Rodrigues ve diğerleri, 2005). Selüloz, pek çok yara örtü malzemesinde ham madde olarak kullanılmakta olup, yara iyileştirici etkileri bulunan diğer bir biyoaktif polisakkarittir (Maver ve diğerleri, 2018: 9, 24). Özellikle bakteriyel selüloz, yara onarımında tercih edilebilecek en etkili

polisakkaritlerden birisidir. Bunun sebebi bakteriyel selülozun; saflığının, gözeneklilik kapasitesinin, sıvı ve gaz maddelere geçirgenliğinin, su tutma kapasitesinin ve dayanıklılığının yüksek potansiyelde olmasıdır. Ek olarak bakteriyel selüloz bazlı yara örtü malzemeleri yara iyileşmesinde; inflamatuvar, antimikrobiyal ve re-epitelizasyon süreçlerini regüle ederek yara iyileşmesinin hücresel ve moleküler olaylar zincirlerini dengeler (Portela ve diğerleri, 2019).

2.8. Ekzopolisakkaritler (EPS'ler)

Ekzopolisakkarit (EPS); bitki, mantar, algler ve bakteriler tarafından üretilen, şeker ve şeker türevlerinin monosakkarit rezidülerinden oluşan biyopolimerdir. Ekstrasellüler ortama salgılanan EPS'ler, kimyasal yapısı bakımından tek tip monosakkarit içeren homopolisakkarit ve D-glukoz, D-galaktoz, L-ramnoz, N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin, glukoronik asit gibi yapıları içeren heteropolisakkarit olmak üzere iki grup altında toplanır (Nwodo ve diğerleri, 2012; Schmid ve diğerleri, 2015). EPS'lerin anti-kanser, anti-obezite, anti-alerjik, anti-mikrobiyal, anti-viral, anti-biyofilm ve nöroprotektif etkilerinin yanı sıra inflamatuvar bağırsak hastalıklarında, otoimmün hastalıklarda, mide ülserlerinde ve kardiyovasküler hastalıklarda terapötik etkilerinin olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Angelin ve Kavitha, 2020; Sirin ve Aslim, 2020). Mikrobiyal polisakkaritler arasında laktik asit bakterileri tarafından üretilen EPS'ler, Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi tarafından genel olarak güvenli olarak kabul edilen (generally recognized as safe, GRAS) biyopolimerler olduğundan, probiyotik EPS'lerinin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda biyogüvenli olarak kullanımı uygundur (Angelin ve Kavitha, 2020).

2.8.1. EPS'lerin yara iyileşmesinde kullanılma potansiyelleri

Son yıllarda marin bakterilerden elde edilen EPS'lerin, marin polisakkariti olarak biyoaktiviteleri dikkat çekmektedir (Delbarre-Ladrat ve diğerleri, 2014; Dave ve diğerleri, 2020). Artık marin bakterisi *Polaribacter* sp. SM1127'den elde edilen EPS ile yapılan bir çalışmada, EPS'nin insan dermal fibroblastlarında güçlü bir antioksidan etki sağladığı ve hücre migrasyonunu indüklediği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, marin bakteri EPS'sinin tam katmanlı dermal yara kapanmasını destekleyerek yara iyileşmesini hızlandırdığı saptanmıştır (Sun ve diğerleri, 2020). Başka bir marin bakterisi olan *Alteromonas* sp. PRIM-28 kaynaklı EPS'nin, hücre siklusunun S fazını arttırıp keratinositlerin ve fibroblastların

proliferasyonunu ve *in vitro* yara modelinde migrasyonunu indüklediği bulunmuştur (Sahana ve Rekha, 2019). *Pantoea* sp. YU16-S3 marin bakterisinin EPS'si ile yapılan bir çalışmada ise EPS'nin, dermal keratinositler ve fibroblastlar üzerinde hücre adezyonunu ve proliferasyonunu desteklediği, fibroblastların migrasyonunu indüklediği, hücre siklusu fazlarının geçişini hızlandırdığı ve yara iyileşmesinde rol alan Wnt/ β -katenin sinyal yolağını indüklediği tespit edilmiştir (Sahana ve Rekha, 2020).

Farklı mikroorganizmalardan elde edilen EPS'ler ile yapılmış çalışmalar olsa da güvenli mikroorganizma olmaları sebebi ile probiyotiklerin EPS'leri son zamanlarda ilgi çekici olmuştur (Sanlibaba ve Çakmak, 2016). Yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus* sp.Ca6 tarafında üretilen EPS'nin *in vivo* yara iyileşme özellikleri gösterilmiştir. Çalışmada, *Lactobacillus* sp.Ca6 EPS'sinin muamlesi sonucu erkek Wistar sıçanlarında oluşturulan yaraların 9. günde % 89,4 ve 13. günde % 97,91 kapandığı, yara bölgesinde kollajen birikiminin ve epitelizasyonun arttığı tespit edilmiştir (Trabelsi ve diğerleri, 2017). *Lactobacillus* cinslerinden elde edilen EPS'ler ile yapılan başka bir çalışmada ise *L. casei* EPS'sinin insan fibroblast hücrelerinde yüksek anti-elastaz ve anti-kollajenaz aktivitesine sahip olduğu, MMP 1, 2, 3, 9 ve 10'nun mRNA ekspresyon seviyelerini azaltıp, TIMP-1 ve 2 mRNA ekspresyon seviyelerini arttırdığı saptanmıştır (Shirzad ve diğerleri, 2018).

2.9. Sinbiyotikler

Sinbiyotikler, probiyotik mikroorganizmalar ile prebiyotik ürünlerin kombinasyonu olarak tanımlanmaktadır. Sinbiyotikler, bakteri gelişimini ve/veya metabolizmasını uyararak canlı mikroorganizmaların konak üzerinde daha etkili sağlık yararları göstermeleri ile birlikte probiyotiklerin ve prebiyotiklerin tek başına uygulamalarına kıyasla kombinasyonları sonucu oluşturdukları daha faydalı sinerjistik etkileri bakımından dikkat çekicidir (Pandey ve diğerleri, 2015; Batista ve diğerleri, 2020). Kullanılan bazı sinbiyotiklere örnek olarak bifidobakterilerin ve laktik asit bakterilerinin fruktooligosakkarit, galaktooligosakkarit, inülin ve laktilol ile olan kombinasyonları verilebilir. Literatürde sinbiyotiklerin, antimikrobiyal, anti-kanser, anti-alerjik, immünomodülatör ve hipoglisemik etkileri gösterilmiştir (Bakır, 2012). Bununla birlikte, sinbiyotiklerin cilt yaraları üzerindeki etkilerini gösteren herhangi bir literatür çalışması bulunmamaktadır.

2.10. Yara İyileşmesi Çalışmalarında Kullanılan Deney Modelleri

2.10.1. *In vitro* yara modeli

In vitro yara modeli, yara iyileşmesi çalışmalarında yara alanına göç eden hücrelerin incelenmesi ve yara kapanmasının *in vitro* değerlendirilmesinde kullanılan bir hücre kültürü tekniğidir (Liang ve ve diğerleri, 2007). Analiz, prensipte tek taba halindeki hücre popülasyonu üzerinde pipet ucu ile oluşturulan yara modelinde yara bölgesine uygulamalar sonucu göç eden hücrelerin mikroskop ekipmanları aracılığıyla görüntülenmesi ve analiz edilmesine dayanır (Jonkman ve ve diğerleri, 2014). Bu doğrultuda, potansiyel terapötik ajanların hücre migrasyonunu modüle etme kapasitelerinin incelenmesi ve migrasyon ile ilişkili moleküler mekanizmalarının aydınlatılması için *in vitro* yara modelinin kullanımı uygundur (Bobadilla ve diğerleri, 2019).

Çalışmamız kapsamında, *Lactobacillus plantarum* GD2 suşu, bu suştan elde edilen liyofilize ekzopolisakkarit (L-EPS) ve sinbiyotik L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde oluşturulan *in vitro* yara modeline tek tek uygulanmış, uygulamaların fibroblast migrasyonu ve *in vitro* yara kapanması üzerine etkileri tespit edilmiştir. Böylece, probiyotik kaynaklı uygulamaların fibroblast migrasyonu aracılığıyla *in vitro* yara kapanması üzerinde etkili olup olmadığı ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2.10.2. TNF- α ile indülenen *in vitro* inflamasyon modeli

Cilt yaralarının iyileşmesinde, inflamasyona bağlı meydana gelen aksamalardaki en büyük etkenlerden birisi pro-inflamatuar sitokin olan tümör nekroz faktör alfanın (TNF- α) yara dokusundaki yüksek miktarlarıdır. Yüksek miktardaki TNF- α varlığı, özellikle diyabetik yaralardaki bozulmuş iyileşme mekanizmaları ile yakından ilişkili olup (Buck ve diğerleri, 1996), yara iyileşmesindeki gecikme TNF- α 'nın neden olduğu fibroblast apoptozunun tetiklenmesi ve fibroblast proliferasyonunun inhibe edilmesi ile karakterize edilir (Wang ve diğerleri, 2014). L929 fare fibroblast hücrelerinde oluşturulan TNF- α aracılı inflamasyon modeli bir *in vitro* inflamasyon modeli olup, bu model yara iyileşmesi çalışmalarında geçerli bir deney modelidir (Jiang ve diğerleri, 2020).

Çalışmamız kapsamında, L929 fare fibroblast hücre hattında TNF- α uygulaması ile (20 ng/mL, 30 dk.) *in vitro* inflamasyon modeli oluşturulmuştur. Ardından, *L. plantarum* GD2

suşu, bu suştan elde edilen L-EPS ve sinbiyotik, L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde oluşturulan *in vitro* inflamasyon modeline tek tek uygulanmış, uygulamaların fibroblast hücrelerindeki IL-1 β , IL-6 ve iNOS mRNA eksresyon seviyeleri incelenerek anti-inflamatuar etkileri araştırılmıştır. Böylece, probiyotik kaynaklı uygulamaların, fibroblast hücrelerinde inflamasyonu baskılayarak yara iyileşmesinde anti-inflamatuar etkilerinin olup olmadığı ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2.10.3. *In ovo* koryoallantoik membran (CAM) modeli

CAM modeli, embriyolu tavuk yumurtalarında pro-anjiyojenik özelliklerin araştırılmasında kullanılan *in ovo* bir yöntem olup (Merckx ve diğerleri, 2020), bu model ajanların pro-anjiyojenik özelliklerinin araştırılarak yara iyileşmesinde etkin olarak kullanılabilirliklerini test etmek için kullanılan geçerli bir modeldir (Grambow, Sorg H., Sorg C. ve Strüder, 2021). Çalışmamızda, *L. plantarum* GD2 suşunun, bu suştan elde edilen L-EPS'nin ve sinbiyotiğin pro-anjiyojenik etkileri *in ovo* CAM modeli kullanılarak araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizma

Tez çalışması kapsamında kullanılan *Lactobacillus plantarum* GD2 suşu, sağlıklı bebek gaitasından izole edilmiş olup, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan suşun biyokimyasal ve fizyolojik analizleri, analitik profil indeks 50 CHL (Biomerieux) test kiti ile ekibimiz tarafından yürütülen farklı tez çalışmalarında ve projelerde yapılmış olup, suşun 16S rRNA tüm gen bölgesi baz alınarak moleküler tanımlamaları gerçekleştirilmiş ve probiyotik özellikleri ortaya konmuştur (Tukenmez ve Aslim, 2018; Tukenmez ve diğerleri., 2019, 2019; Sirin ve Aslim, 2020, Sirin ve Aslim, 2021). Tez çalışması kapsamında kullanılan *Lactobacillus plantarum* GD2 suşun cins adı Zhen ve diğerleri (2020)'nin yaptıkları çalışma dikkate alınarak *Lactiplantibacillus plantarum* GD2 olarak güncellenmiştir.

3.1.2. Çalışmada kullanılan hücre hattı

Çalışmada sağlıklı fare fibroblast hücre hattı olan L929 hücreleri (ATCC®, CCL-1™) kullanılmış olup hücre hattının özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. L929 hücre hattının özellikleri (İnternet 1)

Organizma	<i>Mus musculus</i> , Fare
Doku	Subkütanöz konnektif doku; areolar ve adipoz
Üretim Formatı	Dondurulmuş
Morfoloji	Fibroblast
Kültür Özellikleri	Adherent
Biyogüvenlik Seviyesi	1
Yaş	100 günlük
Cinsiyet	Erkek
Uygulamalar	Toksisite testinde kullanılabilir ve transfeksiyon için uygundur.

3.2. Yöntem

3.2.1. *L. plantarum* GD2 suşunun kültür koşulları ve muahafazası

Mikroorganizmanın kültür koşulları

Çalışmada, *L. plantarum* GD2 suşunun geliştirilmesinde de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth ve agar besi ortamları kullanılmıştır. Bakteriler, MRS broth besiyerine % 2 olacak şekilde inoküle edildikten sonra 37 °C’de 18-20 saat inkübe edilmiş olup iki kez aktifleştirme işlemi yapıldıktan sonra çalışmada kullanılmıştır. Çalışmaların öncesinde, bakterilerin gram boyaması ve agar besiyerine tek koloni ekimi yapıp temiz olduğu gözlemlenen bakteriler ile çalışmalar yürütülmüştür. *L. plantarum* GD2 suşunun geliştirilmesinde kullanılan MRS broth besiyerinin içeriği Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. MRS broth besiyerinin içeriği

Kullanılan maddeler	Miktar (g, L)
Beef Ekstrakt	10,00
Yeast Ekstrakt	5,00
Pepton	10,00
Glukoz	20,00
Tri Amonyum Sitrat	2,00
Magnezyum Sülfat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,20
Manganez Sülfat (MnSO ₄ .4H ₂ O)	0,05
Di sodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	2,00
Sodyum Asetat	5,00
Tween 80	1,00

Yukarıda besiyeri içeriğinde verilen maddeler, belirtilen miktarlarda tartılarak bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda (Heidolph) çözündürülmüştür. Maddeler distile su içerisinde homojen hale geldikten sonra besiyerinin pH’sı 6,2’ye ayarlanıp, hacmi distile su ile 1 L’ye tamamlanmıştır. MRS agar besiyerinin hazırlanmasında ise Çizelge 3.2’de bulunan maddelere ilave olarak % 1,5 g agar eklenmiştir. Hazırlanan besiyerleri otoklavda (Sanyo) steril edilmiştir (121 °C, 15 dk.). Besi ortamı, aseptik koşullarda steril petrilere dökülerek, besi ortamı plakaları hazırlanmıştır.

Mikroorganizmanın stoklanması ve muhafazası

Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmanın stoklanması gliserol içerisinde ve liyofilize olmak üzere iki şekilde yapılmıştır. Mikroorganizma kültürünün gliserol ile muhafazası 30 °C’de kriyoviallerde sağlanmış olup (Tukenmez ve diğerleri, 2019), mikroorganizmanın ana stoğu Skim Milk Broth besiyeri içerisinde liyofilizatörde liyofilize edilerek (Christ alpha 2-4 LD plus), vialler içerisinde +4 °C’de muhafaza edilmiştir (Kos ve diğerleri., 2008).

3.2.2. *L. plantarum* GD2’nin probiyotik kültürlerinin hazırlanışı

L. plantarum GD2 suşunun, yürütülen çalışmalarda uygulama gruplarının oluşturulmasında kullanılacak uygun konsantrasyon miktarlarının ayarlanması için McFarland ile optik yoğunluk ayarlama tekniği kullanılmıştır. *L. plantarum* GD2 suşunun probiyotik kültürlerinin hazırlanışı aşağıdaki başlıklar altında anlatılmıştır.

McFarland değerinin ayarlanması

Yapılan çalışmada bakterilerin optik yoğunluğunun ayarlanması için McFarland metodu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılacak bakteriler, MRS broth besi ortamına % 2 olacak şekilde inoküle edilerek 2 kez aktifleştirme işlemi ile hazırlanmıştır. 2. aktif bakterileri 3000 rpm’de 30 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant kısmı pellette bulunan bakterilerden uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 5 mL serum fizyolojik (%0,9 NaCl) eklenerek vortekslenmiştir. Ardından canlı bakteriler 3000 rpm’de 10 dk. santrifüj edilmiş ve sonrasında bakteri pelletleri süpernatanttan uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 2 kez tekrarlanarak aktif bakteri kültürü besiyeri ve metabolik atıklardan arındırılmıştır. Ardından bakteriler 200 µL steril serum fizyolojik (SF) içerisinde süspanse edilmiştir. Optik yoğunluğun ayarlanması için cam deney tüpü içerisinde bulunan 5 mL SF çözeltisi kullanılmıştır. McFarland densitometre cihazı yoğunluğu ölçülen bakteriler, McFarland değeri 9 olana kadar aseptik koşullarda cam tüpe eklenmiştir (Sutton, 2011).

McFarland değeri ayarlanan canlı bakterilerin sayımı

McFarland densitometresi ile optik yoğunluğu 9’a ayarlanan bakterilerin sayımının yapılması için seri dilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Bakteriler 10^{-8} değerlerine kadar 8 farklı dilüsyon katsayısı ile seyreltilmiştir. Ardından seyreltmesi yapılan bakteriler, drigalski

spatülü kullanılarak yayma ekim yöntemi ile MRS agar besiyerine ekilmiştir. Ekimi yapılan bakteriler 37 °C’de ~ 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası agarda oluşan kolonilerin sayımı yapılmıştır (Zapata ve Arcos, 2015). Çalışma, her bir dilüsyon faktörü için 3 paralel olacak şekilde yürütülmüştür. Total bakteri sayımı birimi Eş. 3.1’e göre hesaplanmıştır:

$$\text{Total bakteri sayımı birimi (cfu/mL)} = \frac{(\text{Toplam koloni sayısı}) \times (\text{Dilüsyon faktörü})}{\text{Örnek hacmi}} \quad (3.1)$$

Canlı probiyotik bakterilerin hazırlanışı

McFarland değeri 9’a ayarlanan canlı bakteriler, 3000 rpm’de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak, pellette bulunan bakteriler çalışmalarda kullanılmak üzere 5 mL DMEM besiyerinde (Gibco) veya 1xPBS (Thermo Fisher) içerisinde süspanse edilmiştir. Koloni sayımları yapılan ve süspanse edilen bakterilerin çalışmada kullanılmak üzere seçilen miktarları 5, 10 ve 15 µl olup total hacimler 1 mL’ye tamamlanmıştır. Bu hacimlerde hesaplanan bakteri konsantrasyonları Çizelge 3.3’te verilmiştir. Canlı bakteriler, her çalışma öncesi taze olarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan probiyotik kültürlerinin hacimleri ve konsantrasyonları

Probiyotik kültür hacimleri	Canlı bakteri konsantrasyonu (cfu/mL)
5 µL bakteri süspansiyonu + 995 µL DMEM veya 1xPBS	$6,5 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^4$
10 µL bakteri süspansiyonu + 990 µL DMEM veya 1xPBS	$1,3 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^4$
15 µL bakteri süspansiyonu + 985 µL DMEM veya 1xPBS	$1,9 \times 10^6 \pm 1,75 \times 10^4$

3.2.3. EPS’nin izolasyonu, miktar tayini ve hazırlanışı

Çalışmalarda kullanılan *L. plantarum* GD2 EPS’sinin izolasyonu, miktar tayini ve uygulamalar için hazırlanışı ile ilgili prosedürler aşağıdaki başlıklar altında verilmiştir.

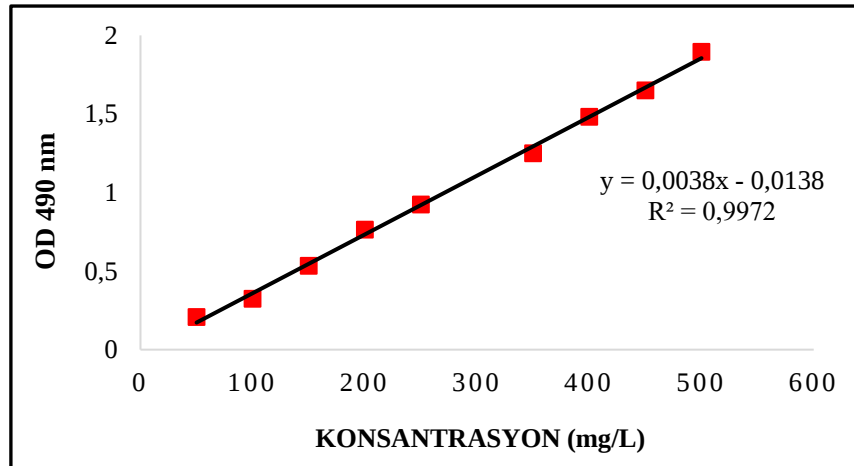
L-EPS izolasyonu

Çalışmada, en az iki kez aktifleştirilmiş *L. plantarum* GD2 suşu MRS broth besiyerine % 2 olacak şekilde ekilip 18-20 saat 37 °C inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakteri kültürleri 32 g trikloroasetikasit (Merk) eklenerek manyetik karıştırıcıda (Heidolph) 2 saat

karıştırılıp ardından 80 °C’de 10 dk. inkübe edilmiştir. Kültür, 4,000 rpm’de 10 dk. santrifüjlenerek (Nüve) süpernatant toplanmış ve pellet atılmıştır. Süpernatant üzerine % 96 saflığında 1:2 oranında etil alkol (Teksol) eklenerek karışım 1 gece +4 °C’de bekletilmiştir. İnkübe edilen örnekler 4,000 rpm’de 25 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak pellet toplanmıştır. Pelletler, 1 mL steril saf suda süspanse edilerek viallere alınmıştır. Vialler 1 gece +4 °C’de bekletilip ardından liyofilizatörde (Christ alpha 2-4 LD plus) liyofilize edilmiştir. Toz halindeki liyofilize EPS (L-EPS)’ler çalışmalarda kullanılmış olup, stok L-EPS’ler +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

L-EPS miktar tayini

L-EPS miktarları fenol sülfirik asit yöntemi ile belirlenmiştir. Örneklerin üzerine 0,5 mL fenol (Sigma-Aldrich) ve 5 mL sülfirik asit (Merk) eklenip 10 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra örnekler 15-20 dk. 30 °C’de inkübe edilmiştir. Ardından örneklerin absorbans değerleri 490 nm’de spektrofotometre cihazında (Pg Instruments) ölçülmüştür. Elde edilen L-EPS miktarları hazırlanan glukoz standartına göre tespit edilmiştir (Şekil 3.1) (Dubois ve diğerleri, 1956; Marshall ve Rawson, 1999; Tsuda ve diğerleri, 2008).



Şekil 3.1. Glukoz standart eğrisi. OD: Optik dansite

L-EPS’nin hazırlanışı

L-EPS’ler, çalışmalarda kullanılmak üzere DMEM veya 1xPBS içerisinde ana stok olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok L-EPS’ler 0,22 µm por çaplı steril filtreden (Merk Millipore) geçirilip -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan 750 ve 1000

$\mu\text{g/mL}$ L-EPS konsantrasyonları, ana stok L-EPS'den alınarak her çalışma öncesinde taze hazırlanmıştır.

3.2.4. Sinbiyotiklerin hazırlanışı

Çalışmalarda kullanılan sinbiyotikler, uygun koşullarda hazırlanan canlı probiyotik bakterilerin $6,5 \times 10^5$, $1,3 \times 10^6$ ve $1,9 \times 10^6$ cfu/mL konsantrasyonları (Bkz. 3.2.2) ile uygun koşullarda hazırlanan 750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS'lerin (Bkz. 3.2.3) 1:1 oranında kombinasyonları olacak şekilde DMEM veya 1xPBS içerisinde hazırlanmıştır. Sinbiyotikler her çalışma öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.

3.2.5. Hücre kültürünün hazırlanması ve ortam koşulları

L929 fare fibroblast hücreleri, DMEM besiyerinde 37°C %5'lik CO_2 etüvünde (Panasonic), T-25 ve T-75 hücre flaskları ile çalışmanın amacına uygun farklı hücre plakalarında kültüre edilmiştir. Hücreler, devam eden çalışmalarda yeniden kullanılabilmesi için stoklanmıştır. Tripsin-EDTA (Carpricorn Scientific) ile toplanıp santrifüj edilen hücrelerin üst fazı uzaklaştırılarak pellet %10 dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich) içeren besiyeri nazıkçe süspanse edilerek steril kryoviallere alınmıştır. Kryovial içerisinde bulunan hücreler -196°C sıvı azot tankında (Cryogenesis) bir sonraki çalışmaya kadar muhafaza edilmiştir (Alsawalha ve diğerleri, 2019)

Çalışmalarda, L-EPS uygulamaları için DMEM besiyeri kullanılmıştır. Canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarında ise DMEM'e ek olarak, laktik asit bakterilerin üretebileceği asidik metabolitlerden kaynaklanabilecek asidik pH etkisinin araştırılması amacıyla, besiyerini nötralize etmek için sodyum bikarbonat (NaHCO_3) içeren modifiye DMEM (mDMEM) besiyeri de kullanılmıştır. Hücrelerin geliştirilmesinde ve uygulamaların yapılmasında kullanılan DMEM besiyerlerinin içerikleri Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışmalarda kullanılan hücre kültürü besiyeri içerikleri

Hücrelerin geliştirilmesinde ve L-EPS uygulamalarında kullanılan DMEM besiyeri	Canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarında kullanılan DMEM besiyeri	Canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarında kullanılan mDMEM besiyeri
• % 10 fetal sıgır serumu (fetal bovine serum, FBS) (v/v) • % 1 penisilin/streptomisin (v/v) • DMEM	• % 10 FBS (v/v) • DMEM	• % 10 FBS (v/v) • % 1,3 NaHCO₃ (v/v) • DMEM

3.2.6. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) testleri

Bu çalışmada, sağlıklı ve TNF- α ile inflamasyonun indüklendiği L929 hücrelerine uygulanabilecek L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiklerin etkin olan ve hücreler üzerinde toksik olmayan en yüksek konsantrasyon ve uygulama süresi aralığının MTT yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiklerin hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi

96 kuyucuklu mikropalakalara L929 hücreleri, 10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin besiyeri her gün değiştirilerek yaklaşık %90 yoğunluğa gelmeleri beklenmiş ve ardından Çizelge 3.5'te verilen L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra her bir kuyucuğa 20 μ L MTT (Sigma-Aldrich) eklenerek, hücreler 4 saat 37°C'de CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Kuyulardaki sıvı uzaklaştırılarak tüm kuyulara 200 μ L DMSO (Sigma-Aldrich) eklenmiştir. 30 dk. 37°C'de CO₂'li etüvde DMSO ile inkübe edilen hücreler, mikropalaka okuyucuda (Epoch, Biotek) 570 nm'de okutulmuştur. Hücre canlılığı Eş. 3.2'ye göre hesaplanmıştır (Muniandy ve diğerleri, 2018):

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{(\text{Ortalama örnek absorbanası} / \text{ortalama kontrol absorbanası}) \times 100}{(3.2)}$$

Çizelge 3.5. Sağlıklı L929 hücrelerinin canlılığının belirlenmesinde kullanılan uygulama grupları

Uygulama grupları	Uygulama koşulları
1.Grup (Kontrol grubu)	L929 hücreleri uygulama gruplarına uygun olacak şekilde 0-36 saat veya 0-24 saat sadece DMEM veya mDMEM ile inkübe edilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
2.Grup (L-EPS grubu)	L929 hücreleri 0-36 saat DMEM içerisinde hazırlanan 750 ve 1000 µg/mL L-EPS ile inkübe edilmiştir.
3.Grup (Canlı bakteri grubu)	L929 hücreleri 0-24 saat DMEM veya mDMEM içerisinde hazırlanan $6,5 \times 10^5$, $1,3 \times 10^6$ ve $1,9 \times 10^6$ cfu/mL canlı bakteri ile inkübe edilmiştir.
4.Grup (Sinbiyotik grubu)	L929 hücreleri 0-24 saat DMEM veya mDMEM içerisinde hazırlanan $6,5 \times 10^5$, $1,3 \times 10^6$ ve $1,9 \times 10^6$ cfu/mL canlı bakterilerin sırasıyla 750 ve 1000 µg/mL L-EPS ile oluşturulan kombinasyonları ile inkübe edilmiştir.

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ile indüklenen L929 hücrelerinde L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmada, L929 fibroblast hücrelerinde *in vitro* inflamasyon modelinin oluşturulmasında kullanılacak TNF- α 'nın uygun konsantrasyon ve süresinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında inflamasyonun tetiklenmesi için rekombinant TNF- α proteini (abcam, ab259411) kullanılmış olup, TNF- α uygulaması şu şekilde gerçekleştirilmiştir: L929 hücreleri 96 kuyucuklu mikrolakalara 10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. ~%90 yoğunluğa gelen hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 1xPBS ile yıkanmıştır. Ardından hücreler, besiyeri içerisinde hazırlanan 0-50 ng/mL TNF- α ile 0-3 saat inkübe edilmiştir (Jiang ve diğerleri, 2020). İnkübasyon sonrası TNF- α içeren besiyeri uzaklaştırılarak hücrelere Çizelge 3.6'da verilen uygulamalar yapılmıştır. Çalışmada, bir önceki başlık altında anlatılan prosedür izlenerek, Eş. 3.2'ye göre % hücre canlılığı hesaplanmıştır (Muniandy ve diğerleri, 2018).

Çizelge 3.6. TNF- α ile indüklenen L929 hücrelerinin canlılığının belirlenmesinde kullanılan uygulama grupları

Uygulama grupları	Uygulama koşulları
1.Grup (Kontrol grubu)	L929 hücreleri sadece 0-24 saat DMEM veya mDMEM ile inkübe edilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
2.Grup (TNF- α grubu)	L929 hücreleri 10, 20 ve 50 ng/mL TNF- α ile 0-3 saat inkübe edildikten sonra 0-24 saat DMEM veya mDMEM ile inkübe edilmiştir.
3.Grup (TNF- α + L-EPS grubu)	L929 hücreleri 10, 20 ve 50 ng/mL TNF- α ile 0-3 saat inkübe edildikten sonra 0-24 saat DMEM içerisinde hazırlanan 750 ve 1000 μ g/mL L-EPS ile inkübe edilmiştir.
4.Grup (TNF- α + canlı bakteri grubu)	L929 hücreleri 10, 20 ve 50 ng/mL TNF- α ile 0-3 saat inkübe edildikten sonra 0-24 saat mDMEM içerisinde hazırlanan canlı bakteri ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL) ile inkübe edilmiştir.
5. Grup (TNF- α + sinbiyotik grubu)	L929 hücreleri 10, 20 ve 50 ng/mL TNF- α ile 0-3 saat inkübe edildikten sonra 0-24 saat mDMEM içerisinde hazırlanan sinbiyotik ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ve 750 μ g/mL L-EPS kombinasyonu) ile inkübe edilmiştir.

3.2.7. *In vitro* yara modelinin oluşturulması (scratch assay) ve yara kapanma analizi

Bu çalışmada, L929 fibroblast hücrelerinde oluşturulan *in vitro* yara modelinde L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik fibroblast migrasyonunu indüklemeleri sonucu yara kapanma oranına bağlı olarak, probiyotik kaynaklı bu uygulamaların yara kapanmasındaki etkileri ile etken uygulama süresi ve/veya uygulama dozlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yara kapanmasının inverted mikroskop ile analizi

L929 hücreleri 48 kuyucuklu mikrolakalara $2,5 \times 10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. 1 gece inkübasyonun ardından her bir kuyuda p200 pipet ucu ile artifikal (yapay) bir yara bölgesi oluşturulmuştur. *In vitro* yara bölgesi oluşturulduktan sonra hücre artıkları içeren besiyeri uzaklaştırılarak, hücreler 100 μ l FBS içermeyen DMEM besiyeri ile yıkanmıştır. Ardından hücrelere Çizelge 3.7’de verilen uygulama gruplarının muamelesi yapılmıştır. Uygulamaların inkübasyonu sonrasında yara bölgelerinin görüntüleri inverted mikroskop

(Leica) ile 4x büyütmede, mikroskop kamera yazılımı (Llumin Touptview) ile kaydedilmiştir. Fibroblastların yara bölgesine migrasyonu Image J programı kullanılarak alan ölçümü ile analiz edilmiştir. Yara kapanma yüzdeleri Eş. 3.3'e göre hesaplanmıştır (Liang ve diğerleri, 2007). En iyi sonuç veren L-EPS uygulamalarının yara kapanma sonuçları taramalı elektron mikroskop ile teyit edilmiştir.

$$\% \text{ Yara Kapanma} = (\Delta 0h - \Delta th) / \Delta 0h \times 100 \quad (3.3)$$

$\Delta 0h$: 0. saat yara alanı (μm)

Δth : t. saat yara alanı (μm)

Çizelge 3.7. *In vitro* yara modelinde kullanılan uygulama grupları

Uygulama grupları	Uygulama koşulları
1.Grup (Kontrol grubu)	L929 hücreleri uygulama gruplarına uygun olacak şekilde 0-36 saat veya 0-24 saat sadece DMEM veya mDMEM ile inkübe edilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
2.Grup (L-EPS grubu)	L929 hücreleri 0-36 saat DMEM içerisinde hazırlanan 750 ve 1000 $\mu g/mL$ L-EPS ile inkübe edilmiştir.
3.Grup (Canlı bakteri grubu)	L929 hücreleri 0-24 saat DMEM veya mDMEM içerisinde hazırlanan canlı bakteri ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL) ile inkübe edilmiştir.
4.Grup (Sinbiyotik grubu)	L929 hücreleri 0-24 saat DMEM veya mDMEM içerisinde hazırlanan sinbiyotik ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ve 750 $\mu g/mL$ L-EPS kombinasyonu) ile inkübe edilmiştir.

L-EPS uygulanmış yara modelinde taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

Bu çalışmada, L929 hücrelerinde *in vitro* yara modeli yukarıdaki protokolde anlatıldığı gibi oluşturulmuş olup, 18 ve 24 saat 1000 $\mu g/mL$ L-EPS uygulamaları yapılmıştır. Muamele sürelerinin ardından hücreler %2,5 gluter aldehitte tespit edilmiştir. Tespiti yapılan hücreler, sodyum fosfat tamponu (pH 7,2) ile yıkanmış ve % 70'lik alkole alınmıştır. Yükselen alkol serilerinden sonra ise preparat, kritik noktada kurutulmuştur (Polaron, CPD 701 Critical Point Dryer). Örnekler, kaplama cihazında (Polaron SC502) altınla kaplanmıştır ve SEM

cihazı (Jeol JSM-6060) ile 5 kV'de 100x büyütmede incelenerek, dijital görüntüleri alınmıştır.

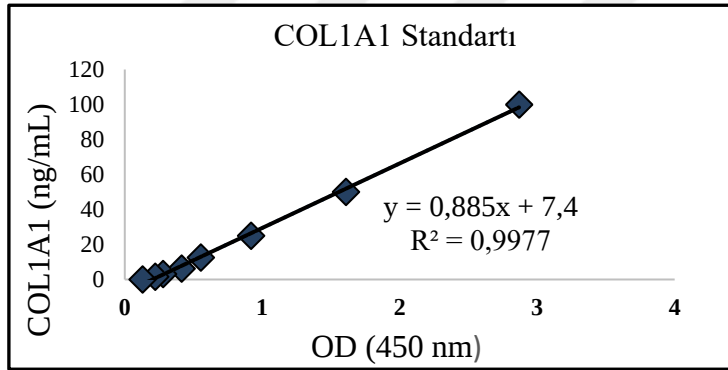
3.2.8. L929 hücrelerinde kollajen ve fibronektin oluşum düzeylerinin ELISA kiti ile belirlenmesi

Bu çalışmada L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerinden olan ve yara matriksinin oluşumunda rol alan kollajen tip 1 alfa 1 (COL1A1) ve fibronektinin (FN) oluşum düzeyleri üzerine etkisi ELISA kiti (Cloud-Clone Corp.) ile tespit edilmiştir (Szóstek-Mioduchowska ve diğerleri, 2019).

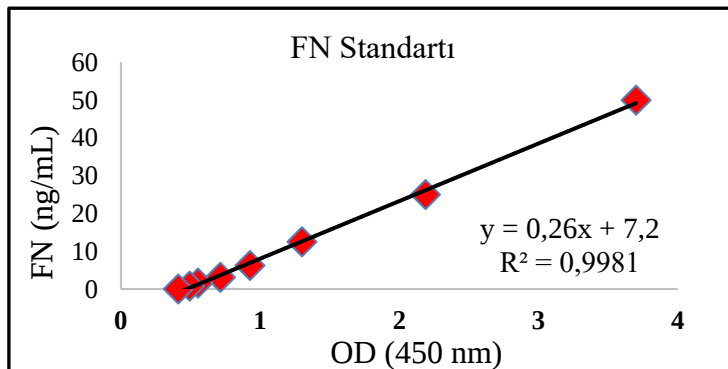
L929 hücreleri, 6 kuyucuklu mikropalakalara $2,5 \times 10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve hücrelere Çizelge 3.8'de verilen uygulama gruplarının muamelesi yapılmıştır. İnkübasyon sonrası, hücre besiyerleri steril santrifüj tüplerine toplanmıştır. Örnekler 1.000 g'de 20 dk. santrifüj edilerek süpernatant yeni bir santrifüj tüpünde toplanmıştır. Her bir örnek için 3 paralel olacak şekilde ELISA kuyularına örnekler 100 µl eklenmiştir. Plaka, adeziv film ile kaplanarak, 37 ° C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyulardan sıvı faz uzaklaştırılıp, her kuyuya 100 µL Detection Reagent A eklenmiştir. Plaka, tekrar adeziv film ile kaplanarak, 37 ° C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyulardan sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Her kuyu 3 kez 1x yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Her kuyuya 100 µL Detection Reagent B eklenmiştir. Plaka, adeziv film ile kaplanıp, 37 ° C'de 30 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyulardan sıvı faz uzaklaştırılarak her kuyu 5 kez 1x yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Her kuyuya 90 µL Substrat Solution eklenmiştir. Plaka, yeniden adeziv film ile kaplanarak, 37 ° C'de 20 dk. inkübe edilmiştir. Bu aşamada kuyularda bulunan sıvıların rengi maviye döner. İnkübasyonun ardından her bir kuyuya 50 µL Stop Solution eklenmiştir. Her bir kuyunun rengi sarıya dönene kadar beklenmiştir. Örnekler 450 nm'de mikropalaka (Epoch, BioTek) okuyucuda okutularak, COL1A1 ve FN oluşum düzeyleri kitlerin içerisinde bulunan standartlar ile oluşturulmuş eğri grafiğine göre hesaplanmıştır. COL1A1 standart eğrisi Şekil 3.2'de, FN standart eğrisi Şekil 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.8. COL1A1 ve FN ELISA çalışmasında kullanılan uygulama grupları

Uygulama grupları	Uygulama koşulları
1.Grup (Kontrol grubu)	L929 hücreleri uygulama gruplarına uygun olacak şekilde 0-24 saat sadece DMEM veya mDMEM ile inkübe edilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
2.Grup (L-EPS grubu)	L929 hücreleri 18 ve 24 saat DMEM içerisinde hazırlanan 750 ve 1000 µg/mL L-EPS ile inkübe edilmiştir.
3.Grup (Canlı bakteri grubu)	L929 hücreleri 24 saat DMEM veya mDMEM içerisinde hazırlanan canlı bakteri ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL) ile inkübe edilmiştir.
4.Grup (Sinbiyotik grubu)	L929 hücreleri 24 saat DMEM veya mDMEM içerisinde hazırlanan sinbiyotik ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ve 750 µg/mL L-EPS kombinasyonu) ile inkübe edilmiştir.



Şekil 3.2. COL1A1 standart eğrisi. OD: Optik dansite



Şekil 3.3. FN standart eğrisi. OD: Optik dansite

3.2.9. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin gen düzeyinde etkilerinin belirlenmesi

Bu çalışmada L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin L929 hücrelerine uygulanması sonucunda; COL1A1 ve FN mRNA ekspresyon seviyeleri ile dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1)/Smad sinyal yolağında bulunan TGF- β 1, Smad2, Smad3 ve Smad4 mRNA ekspresyon seviyelerindeki indükleyici, *in vitro* inflamasyon modelinde ise interlökin 1 beta (IL-1 β), interlökin 6 (IL-6) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) mRNA ekspresyon seviyelerinde inhibe edici etkilerinin olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.

L929 hücreleri, 6 kuyucuklu mikropalaklara $2,5 \times 10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. 1 gece inkübasyona bırakılan hücrelere çalışmanın amacına uygun olacak şekilde L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları yapılmıştır. COL1A1, FN, TGF- β 1, Smad2, Smad3 ve Smad4 mRNA ekspresyon seviyelerinin tespitinde kullanılan uygulama grupları Çizelge 3.9'da, IL-1 β , IL-6 ve iNOS mRNA ekspresyon seviyelerinin tespitinde kullanılan uygulama grupları Çizelge 3.10'da verilmiştir. Uygulamalar sonrasında ilgili genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi amacıyla hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmıştır (Tukenmez ve diğerleri, 2019).

Çizelge 3.9. COL1A1, FN, TGF- β 1, Smad2, Smad3, Smad4 mRNA ekspresyonlarının analizinde kullanılan uygulama grupları

Uygulama grupları	Uygulama koşulları
1.Grup (Kontrol grubu)	L929 hücreleri uygulama gruplarına uygun olacak şekilde 18 ve 24 saat sadece DMEM veya mDMEM ile inkübe edilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
2.Grup (L-EPS grubu)	L929 hücreleri 18 ve 24 saat DMEM içerisinde hazırlanan 750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS ile inkübe edilmiştir.
3.Grup (Canlı bakteri grubu)	L929 hücreleri 18 ve 24 saat DMEM veya mDMEM içerisinde hazırlanan canlı bakteri ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL) ile inkübe edilmiştir.
4.Grup (Sinbiyotik grubu)	L929 hücreleri 18 ve 24 saat DMEM veya mDMEM içerisinde hazırlanan sinbiyotik ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ve 750 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS kombinasyonu) ile inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.10. IL-1 β , IL-6 ve iNOS mRNA ekspresyonlarının analizinde kullanılan uygulama grupları

Uygulama grupları	Uygulama koşulları
1.Grup (Kontrol grubu)	L929 hücreleri sadece 0-24 saat DMEM veya mDMEM ile inkübe edilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
2.Grup (TNF- α grubu)	L929 hücreleri 20 ng/mL TNF- α ile 30 dk. inkübe edildikten sonra 0-24 saat DMEM veya mDMEM ile inkübe edilmiştir.
3.Grup (TNF- α + L-EPS grubu)	L929 hücreleri 20 ng/mL TNF- α ile 30 dk.inkübe edildikten sonra 0-24 saat DMEM içerisinde hazırlanan 750 ve 1000 μ g/mL L-EPS ile inkübe edilmiştir.
4.Grup (TNF- α + canlı bakteri grubu)	L929 hücreleri 20 ng/mL TNF- α ile 30 dk. inkübe edildikten sonra 0-24 saat mDMEM içerisinde hazırlanan canlı bakteri ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL) ile inkübe edilmiştir.
5. Grup (TNF- α + sinbiyotik grubu)	L929 hücreleri 20 ng/mL TNF- α ile 30 dk. inkübe edildikten sonra 0-24 saat mDMEM içerisinde hazırlanan sinbiyotik ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ve 750 μ g/mL L-EPS kombinasyonu) ile inkübe edilmiştir.

Total RNA izolasyonu

Uygulama yapılmamış kontrol grubu ve uygulama yapılmış hücrelerden total RNA izolasyonu GeneJET RNA İzolasyon Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Elizei ve diğerleri, 2017). Hücreler uygun inkübasyon koşulları sağlandıktan sonra besiyeri uzaklaştırılarak soğuk 1XPBS ile toplanarak çöktürülmüştür. Pellet üzerine 600 μ L lizis buffer ve 12 μ L β -merkaptetanol eklenerek, vorteks ile karıştırılmıştır. Hücre lizatları üzerine 360 μ L (% 96-100) etanol eklenerek, etanol lizat karışımı toplama tüpüne aktarılmıştır. Ardından 12 000 g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne geçen akış atılarak kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır. Kolon üzerine 700 μ L yıkama solüsyonu I eklenerek 12000 g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Akış atılarak kolon yeniden aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Kolona 600 μ L yıkama solüsyonu II eklenerek 12 000 x g'de 1 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Altta biriken sıvı dökülerek kolon toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Kolon üzerine 250 μ L yıkama solüsyonu II eklenip 12 000 g'de 2 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak kolon steril bir ependorf içerisine yerleştirilmiştir. Kolonun merkezine 30-40 μ L

nükleaz içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından ependorf kolon ile birlikte 12000 g'de 1 dk. santrifüjlenmiştir. Bu aşamada total RNA, steril ependorfa geçmiştir. İzolasyon sonrası RNA saflık ve miktar tayini için örnekler Epoch (Biyotek) mikrolaka okuyucu cihazında 260 ve 280 nm dalga boyunda okutulmuş, 260/280 absorbans değerleri ~2 olan örnekler çalışmada kullanılmıştır. İzole edilen RNA'lar, çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır .

RNA örneklerinden cDNA (komplementer DNA) sentezi

İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezinin gerçekleştirilmesi için High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Steril PCR tüplerine; 2 µL 10xRT buffer, 0,8 µL 25xdNTP karışımı (100 mM), 2 µL 10XRT Random Primerleri, 1 µL reverse transkriptaz enzimi, 4,2 µL nükleaz içermeyen su ve 10 µL RNA örneği eklenerek karışım 10-20 saniye santrifüj edilmiştir. Bu aşamada her bir PCR tüpü içerisinde 20 µL total hacim bulunmaktadır. Her bir tüp 25 °C'de 10 dk., 37 °C'de 120 dk ve 85 °C'de 5 dk. inkübe edilerek cDNA sentezi tamamlanmıştır. İzolasyon sonrası cDNA saflık ve miktar tayini için örnekler Epoch (Biyotek) mikrolaka okuyucu cihazında 260 ve 280 nm dalga boyunda okutulmuş, 260/280 absorbans değerleri ~1,8 olan örnekler çalışmada kullanılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar çalışmalarda kullanılana kadar -80 °C'de saklanmıştır.

qRT-PCR reaksiyonu

Sentezlenen cDNA'ların mRNA ekspresyon seviyeleri qRT-PCR tekniği ile incelenmiştir. Çalışmada, PCR reaksiyonu için Quant Studio 3 qRT-PCR (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific) cihazı kullanmış olup, reaksiyon için SYBR Green PCR Kit (SensiFAST SYBR® LowROX Kit) (BIO94005- Bioline, ABD) kullanılmıştır. Deneylerde tüm örnekler ve genler ile üçer kez çalışılarak analizlerde bu ölçümlerin ortalaması kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan qRT-PCR koşulları Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. qRT-PCR koşulları

Madde	Miktar (µl)
SYBER green	10,00
cDNA	2,00
Forward primer (10 pmol/µl)	1,00
Reverse primer (10 pmol/µl)	1,00
ddH ₂ O	6,00

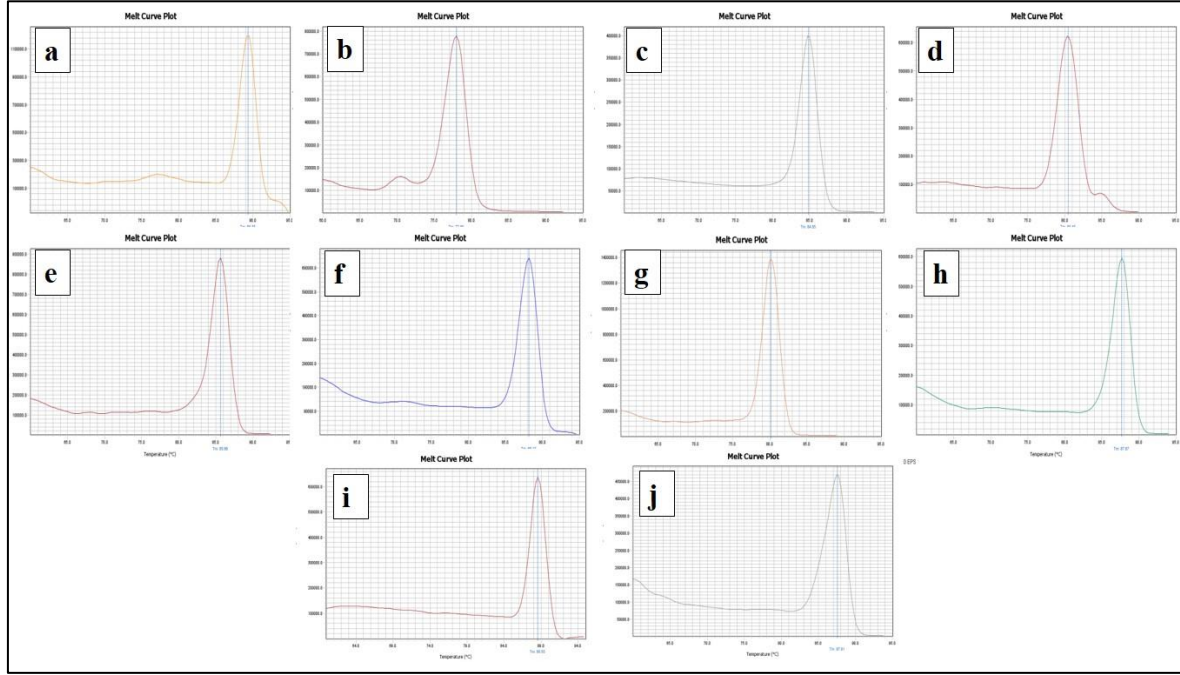
qRT-PCR reaksiyonu COL1A1, FN, TGF-β1, Smad2, Smad3 ve Smad4 için; 94 °C'de 3 dk., 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 30 saniye (40 döngü) olacak şekilde ayarlanmıştır. IL-1β için 94 °C'de 3 dk., 94 °C'de 30 saniye, 62,5 °C'de 30 saniye (40 döngü) olacak şekilde ayarlanmıştır. IL-6 ve iNOS için; 94 °C'de 3 dk., 94 °C'de 30 saniye, 63 °C'de ayarlanmıştır. (Tukenmez ve diğerleri, 2019). Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (GAPH) geni bu çalışmada housekeeping gen olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler ve dizileri Çizelge 3.12'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. qRT-PCR analizinde kullanılan primerler ve dizileri

Genler	Primerler	bç	
COL1A1	FW: 5'-ACATGCCGCGACCTCAAGAT-3'	20	(Martignago ve diğerleri, 2014)
	RV: 5'-ATGTCTAGTCCGAATTCCTG-3'	21	
FN	FW: 5'-ATGTGGACCCCTCCTGATAGT-3'	21	(Smyrek ve diğerleri, 2018)
	RV: 5'-GCCCAGTGATTTCAGCAAAGG-3'	21	
TGF-β1	FW: 5'-GTGTGGAGCAACATGTGGAACCTCA-3'	25	(Wang ve diğerleri, 2013)
	RV: 5'-TTGGTTCAGCCACTGCCGTA-3'	20	
Smad2	FW: 5'-AACCCGAATGTGCACCATAAGAA-3'	23	(Wang ve diğerleri, 2013)
	RV: 5'-GCGAGTCTTTGATGGGTTTACGA-3'	23	
Smad3	FW: 5'-GTCAACAAGTGGTGGCGTGTG-3'	21	(Wang ve diğerleri, 2013)
	RV: 5'-GCAGCAAAGGCTTCTGGGATAA-3'	22	
Smad4	FW: 5'-TGACGCCCTAACCATTTCCAG-3'	21	(Wang ve diğerleri, 2013)
	RV: 5'-CTGCTAAGAGCAAGGCAGCAAA-3'	22	
IL-1β	FW: 5'-GCAACTGTTCTGAACTC-3'	18	(Lu ve diğerleri, 2017)
	RV: 5'-CTCGGAGCCTGTAGTGCA-3'	18	
IL-6	FW: 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'	20	(Lu ve diğerleri, 2007)
	RV: 5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'	20	
iNOS	FW: 5'-TAGGCAGAGATTGGAGGCCTTG-3'	22	(Gan ve diğerleri, 2012)
	RV: 5'-GGGTTGTTGCTGAACCTCCAGTC-3'	23	
GAPDH	FW: 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAA-3'	20	(Joung ve diğerleri, 2012)
	RV: 5'-CTTCTCCATGGTGGTGAAGA-3'	20	

Gen ekspresyonunun nicel olarak ifade edilebilmesi için, tüm gen transkriptinin floresan sinyalinin eşiğin üzerine çıkmasında gerekli döngülerin sayısı olarak tanımlanan döngü eşiği (Ct) tespit edilmiştir (Wong ve Medrano, 2005). Eşik sinyali ile floresans başlangıç sinyali qRT-PCR cihazı ile saptanmıştır. Primerlerde dimer oluşumu ve spesifik olmayan

amplifikasyonların belirlenmesi için çalışmada kullanılan primerlerin erime eğrisi (melting curve) analizleri yapılmıştır (Şekil 3.1). Çalışmada kullanılan primerlerin erime sıcaklıkları; COL1A1 için 89 °C, FN için 78 °C, TGF- β 1 için 84 °C, Smad2 için 80 °C, Smad3 için 85 °C, Smad4 için 88 °C, IL-1 β için 80 °C, IL-6 için 87 °C, iNOS için 88 °C ve GAPDH için 87 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan primerler ile hedef gen bölgelerinin erime eğrileri. (a) COL1A1, (b) FN, (c) TGF- β 1, (d) Smad2, (e) Smad3, (f) Smad4, (g) IL-1 β , (h) IL-6, (i) iNOS, (j) GAPDH

3.2.10. Flow sitometri analizi

Bu çalışmada; L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları yapılmış hem sağlıklı hem de TNF- α ile tetiklenen L929 fibroblast hücrelerinin indüklenen proliferasyon kapasitelerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Flow sitometri ile yapılan proliferasyon çalışmalarında uygulamaların inkübasyon süresinin, çalışmada kullanılacak hücrelerin iki katına çıkma süresinin (doubling-time) üzerinde olması önerilir. Bu kapsamda, L929 fibroblastlarının flow sitometri ile hücre kültüründeki iki katına çıkma sürelerine bakılmış ve bu süre ~22 saat olarak tespit edilmiştir. Bu sebeple, uygulamaların kullanılabilecek uygun inkübasyon süresi 24 saat olarak seçilmiştir. Çalışmada kullanılan uygulama grupları Çizelge 3.13'te verilmiştir.

Çizelge 3.13. Flow sitometri analizinde kullanılan uygulama grupları

Uygulama grupları	Uygulama koşulları
1.Grup (Kontrol grubu)	L929 hücreleri uygulama gruplarına uygun olacak şekilde 24 saat sadece DMEM veya mDMEM ile inkübe edilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
2.Grup (L-EPS grubu)	L929 hücreleri 24 saat DMEM içerisinde hazırlanan 750 ve 1000 µg/mL L-EPS ile inkübe edilmiştir.
3.Grup (Canlı bakteri grubu)	L929 hücreleri 24 saat DMEM veya mDMEM içerisinde hazırlanan canlı bakteri ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL) ile inkübe edilmiştir.
4.Grup (Sinbiyotik grubu)	L929 hücreleri 24 saat DMEM veya mDMEM içerisinde hazırlanan sinbiyotik ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ve 750 µg/mL L-EPS kombinasyonu) ile inkübe edilmiştir.
5.Grup (TNF- α grubu)	L929 hücreleri 20 ng/mL TNF- α ile 30 dk. inkübe edildikten sonra 24 saat DMEM veya mDMEM ile inkübe edilmiştir.
6.Grup (TNF- α + L-EPS grubu)	L929 hücreleri 20 ng/mL TNF- α ile 30 dk.inkübe edildikten sonra 24 saat DMEM içerisinde hazırlanan 750 ve 1000 µg/mL L-EPS ile inkübe edilmiştir.
7.Grup (TNF- α + canlı bakteri grubu)	L929 hücreleri 20 ng/mL TNF- α ile 30 dk. inkübe edildikten sonra 24 saat mDMEM içerisinde hazırlanan canlı bakteri ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL) ile inkübe edilmiştir.
8.Grup (TNF- α + sinbiyotik grubu)	L929 hücreleri 20 ng/mL TNF- α ile 30 dk. inkübe edildikten sonra 24 saat mDMEM içerisinde hazırlanan sinbiyotik ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ve 750 µg/mL L-EPS kombinasyonu) ile inkübe edilmiştir.

Hücrelerin hazırlanması ve proliferasyon analizi

Yapılan çalışmada hücrelerin proliferasyon analizi CellTrace™ Cell proliferation kiti (ThermoFisher) kullanılarak yapılmıştır. Uygulamaların öncesinde hücreler toplanarak 10 µM proliferasyon boyası (CSF) ile muamele edilmiştir. Ardından hücreler, 6-kuyulu hücre plakasına $\sim 2 \times 10^5$ /kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücre uygulamalarının öncesinde hücreler 1xPBS ile yıkanmış ve Çizelge 3.13'te verilen uygulamalar yapılmıştır. Hücrelerin nukleuslarında boyar madde bulundurma miktarına göre Flow Sitometri'de (NovoCyte) hücrelerin proliferasyonu tespit edilmiştir (Houston ve diğerleri, 2018).

3.2.11. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin *in ovo* koryoallantoik membran (CAM) modelinde pro-anjiyogenik etkilerinin tespit edilmesi

Çalışmada, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin pro-anjiyogenik etkisini değerlendirmek için *in ovo* CAM modeli kullanılmıştır. Dölllenmiş tavuk yumurtaları Bil-Yem Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti.'den temin edilmiştir. Yumurtalar 3 gün boyunca 37°C'de %70 nem oranında, kuluçka makinasında (Europe) inkübe edildikten sonra içerisinden steril şırınga ile ~10 mL albümin çekilmiş ve yumurtalar tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından embriyolu yumurtalarda embriyonun varlığını tespit etmek için ışık ile kontrol yapılmış ve yumurta kabukları %70'lik alkol ile temizlenerek koryoallantoik membranı görünür hale getirmek için kabukta 1-2 cm çapında bir pencere açılmış ve uygulama öncesi yumurtaların uygulama yapılacak damar bölgeleri 0. saat olarak stereo mikroskop (Leica) ile 1x büyütmede görüntülenmiştir. Aynı gün uygulamalar seçilen damar bölgesi üzerine 50 µL bırakılarak etken madde uygulamaları yapılmıştır (Çizelge 3.14). Kabuktaki pencereler embriyoların kurumasını engellemek amacıyla laboratuvar filmi ile kapatılmıştır. Uygulamaların inkübasyonu sonrasında 12. ve 24. saat görüntüleri stereo mikroskop ile görüntülenmiştir. CAM mikroskop görüntüleri, ImageJ yazılımındaki uzunluk ölçüm aracı ile total damar uzunluğu bakımından değerlendirilmiştir (Ozgurtas ve diğerleri, 2008; Kılıççalan ve diğerleri, 2021).

Çizelge 3.14. *In ovo* CAM modelinde kullanılan uygulama grupları

Uygulama grupları	Uygulama koşulları
1.Grup (Kontrol grubu)	Damarlar uygulama gruplarına uygun olacak şekilde 12 ve 24 saat sadece 1xPBS veya NaHCO ₃ içeren PBS ile muamele edilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmamıştır.
2.Grup (L-EPS grubu)	Damarlar, 12 ve 24 saat 1xPBS içerisinde hazırlanan 750 ve 1000 µg/mL L-EPS ile muamele edilmiştir.
3.Grup (Canlı bakteri grubu)	Damarlar, 12 ve 24 saat NaHCO ₃ içeren 1xPBS içerisinde hazırlanan canlı bakteri (6,5x10 ⁵ cfu/mL) ile muamele edilmiştir.
4.Grup (Sinbiyotik grubu)	Damarlar, 12 ve 24 saat NaHCO ₃ içeren 1xPBS içerisinde hazırlanan sinbiyotik (6,5x10 ⁵ cfu/mL canlı bakteri ve 750 µg/mL L-EPS kombinasyonu) ile muamele edilmiştir.

3.2.12. İstatistiksel analizler

Çalışma sonuçları SPSS 22.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Uygulama yapılmamış kontrol grubu ile L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarına ek TNF- α uygulanmış grup ile L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının grup arasındaki farklar t testi ile belirlenmiştir. MTT testinde elde edilen hücre canlılığı ortalama değerleri arasındaki farklar Multivariate Anova Post Hoc Tukey HSD ($p<0,05$) ile belirlenmiştir. *In vitro* yara analizi çalışmasında L-EPS ile elde edilen ortalama yara kapanma değerleri arasındaki farklar Multivariate Anova Dunnett ($p<0,05$), canlı bakteri ve sinbiyotik ile elde edilen ortalama yara kapanma değerleri arasındaki fark ise iki yönlü Anova Dunnett ($p<0,05$) ile tespit edilmiştir. ELISA ve qRT-PCR analizlerinde elde edilen ortalama oluşum ve ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar tek yönlü Anova Post Hoc Tukey HSD ($p<0,05$) ile belirlenmiştir. Flow sitometri çalışmasında elde edilen ortalama hücre bölünme değerleri arasındaki farklar tek yönlü Anova Dunnett ($p<0,05$) ile tespit edilmiştir. Koryoallantoik membran (CAM) modelinde elde edilen ortalama damar uzunlukları kat sayısı arasındaki fark iki yönlü Anova Bonferroni ($p<0,05$) ile belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık %95 düzeyinde ($p<0,05$) belirlenmiştir. Tüm analizler tekrarlı ve paralelli [MTT (n:3), *In vitro* yara analizi (n:5), ELISA (n:3), qRT-PCR (3), Flow sitometri (n:3) ve CAM analizi (n:3)] olarak çalışılmış, sonuçlar ortalama değer (OD) $\pm$ standart sapma (SD) olarak verilmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. *Lactobacillus Plantarum* GD2 Suşunun L-EPS Miktarı

Bu çalışmada kullanılan, *L. plantarum* GD2 suşundan elde edilen ve liyofilize hale getirilmiş EPS'nin fenol sülfürik metodu ile miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. *L. plantarum* GD2 suşundan elde edilen L-EPS miktarının $398 \pm 4,4$ mg/L olduğu tespit edilmiştir (n:3, $OD \pm SD$).

4.2. L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotik Uygulamalarının Hücre Canlılığı Üzerine Sitotoksik Etkileri

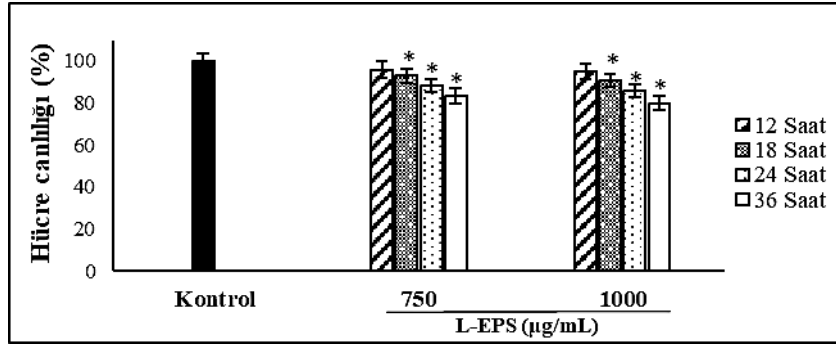
Bu çalışmada, L929 hücrelerine L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarında kullanılacak etkin olan ve hücreler üzerinde toksik olmayan en yüksek konsantrasyon ve uygulama süresi aralığının MTT yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

4.2.1. L-EPS uygulamasının L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksite sonuçları

Çalışmada, L929 hücreleri 12, 18, 24 ve 36 saat boyunca 750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS ile muamele edilmiş olup, inkübasyon sonrası % hücre canlılığı tespit edilmiştir. Kontrol grubu olarak yalnızca DMEM uygulaması yapılan L929 hücreleri kullanılmıştır.

L-EPS uygulamaları sonucu, artan konsantrasyon ve muamele sürelerinde hücre canlılığın azaldığı tespit edilmiştir. Ancak, tüm uygulamalar incelendiğinde L-EPS'nin L929 hücrelerinde %4-20 arasında değişen düşük oranlarda hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1) Bu oranının toksisite açısından dikkate değer olmadığı görülmüş olup, L-EPS'nin tüm konsantrasyon ve sürelerdeki uygulamalarının biyogüvenli olarak kullanılabileceğini göstermiştir. L-EPS'nin 36 saat uygulamalarında diğer uygulamalara göre toksisitenin yüksek bulunması ileriki çalışmalarda dikkate alınmıştır.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, 18, 24 ve 36 saat uygulama sürelerinde azalan hücre canlılığı değerlerinin kontrole göre anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($*p < 0,05$). 12 saat uygulamalarının ise azalan hücre canlılığı değerlerinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$). 750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS uygulamaları ikili olarak karşılaştırıldığında hücre canlılığı oranları arasında anlamlı bir fark yoktur ($p > 0,05$).



Şekil 4.1. L-EPS uygulanmış L929 hücrelerinin % hücre canlılığı sonuçları, n: 3, OD ± SD

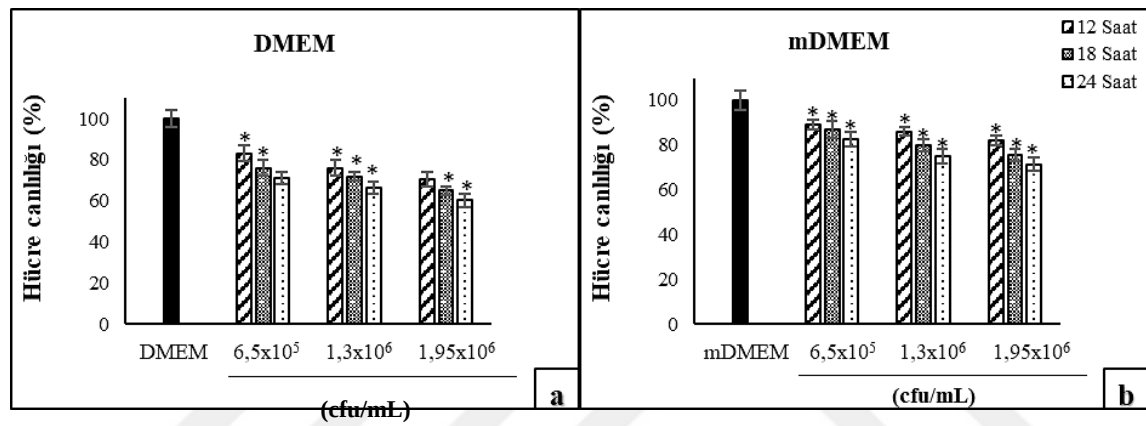
4.2.2. Canlı bakteri uygulamasının L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksite sonuçları

Çalışmada, L929 hücreleri 12, 18 ve 24 saat boyunca $6,5 \times 10^5$, $1,3 \times 10^6$ ve $1,9 \times 10^6$ cfu/mL canlı bakteri (*L. plantarum* GD2) ile muamele edilmiş olup, inkübasyon sonrası % hücre canlılığı değerleri tespit edilmiştir. Canlı bakteri ve sinbiyotik çalışmalarında, laktik asit bakterilerinin DMEM besiyerindeki inkübasyonu sonrası, bakterilerin üretebileceği laktik asit ve asit kaynaklı diğer metabolitlerden kaynaklanabilecek düşük pH değerinin hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olacağı düşünülmüştür. Bu amaçla DMEM uygulamalarına ek olarak, sodyum bikarbonat (NaHCO_3) içeren modifiye DMEM (mDMEM) ile hazırlanmış uygulamaların da toksisitesi değerlendirilmiş ve bu yönüyle iki uygulama karşılaştırılmıştır. Çalışmada, kontrol grubu olarak farklı iki gruba uygun olacak şekilde, yalnızca DMEM ve mDMEM uygulaması yapılan L929 hücreleri kullanılmıştır.

Canlı bakterilerin DMEM ile uygulamalarında, uygulama süresi ve uygulanan bakteri konsantrasyonunun artışına bağlı olarak besiyerindeki pH değerinin azaldığı tespit edilmiştir. Canlı bakteri uygulaması ile DMEM besiyerinde ölçülen pH aralığı ~4-4,6 olup, uygulamaların L929 hücrelerinde %16,8-39,8 hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2.a). pH değeri ~7-7,2 olarak ölçülen mDMEM besiyerindeki canlı bakteri uygulamalarının ise %10,8-28,5 hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2.b). Sonuç olarak, canlı bakterilerin mDMEM ile olan tüm uygulama koşullarında hücre ölümü önemli ölçüde azalmış olup, denenen tüm uygulama koşullarının mDMEM ortamında biyogüvenli olarak kullanımı mümkün görünmektedir. Ayrıca, mDMEM'in farklı tüm uygulamalarında $1,9 \times 10^6$ cfu/mL canlı bakterinin ve 24 saat uygulamalarının diğer uygulamalara göre daha yüksek hücre ölümüne neden olmasının, bakterilerin ürettikleri

metabolitlerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu uygulamalarda belirlenen toksisitenin dikkate değer olmadığı söylenebilir.

İstatistiksel olarak, canlı bakterinin her iki besiyerindeki tüm uygulamalarında azalan hücre canlılığı değerlerinin kontrole kıyasla anlamlı olduğu tespit edilmiştir (* $p<0,05$). Bununla birlikte, DMEM ve mDMEM ortamlarındaki uygulamaların hücre canlılığı sonuçları ikili karşılaştırıldığında, hücre canlılığı değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (* $p<0,05$).



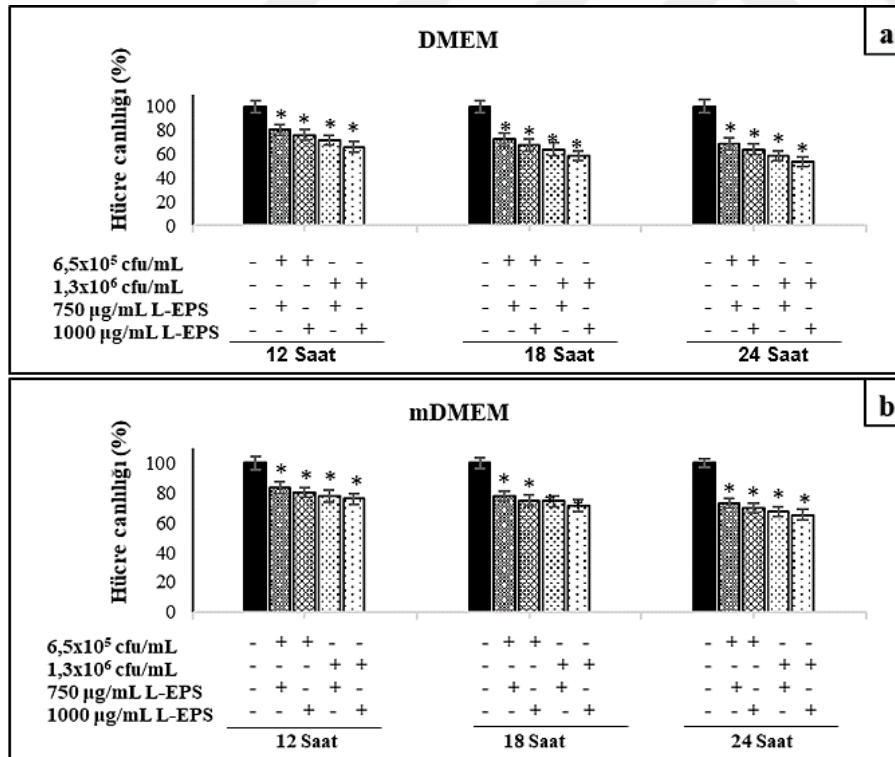
Şekil 4.2. Canlı bakteri uygulanmış L929 hücrelerinin % hücre canlılığı sonuçları. DMEM (a) ve mDMEM (b) uygulamaları, n: 3, OD $\pm$ SD

4.2.3. Sinbiyotik uygulamasının L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksikite sonuçları

Çalışmada, canlı bakteri ve L-EPS kombinasyonları sinbiyotik olarak hazırlanıp hücrelere 12, 18 ve 24 saat boyunca uygulanmıştır. Bir önceki çalışmamızda elde ettiğimiz hücre canlılığına sonuçlarına göre, hücre ölüm oranı düşük olan ve en yüksek etkiye sahip olabilecek bakteri miktarları sinbiyotik uygulamalarında $6,5 \times 10^5$ ve $1,3 \times 10^6$ cfu/mL olarak seçilmiştir. Çalışmada, belirlenen bakteri gruplarına, 750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS eklenerek farklı oranlarda oluşturulan sinbiyotik kombinasyonları kullanılmıştır. Sinbiyotik içeriğindeki bakterilerin üretebilecekleri laktik asit ve asit kaynaklı metabolitlerinden kaynaklanabilecek düşük pH değerine bağlı toksisiteyi de değerlendirmek amacıyla hem DMEM hem de mDMEM ile yapılmış uygulamalar kullanılmış ve iki uygulama bu yönüyle kıyaslanmıştır. Çalışmada, kontrol grubu olarak farklı iki gruba uygun olacak şekilde, yalnızca DMEM ve mDMEM uygulaması yapılan L929 hücreleri kullanılmıştır.

Sinbiyotiklerin, DMEM uygulamalarında %19,9-46,8 ve mDMEM uygulamalarında %16,4-34,6 arasında değişen oranlarda hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Artan sinbiyotik muamele süresi ve miktarlarında hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir. Ancak, sinbiyotiklerin mDMEM ile yapılan uygulamalarında hücre ölümü oranı DMEM uygulamalarına göre daha azdır. Bu durumun DMEM besiyerinde laktik asit bakterilerin ürettiği asidik metabolitlerden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak, sinbiyotiğin tüm uygulama koşullarında mDMEM ortamında biyogüvenli olarak kullanılabilmesi mümkün görünmektedir.

Tüm uygulamalarda artan sinbiyotik muamele süresi ve miktarına paralel olarak azalan hücre canlılığı değerleri her iki besiyeri için de istatistiksel olarak anlamlıdır (* $p < 0,05$). Ek olarak, sinbiyotiklerin DMEM ve mDMEM ortamlarındaki hücre canlılığı sonuçları ikili karşılaştırıldığında, hücre canlılığı değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (* $p < 0,05$).



Şekil 4.3. Sinbiyotik uygulanmış L929 hücrelerinin % hücre canlılığı sonuçları, DMEM (a) ve mDMEM (b) uygulamaları, n: 3, OD $\pm$ SD

Sonuçlarımız “etken maddelerin *in vitro* sitotoksitesi” kriterlerine göre (ISO, 2009) değerlendirildiğinde, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin tüm uygulamalarında %50’nin

altında hücre ölüm oranı olan uygulama dozu ve süreleri biyogüvenli olarak kabul edilmiştir. Buna göre, devam eden çalışmalarda L-EPS'nin; 0-1000 µg/mL ve 0-36 saat, canlı bakterinin; $6,5 \times 10^5$ cfu/mL ve 0-24 saat, sinbiyotiğin; $6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ve 750 µg/mL L-EPS kombinasyonu şeklinde 0-24 saat aralığında L929 hücrelerine uygulanması uygun görülmüştür.

4.3. TNF- α ile İndüklenen L929 Hücrelerinde L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotiğin Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

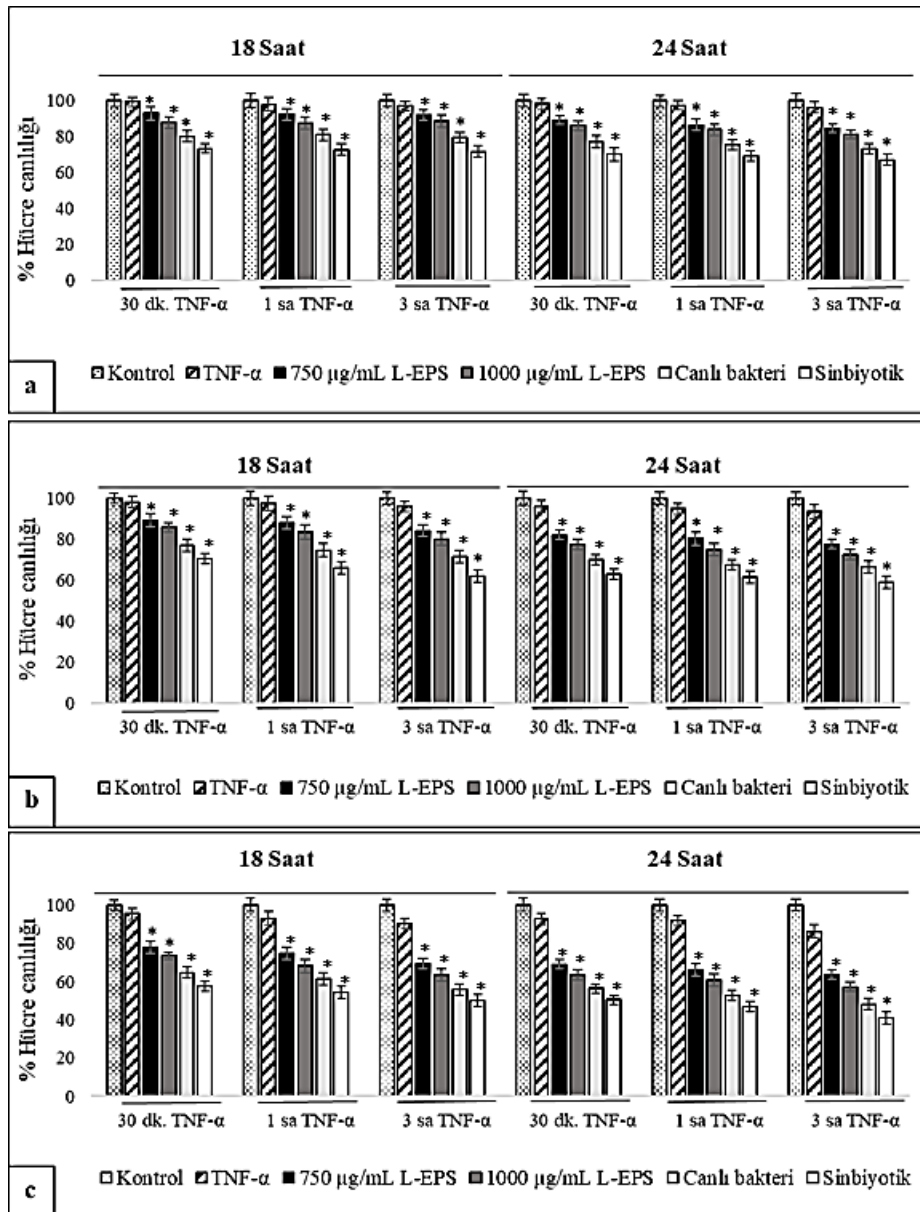
Yapılan tez çalışması kapsamında; L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin yara iyileşmesinin inflamasyon fazı üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmış olup, bu çalışmada fibroblast aracılı *in vitro* inflamasyon modelinin oluşturulması için L929 hücrelerinde inflamasyonun indüklenebileceği en yüksek, toksisitesi düşük olan TNF- α konsantrasyon ve uygulama süresinin belirlenmesi amacıyla, TNF- α 'nın farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerindeki hücre canlılıkları MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

Çalışmada, 10, 20 ve 50 ng/mL TNF- α ; 30 dk., 1 saat ve 3 saat olacak şekilde L929 hücrelerine uygulanmıştır. Oluşturulan *in vitro* inflamasyon modelinin ardından çalışmada kullanılacak uygulama grupları olarak, düşük sitotoksik etkileri bir önceki çalışmada tespit edilen 750 ve 1000 µg/mL L-EPS; $6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri; $6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ve 750 µg/mL L-EPS kombinasyonu olarak sinbiyotiğin 18 ve 24 saat uygulamaları seçilmiştir. Çalışmamızda, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarında daha düşük toksisiteye sahip olan mDMEM uygulamaları seçilmiştir. Kontrol grubu olarak yalnızca DMEM ve mDMEM uygulaması yapılan L929 hücreleri kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.4'te verilmiştir.

Yalnızca TNF- α uygulanan tüm kontrol gruplarında dikkate değer bir hücre ölümünün olmaması ile birlikte, 50 ng/mL ve 3 saat TNF- α ile indüklenmiş hücrelerde ölüm oranının diğer uygulamalara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde, TNF- α ile indüklenmiş hücrelere uygulanan L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin de tüm denemelerde en yüksek ölüm oranının 50 ng/mL ve 3 saat TNF- α uygulamalarında olduğu dikkat çekmiştir. Bu durum özellikle L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin 24 saat uygulandığı gruplarda daha belirgin şekilde öne çıkmıştır. Ölüm oranlarının toksisite açısından daha tolere edilebilir düzeyde olması sebebi ile devam eden çalışmalarda L929 fibroblast hücrelerinde inflamasyonun indüklenmesinin denemelerinde TNF- α 'nın 10 ve 20 ng/mL

konsantrasyonlarının 30 dk., 1 saat ve 3 saat uygulamaları seçilmiştir. Uygulama gruplarının % hücre ölümü değer aralıkları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerine uygulanan L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik elde edilen toksite değerlerin TNF- α uygulanmış kontrol grubuna göre anlamlı olduğu saptanmıştır (* $p<0,05$). 18 ve 24 saat uygulamaları ikili olarak karşılaştırıldığında ise değişen uygulama sürelerindeki hücre canlılığı değerlerindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (* $p<0,05$).



Şekil 4.4. TNF- α ile indüklenen L929 hücrelerinde L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları sonucu elde edilen % hücre canlılığı sonuçları, (a) 10 ng/mL, (b) 20 ng/mL ve (c) 50 ng/mL TNF- α ile indüklenen L929 hücreleri, n: 3, OD $\pm$ SD

Çizelge 4.1. TNF- α ile indüklenen L929 hücrelerinde L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları sonucu elde edilen en düşük ve en yüksek % hücre ölümü değerleri, n: 3, OD $\pm$ SD

Uygulamalar	% Hücre ölümü (0-3 saat TNF- α uygulaması)					
	10 ng/mL		20 ng/mL		50 ng/mL	
	En düşük % ölüm	En yüksek % ölüm	En düşük % ölüm	En yüksek % ölüm	En düşük % ölüm	En yüksek % ölüm
TNF- α	0,8 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 1,1	1,8 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 2,0	4,6 $\pm$ 1,4	13,8 $\pm$ 2,2
L-EPS (750 μ g/mL)	6,9 $\pm$ 1,8	15,3 $\pm$ 2,0	11 $\pm$ 1,9	22,4 $\pm$ 2,4	22 $\pm$ 3,1	36,3 $\pm$ 3,9
L-EPS (1000 μ g/mL)	12 $\pm$ 2,0	18,8 $\pm$ 3,1	14,2 $\pm$ 1,9	27,4 $\pm$ 3,0	26,6 $\pm$ 2,8	42,9 $\pm$ 4,0
Canlı bakteri (6,5x10 ⁵ cfu/mL)	19,7 $\pm$ 2,2	26,8 $\pm$ 3,0	23 $\pm$ 2,9	33,6 $\pm$ 3,8	35,3 $\pm$ 2,9	51,9 $\pm$ 4,5
Sinbiyotik (6,5x10 ⁵ cfu/mL canlı bakteri + 750 μ g/mL L-EPS)	26,6 $\pm$ 2,4	32,9 $\pm$ 3,4	29,5 $\pm$ 3,0	39 $\pm$ 3,1	42,3 $\pm$ 3,0	59 $\pm$ 3,7

4.4. *In Vitro* Yara Modeli (Scratch Assay) ile Belirlenen Yara İyileşmesi Sonuçları

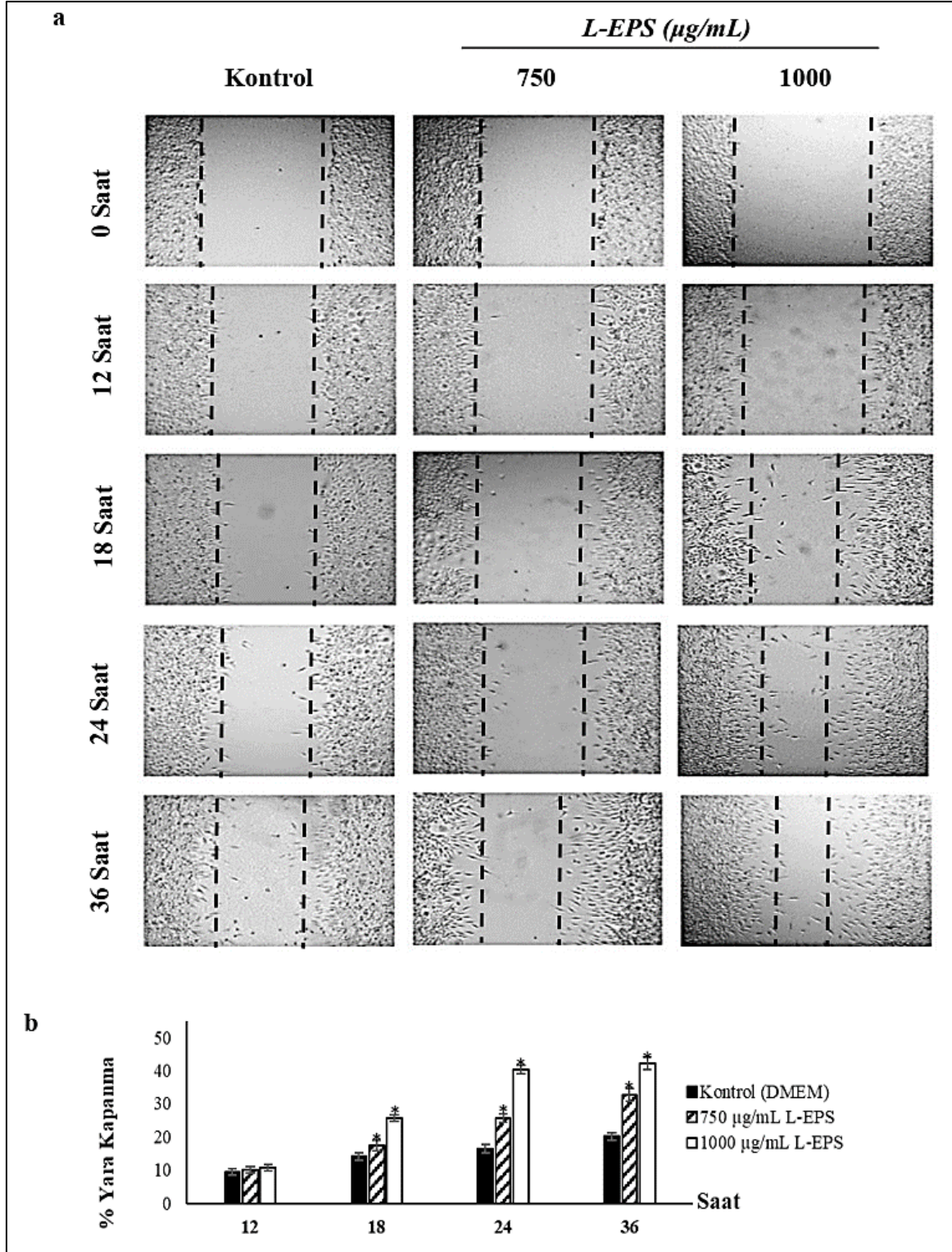
Fibroblast migrasyonu, yara iyileşmesinin proliferasyon fazının en önemli aşamalarından biri olmakla birlikte, fibroblastların yara alanına göçü yara kapanması için kritiktir. Bu sebeple çalışmamızda, L929 fibroblast hücrelerinde oluşturulan *in vitro* yara modelinde L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik fibroblast migrasyonunu indükleyerek yara kapanma oranına bağlı olarak uygulamaların yara kapanmasındaki etkisi ile etken uygulama süresi ve/veya uygulama dozlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Laktik asit bakterilerin üretebilecekleri asit metabolitlerinden kaynaklanabilecek düşük pH değerinin hücre migrasyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla hem DMEM hem de mDMEM ile yapılmış uygulamalar kullanılmış ve iki uygulama bu yönüyle karşılaştırılmıştır. Çalışmada, kontrol grubu olarak uygulama gruplarına uygun olacak şekilde, yalnızca DMEM ve mDMEM uygulaması yapılan L929 hücreleri kullanılmıştır.

4.4.1. L-EPS'nin *in vitro* yara iyileşmesi üzerine etkisinin belirlenmesi

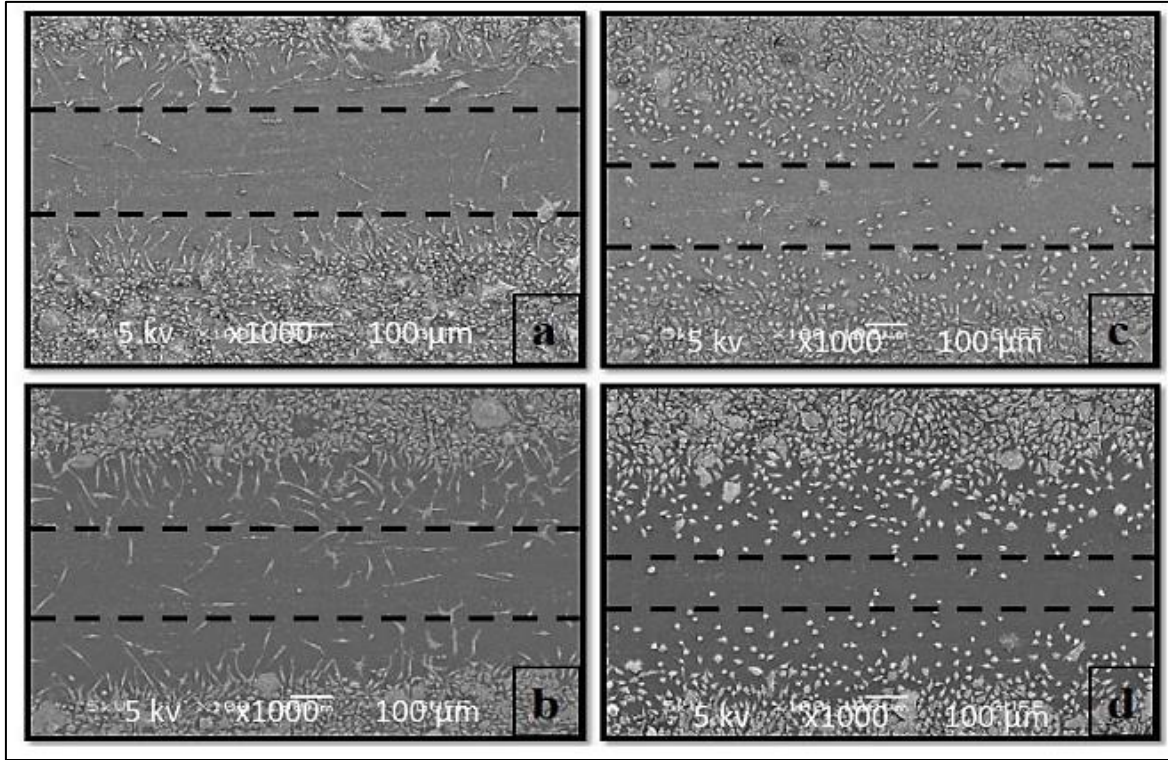
Bu çalışmada, L929 fibroblast hücrelerinde oluşturulan *in vitro* yara modeline *L. plantarum* GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin düşük sitotoksik etkileri belirlenmiş 750 ve 1000 μ g/mL konsantrasyonlarda 12, 18, 24 ve 36 saat uygulamaları sonucu hücrelerin migrasyonuna bağlı yara kapanma oranları belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.5'te verilmiştir.

Çalışmamızda, L-EPS'nin farklı konsantrasyon ve sürelerde %10,1-42,1 arasında değişen oranlarda *in vitro* yara kapanmasını teşvik ettiği belirlenmiştir. *In vitro* yara modelinde hücre migrasyonuna bağlı en iyi yara kapanması 750 µg/mL L-EPS'nin 36 saat uygulanması (%32,7) ile 1000 µg/mL L-EPS'nin 24 saat (%40,4) ve 36 saat (%42,1) uygulanmasında gözlenmiştir. Bununla birlikte, artan uygulama sürelerine bağlı olarak 1000 µg/mL L-EPS'nin 750 µg/mL L-EPS'ye göre fibroblast migrasyonunu daha fazla indüklediği ve yarayı daha hızlı kapatma etkisine sahip olduğu belirlenmiştir. 12 saat L-EPS uygulamalarında ise kayda değer bir değişim gözlenmemiştir. Ayrıca, düşük sitotoksik etkiye ve en iyi yara kapatma oranına sahip olan 1000 µg/mL L-EPS uygulama gruplarının (18 ve 24 saat) fibroblastları indüklemesi sonucu göç eden hücrelerin yara bölgesindeki görüntüleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gösterilmiştir (Şekil 4.6). SEM sonuçları, *in vitro* yara kapanma sonuçlarını doğrulamıştır.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, her iki L-EPS konsantrasyonun 12 saat uygulamasının yara kapanma üzerinde istatistiksel olarak etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Artan uygulama süresine paralel olarak, 750 µg/mL L-EPS'nin yara kapanma üzerindeki etkisinin artışı istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur ($*p<0,05$). 1000 µg/mL L-EPS'nin ise 18 ve 24 saat uygulama sürelerindeki artan yara kapanma oranlarının anlamlı olduğu ($*p<0,05$), ancak, 24 ve 36 saat uygulamaları arasında istatistiksel fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). 750 ve 1000 µg/mL L-EPS sonuçları ikili olarak karşılaştırıldığında ise 12 saat uygulamalarının yara kapanma değerlerinde istatistiksel olarak fark olmadığı belirlenmiş olup ($p>0,05$), 18, 24 ve 36 saat uygulamalarında her iki konsantrasyondaki yara kapanma değerlerindeki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($*p<0,05$).



Şekil 4.5. L-EPS uygulanmış L929 hücrelerinde *in vitro* yara kapanma sonuçları, (a) yara kapanma mikrografları (4x), (b) % yara kapanma değerleri, n: 5, OD $\pm$ SD



Şekil 4.6. L-EPS uygulanmış L929 hücrelerinde *in vitro* yara kapanmasının SEM görüntüleri (5 kv, 100x). (a) 18 saat DMEM uygulaması (kontrol grubu), (b) 24 saat DMEM uygulaması (kontrol grubu), (c) 18 saat 1000 µg/mL L-EPS uygulaması, (d) 24 saat 1000 µg/mL L-EPS uygulaması

4.4.2. Canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamasının *in vitro* yara iyileşmesi üzerine etkisinin belirlenmesi

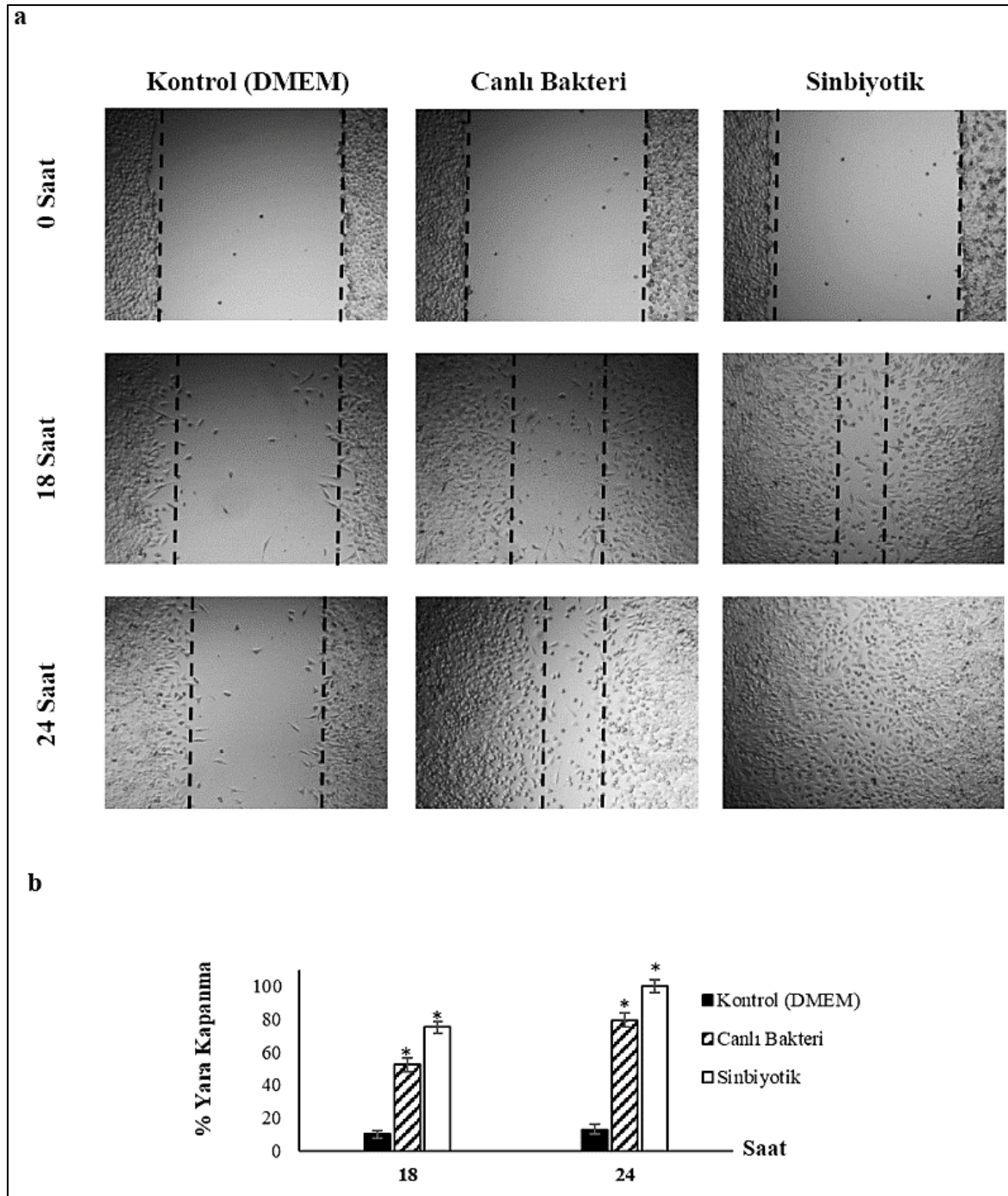
Bu çalışmada, L929 fibroblast hücrelerinde oluşturulan *in vitro* yara modelinde, canlı bakteri ve sinbiyotiğin 18 ve 24 saat uygulamaları sonucu hücrelerin migrasyonuna bağlı yara kapanma oranları belirlenmiştir. Çalışmada, düşük sitotoksik etkilerinden dolayı hem DMEM hem de mDMEM’de hazırlanan $6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ve $6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ile 750 µg/mL L-EPS kombinasyonu sinbiyotik uygulamaları olarak seçilmiştir.

In vitro yara analizi sonuçlarında, hem DMEM hem de mDMEM’de hazırlanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin artan sürelerde kontrol grubuna kıyasla fibroblast migrasyonunu indükledikleri ve yara kapanmasını hızlandırdıkları tespit edilmiştir. DMEM ile yapılan uygulama sonuçları, canlı bakterinin L929 fibroblast hücrelerinde 18 saatte %52,2 ve 24 saatte %79,4; sinbiyotiğin 18 saatte %75 ve 24 saatte %100 yara kapanmasını teşvik ettiğini göstermiştir (Şekil 4.7). mDMEM uygulama sonuçlarına göre ise canlı bakterinin 18 saatte %48 ve 24 saatte %58; sinbiyotiğin 18 saatte %49,6 ve 24 saatte %65 yara kapanmasını

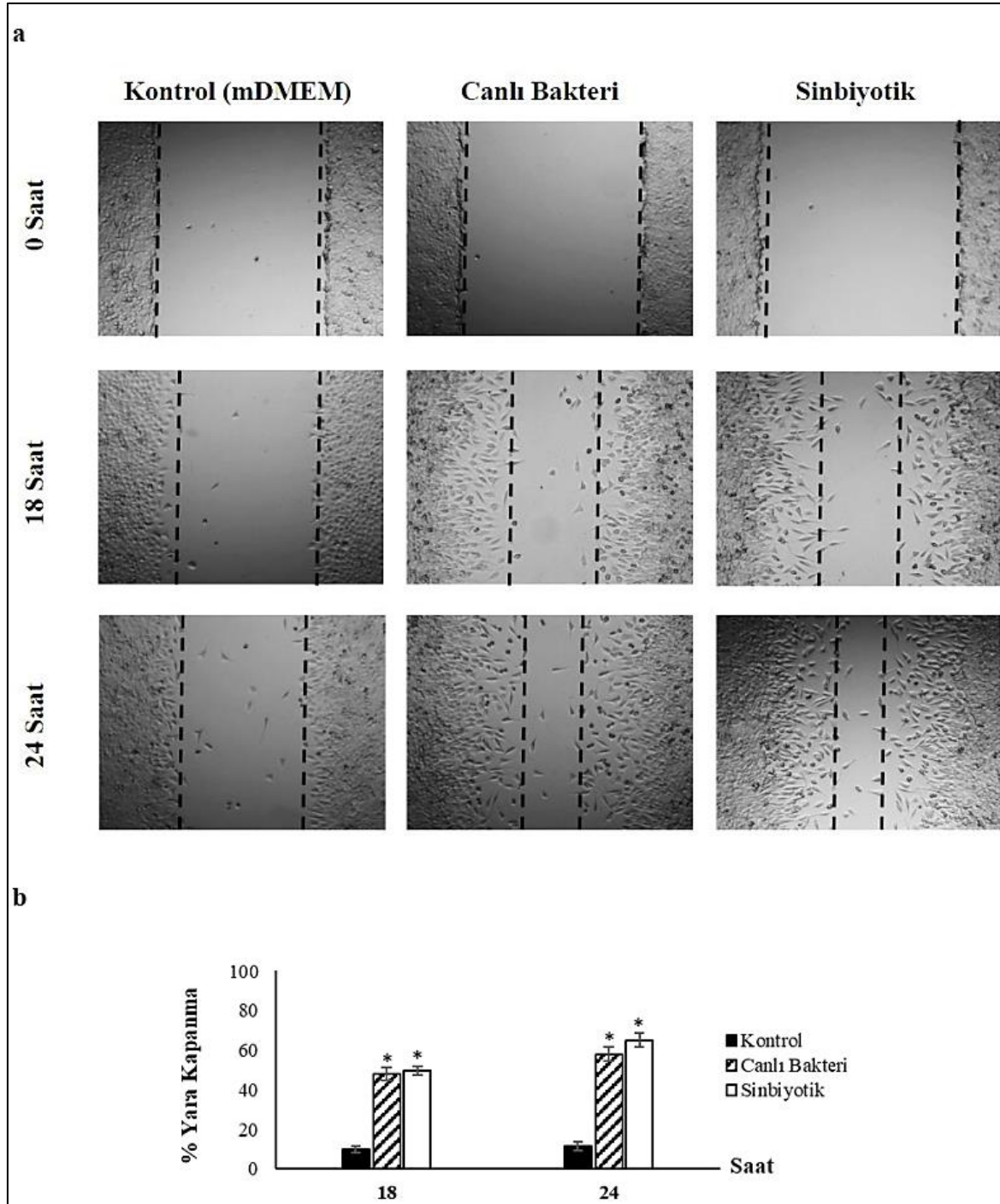
indüklediği saptanmıştır (Şekil 4.8). Yapılan çalışma kapsamında, DMEM ile hazırlanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin mDMEM uygulamalarına göre daha yüksek yara kapatma etkisine sahip olduğu ve tüm uygulama koşullarında canlı bakteri ve sinbiyotiğin 24 saat uygulamasının 18 saate kıyasla yara iyileşmesinde daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, tüm uygulama koşullarında sinbiyotiğin canlı bakteriye kıyasla daha yüksek yara kapatma etkisine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, tüm uygulama koşullarında canlı bakteri ve sinbiyotiğin yara kapatma üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($*p<0,05$). Uygulamaların 18 ve 24 saat yara kapatma değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($*p<0,05$). Tüm uygulama koşullarında, canlı bakteri ve sinbiyotik muamelerinin yara kapanması üzerindeki etkileri istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur ($*p<0,05$). Ayrıca, DMEM uygulamalarındaki canlı bakteri ve sinbiyotiğin yara kapanma sonuçları mDMEM uygulamaları ile kıyaslandığında, yara kapanma değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($*p<0,05$).

L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının *in vitro* yara kapanması üzerine etkileri genel olarak değerlendirildiğinde, hücre ölümünün yüksek olarak belirlendiği uygulamalarda, sitotoksosite açısından hücre migrasyonunun çok fazla etkilenmediği dikkat çekmiştir. 1000 µg/mL L-EPS'nin 24 saat ve 36 saat uygulamalarının sonuçları birbirine yakın olup, bu uygulamaların L-EPS grupları içerisinde en iyi yara kapatmasını gösterirken, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarında ikinci sırada en iyi yara kapanması mDMEM ortamında 24 saat uygulamalarında gözlenmiştir. En iyi yara kapanması ise DMEM ortamında 24 saat canlı bakteri (%79,4 kapatma) ve sinbiyotik (%100 kapatma) uygulamalarında gözlenmiştir. Bununla birlikte, tüm denemelerde en iyi migrasyonun sinbiyotik uygulamalarında olduğu görülmektedir. DMEM ortamında pH'ya bağlı hücre ölüm oranının yüksek olmasına rağmen, ölüm oranının toksisite açısından tolere edilebilir olmasına ve yara kapanmasını daha fazla teşvik etmesine ek olarak, asidik ortamın yara iyileşme sürecinde özellikle yara enfeksiyonunu önleme açısından önemli katkısı olma ihtimali de göz ardı edilmemesi gereken önemli bir husustur.



Şekil 4.7. DMEM besiyerinde uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin L929 hücrelerinde *in vitro* yara kapanma sonuçları, (a) yara kapanma mikrogramları (4x), (b) % yara kapanma değerleri, n: 5, OD $\pm$ SD



Şekil 4.8. mDMEM besiyerinde uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin L929 hücrelerinde *in vitro* yara kapanma sonuçları, (a) yara kapanma mikroagrafları (4x), (b) % yara kapanma değerleri, n: 5, OD $\pm$ SD

4.5. L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotiğin L929 Fibroblast Hücrelerinde Kollajen ve Fibronektin Üzerine Etkisi

Kollajen ve fibronektin, ekstrasellüler matriksin (ECM) önemli bileşenlerindendir. Fibroblastların, yara iyileşmesi için önemli olan kollajen, fibronektin ve diğer ECM

bileşenlerini sentezlemesi, yaralanma sonrası oluşan doku boşluğunun kapatılması ve yeni bir bağ doku matriksinin oluşması açısından oldukça önemlidir. Bu bilgiler doğrultusunda; L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının kollajen ve fibronektin gen ekspresyonunu ve sentezini indüklemesi, yara iyileşmesinde L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik tedavi yaklaşımlarının kullanılabilirliğini göstermiş olması bakımından önem arz etmektedir.

Çalışmamızda, yukarıda belirtilen bilgiler doğrultusunda, L929 hücrelerine uygulanan L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının kollajen-I-alfa-I (COL1A1) ve fibronektin (FN) üzerindeki indükleyici etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Tüm denemelerde, COL1A1 ve FN düzeyleri ELISA, mRNA ekspresyon seviyeleri ise qRT-PCR ile tespit edilmiştir.

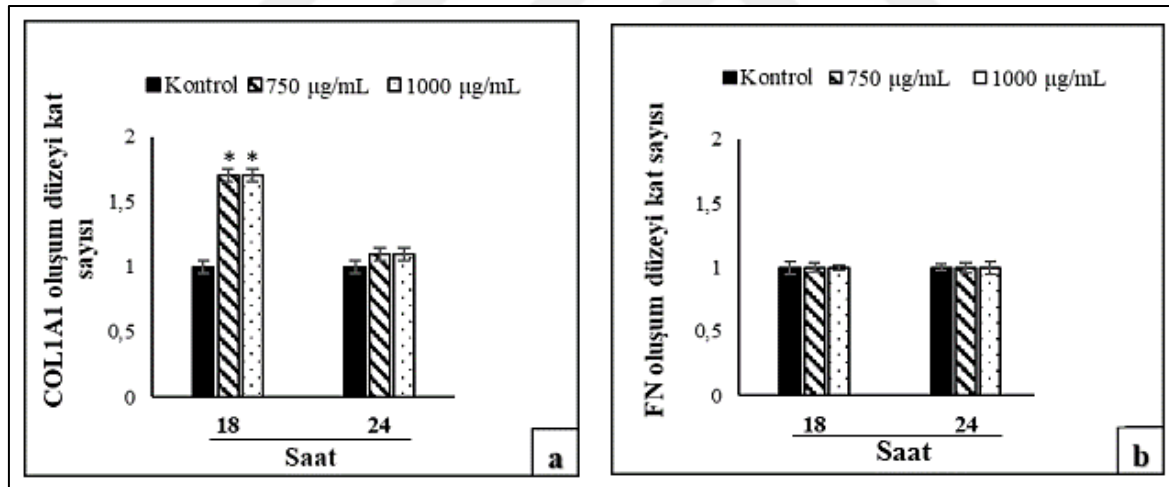
Bu çalışmada kullanılacak olan uygulama dozları ve inkübasyon süreleri, MTT sonuçlarında düşük toksik etkiye sahip ve *in vitro* yara analizinde fibroblast migrasyonunu indüklemede etkin olan denemelere göre seçilmiş olup, 750 ve 1000 µg/mL L-EPS'nin 18 ve 24 saat; canlı bakterinin $6,5 \times 10^5$ cfu/mL, 24 saat; sinbiyotiğin $6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ile 750 µg/mL L-EPS kombinasyonu şeklinde 24 saat olarak kullanılması uygun görülmüştür. Çalışmada, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarında, pH değişimine bağlı kollajen ve fibronektin düzeylerinin ve gen ekspresyonlarının kıyaslanması amacıyla DMEM ve mDMEM besiyerleri kullanılmış olup, uygulamalar bu yönleri ile karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu olarak, uygulama gruplarına uygun olacak şekilde sadece DMEM ve mDMEM uygulaması yapılan L929 hücreleri kullanılmıştır.

4.5.1. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının COL1A1 ve FN oluşum düzeyleri üzerine etkisi

Yapılan çalışmada, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin L929 hücrelerinde COL1A1 ve FN oluşum düzeyi üzerine etkisi ELISA testi ile incelenmiştir. Çalışmada kullanılan ELISA kitlerinin çalışma prensibi, mikropilaya kuyularındaki biyotin ile konjuge edilmiş COL1A1 veya FN'ye spesifik antikorların, horse radish peroksidaz ile konjuge edilmiş avidin ile arasındaki bağlanmaya dayanır. Substrat ve durdurma solüsyonu eklenen kuyucuklarda, antijen/antikor/enzim kompleksinin oluşumuna bağlı kolorometrik değişim gözlemlenir. Kolorometrik değişimlere bağlı olarak COL1A1 ve FN değerleri spektral olarak ölçülüp hücre kültürü besiyerindeki konsantrasyonları hesaplanır.

COL1A1 oluşum düzeyi 750 ve 1000 µg/mL L-EPS uygulamaları ile eşit miktarda artmış olup, her iki konsantrasyonda da kontrole kıyasla 0,7 kat daha fazla COL1A1 oluşumu tespit edilmiştir. Her iki L-EPS konsantrasyonunun 24 saat uygulanması sonucunda COL1A1 oluşumunda herhangi bir değişim gözlenmemiştir. FN oluşum düzeyleri incelendiğinde ise tüm uygulama koşullarında L-EPS'nin FN oluşumuna etki etmediği belirlenmiştir (Şekil 4.9).

İstatistiksel analizlere göre, her iki L-EPS konsantrasyonunun 18 saat uygulamalarının COL1A1 oluşum düzeyi üzerindeki etkisi anlamlı bulunmuş olup ($p<0,05$), 24 saat uygulamalarının COL1A1 oluşum düzeyi üzerinde anlamlı bir etkisi yoktur ($p>0,05$). 18 saat L-EPS uygulamalarının konsantrasyon miktarındaki değişimin, COL1A1 oluşum düzeyi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Ayrıca, tüm uygulama koşullarında L-EPS'nin, FN oluşum düzeyi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi yoktur ($p>0,05$).

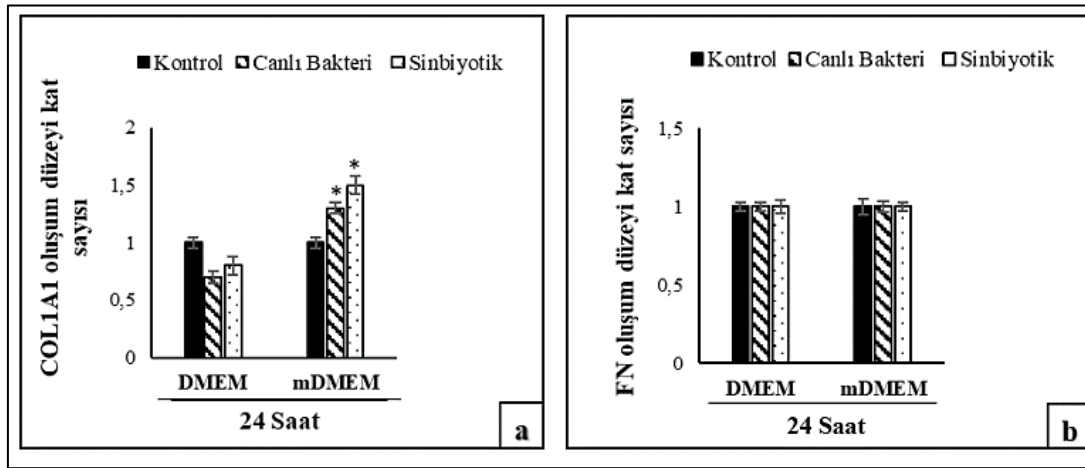


Şekil 4.9. L929 hücrelerine uygulanan L-EPS'nin COL1A1 ve FN oluşum düzeyi üzerindeki etkisi. (a) COL1A1 sonuçları, (b) FN sonuçları, n: 3, OD ± SD

Canlı bakteri ve sinbiyotiğin, DMEM ile yapılan uygulamalarında COL1A1 oluşum düzeyinde, kontrol grubuna kıyasla azalma gözlenmiş olup, mDMEM uygulamalarında COL1A1 oluşum düzeyini kontrol grubuna göre canlı bakteri uygulamasının 0,3 kat; sinbiyotik uygulamasının ise 0,5 kat daha fazla arttığı tespit edilmiştir. COL1A1 oluşum düzeyinin, DMEM besiyeri ile yapılan uygulamalar ile azalıp, mDMEM besiyeri ile yapılan uygulamalarda artmasının sebebinin asidik ortam pH'sı olduğu düşünülmektedir. Tüm uygulama koşullarında, canlı bakteri ve sinbiyotiğin FN oluşum düzeyi üzerinde L-EPS

uygulamalarında olduğu gibi herhangi bir değişim tespit edilmemiştir. Canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları sonucu elde edilen COL1A1 ve FN oluşum düzeyleri Şekil 4.10'de verilmiştir.

Canlı bakteri ve sinbiyotiğin COL1A1 oluşum düzeyi üzerindeki etkisi istatistiksel olarak bulunmuştur ($*p<0,05$). Tüm uygulama koşullarında ise canlı bakteri ve sinbiyotiğin FN oluşum düzeyi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi yoktur ($p>0,05$).



Şekil 4.10. DMEM ve mDMEM besiyerinde uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin COL1A1 ve FN oluşum düzeyi üzerindeki etkileri. (a) COL1A1 sonuçları, (b) FN sonuçları, n: 3, OD $\pm$ SD

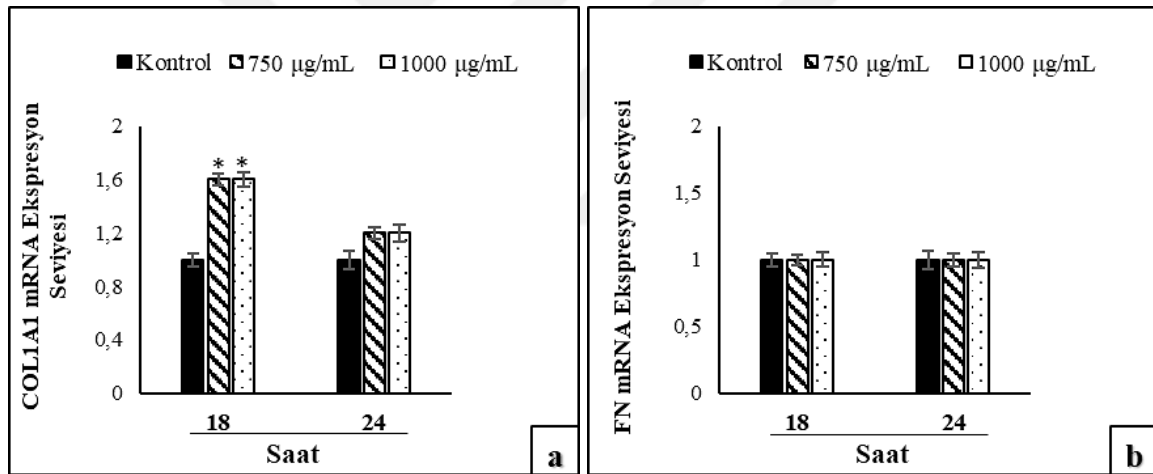
4.5.2. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının COL1A1 ve FN mRNA ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi

Yapılan çalışmada, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin L929 hücrelerinde COL1A1 ve FN'nin mRNA'ya göre gen ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi qRT-PCR ile incelenmiştir.

L-EPS uygulamasına bağlı elde ettiğimiz COL1A1 ve FN mRNA sonuçları Şekil 4.11'de verilmiştir. Sonuçlarımıza göre, 750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS'nin 18 saat uygulanmasında COL1A1 mRNA ekspresyonu eşit düzeyde artmış olup, kontrol grubuna kıyasla 0,6 kat daha fazla ekspresyon artışı gözlenmiştir. Her iki L-EPS konsantrasyonunun 24 saat uygulamalarında, COL1A1 mRNA ekspresyonu 18 saat uygulamalarında olduğu gibi eşit miktarda artmış olup (kontrol grubuna kıyasla 0,2 kat daha fazla), bu artışın dikkate değer olmadığı tespit edilmiştir. Sonuçlarımız, 18 saat L-EPS uygulamalarının COL1A1 mRNA ekspresyonu üzerinde daha etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca L-EPS konsantrasyon

miktarındaki değişimin COL1A1 mRNA ekspresyonu üzerinde farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir. FN mRNA ekspresyon sonuçları incelendiğinde ise tüm uygulama koşullarında L-EPS'nin FN ekspresyonuna etki etmediği saptanmıştır.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, her iki konsantrasyondaki L-EPS'nin 18 saat uygulamalarının, COL1A1 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkilerinin anlamlı olduğu tespit edilmiş olup ($p < 0,05$), konsantrasyon miktarındaki değişme göre COL1A1 mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$). Her iki konsantrasyondaki L-EPS'nin 24 saat uygulamalarının, COL1A1 gen ekspresyonu üzerinde etkili olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır ($p > 0,05$). Ayrıca, L-EPS'nin tüm uygulama koşullarında FN mRNA ekspresyonu üzerinde etkisinin olmadığı istatistiksel olarak tespit edilmiştir ($p > 0,05$).

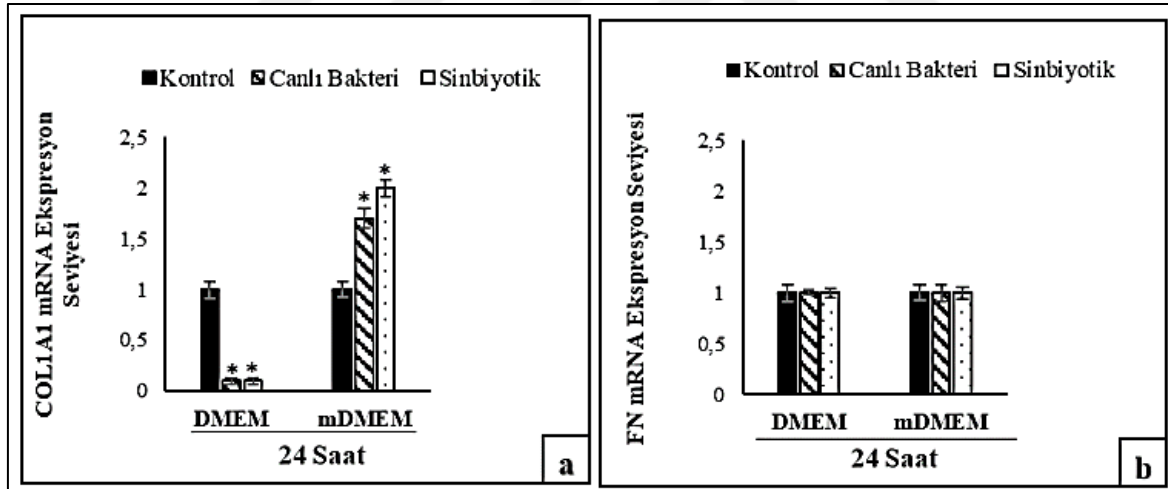


Şekil 4.11. 750 ve 1000 µg/mL L-EPS'nin 18 ve 24 saat uygulamalarının L929 hücrelerinde COL1A1 ve FN mRNA ekspresyonları üzerindeki etkisi. (a) COL1A1 sonuçları, (b) FN sonuçları, n: 3, OD $\pm$ SD

Canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları ile elde ettiğimiz COL1A1 ve FN mRNA ekspresyon sonuçları Şekil 4.12'de verilmiştir. Çalışmada, DMEM ile yapılan canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarında COL1A1 gen ekspresyonunun, kontrol grubuna kıyasla azaldığı gözlenmiştir. mDMEM ile yapılan uygulamalarda, canlı bakteri muamelesiyle COL1A1 mRNA ekspresyon seviyesi kontrole göre 1,7 kata yükselirken, kontrol grubuna göre 0,7 katlık bir artış belirlenmiştir. Sinbiyotiğin mDMEM uygulamasında ise COL1A1 mRNA ekspresyonu 2 kata yükselirken, kontrole kıyasla 1 kat artış tespit edilmiştir. COL1A1 mRNA ekspresyonunun DMEM besiyeri ile yapılan uygulamalar ile azalması,

laktik asit bakterilerinin uygulama koşullarında canlılığını sürdürmesine bağlı besiyerindeki düşük pH'nın L929 hücrelerini ölüme götürmesi ile ilişkilendirilebilir. pH değerinin nötralize edildiği mDMEM besiyerinde L929 hücrelerinde artan COL1A1 gen ekspresyonu bu görüşümüzü desteklemektedir. Bununla birlikte, canlı bakteri ve sinbiyotiğin tüm uygulama koşullarında FN gen ekspresyonu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, DMEM ortamındaki canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları ile COL1A1 mRNA ekspresyonundaki azalan ve mDMEM uygulamalarındaki artan ekspresyon miktarları kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($*p<0,05$). Bununla birlikte, mDMEM ortamında uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin, COL1A1 mRNA ekspresyonundaki artış miktarlarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($*p<0,05$). Ayrıca, tüm uygulama koşullarında canlı bakteri ve sinbiyotiğin FN gen ekspresyonu üzerinde etkili olmadığı istatistiksel olarak saptanmıştır ($p>0,05$)



Şekil 4.12. DMEM ve mDMEM besiyerinde uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin COL1A1 ve FN mRNA ekspresyonları üzerindeki etkileri. (a) COL1A1 sonuçları, (b) FN sonuçları, n: 3, OD $\pm$ SD

Genel olarak değerlendirdiğimizde, L-EPS sonuçlarında olduğu gibi, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarında sadece COL1A1 gen ekspresyon düzeyi etkilenmiş, FN gen ekspresyon düzeyinde herhangi bir etki gözlenmemiştir. Ayrıca, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları ile elde ettiğimiz COL1A1 ve FN mRNA ekspresyonu sonuçları, COL1A1 ve FN ELISA sonuçlarını doğrulamıştır.

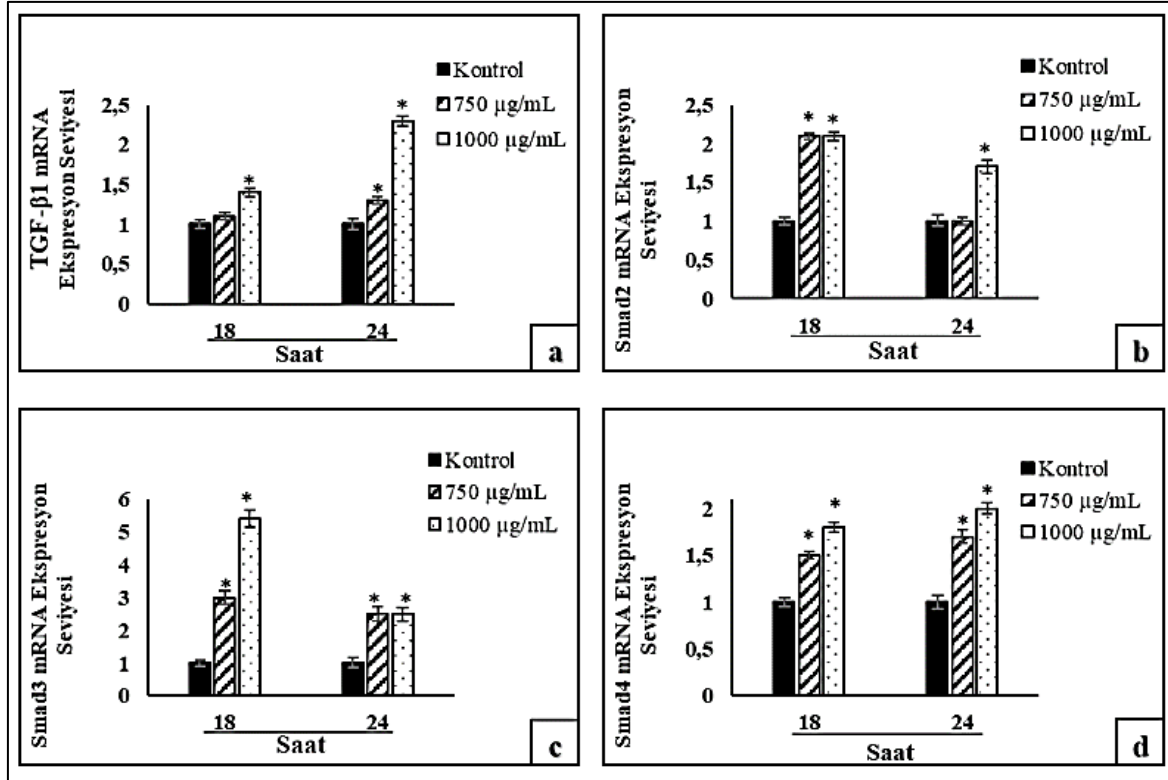
4.6. L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotiğin TGFβ-1/Smad Sinyalizasyonu Üzerindeki Modölatör Etkilerinin Belirlenmesi

Yara iyileşmesinin majör sinyal yollarından biri olan TGFβ-1/Smad sinyal yolağı; TGF-β reseptörlerinin aktivasyonu ile Smad2/3 dimerinin (R-Smadlar) fosforile olması ve bu dimerin Smad4 (Co-Smad) ile birleşerek nukleusa göç etmesi sonucu hücre proliferasyonu, migrasyonu ve kollajen sentezinin indüklenerek yara iyileşme sürecinin tetiklenmesinde fonksiyonel rol oynar. Bu bilgiler doğrultusunda L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının, TGF-β1/Smad sinyal yolağı üzerinde oluşturduğu etkinin belirlenmesi, probiyotik kaynaklı uygulamaların bu sinyal yolağı aracılığıyla yara iyileşmesinde etkin olabileceklerinin gösterilmesi bakımından oldukça önemlidir. Bu çalışmada, probiyotik kaynaklı uygulamaların yapıldığı L929 hücrelerinde TGFβ-1/Smad sinyal yolağında bulunan TGF-β1, Smad2, Smad3 ve Smad4 genlerinin ekspresyon seviyelerinin qRT-PCR ile mRNA düzeyinde belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan uygulama grupları, düşük sitotoksik etkiye sahip ve *in vitro* yara analizi sonuçlarına göre fibroblast migrasyonunu ile COL1A1 gen ekspresyonunu ve üretimini indükleyici etkilerine göre seçilmiştir. Bu doğrultuda uygulamaların; 18 ve 24 saat, 750 ve 1000 µg/mL L-EPS; 24 saat canlı bakteri ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL) ve 24 saat sinbiyotik ($6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ve 750 µg/mL L-EPS kombinasyonu) uygulamaları olacak şekilde yapılması uygun görülmüştür. Laktik asit bakterilerinin üretebileceği asidik metabolitlerin oluşturduğu düşük pH değerindeki ekstrasellüler hücre ortamının, TGF-β1/Smad sinyal yolağı üzerindeki etkisinin incelenebilmesi amacıyla DMEM ile yapılan uygulamalara ek olarak, mDMEM besiyeri ile yapılan uygulamalarla da çalışılmıştır. Çalışmada kontrol grubu olarak, uygulama gruplarına uygun olacak şekilde DMEM veya mDMEM uygulaması yapılan L929 hücreleri kullanılmıştır.

L-EPS uygulaması sonucu, L929 fibroblast hücrelerinde TGF-β1 gen ekspresyonunu en fazla arttıran L-EPS konsantrasyonunun 1000 µg/mL olduğu belirlenmiştir. TGF-β1 mRNA ekspresyon seviyesinin 1000 µg/mL L-EPS'nin 18 saat uygulaması ile 1,4'e yükseldiği (kontrole göre 0,4 kat artış) ve 24 saat uygulaması ile 2,3'e yükseldiği (kontrole göre 1,3 kat artış) tespit edilmiş olup, tüm uygulamalarda TGF-β1 gen ekspresyon düzeyini en fazla arttıran uygulamanın 24 saat 1000 µg/mL L-EPS olduğu saptanmıştır. 18 saatte eşit sonuç veren 750 ve 1000 µg/mL L-EPS uygulamaları Smad2 mRNA ekspresyon düzeyini arttıran en iyi sonuçlar olarak öne çıkmıştır. Bu uygulamalarda Smad2 mRNA ekspresyon düzeyi

2,1 olarak belirlenirken, kontrole göre 1,1 kat artış tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Smad3 gen ekspresyonu üzerine en iyi etkiyi 18 saat L-EPS uygulamalarının gösterdiği saptanmış olup, bu inkübasyon süresinde Smad3 mRNA ekspresyon düzeyinin; 750 µg/mL L-EPS uygulaması ile 3 (kontrole göre 2 kat artış) ve 1000 µg/mL L-EPS uygulaması ile 5,4 (kontrole göre 4,4 kat artış) olduğu gözlemlenmiştir. Smad4 geni üzerinde her iki konsantrasyondaki L-EPS'nin 18 ve 24 saat uygulamaları benzer sonuç göstermekle birlikte, artan L-EPS konsantrasyonu ile Smad4 mRNA ekspresyon düzeyinde artış saptanmıştır. En iyi sonucu veren 24 saat inkübasyon süresinde Smad4 mRNA düzeyi, 750 µg/mL L-EPS uygulaması ile 1,7 olarak tespit edilirken, kontrole göre 0,7 kat artış; 1000 µg/mL L-EPS uygulaması ile 2 olarak belirlenirken kontrole göre 1 kat artış gözlemlenmiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde L-EPS'nin, TGF-β1/Smad sinyal yolağında en fazla Smad3 geni üzerinde etkin olduğu dikkat çekmiştir. Sonuçlar Şekil 4.13'te verilmiştir.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, 750 µg/mL L-EPS'nin 18 saat uygulaması sonucu artan Smad2, Smad3 ve Smad4 mRNA ekspresyon düzeyleri kontrole göre anlamlı bulunmuş olup ($*p<0,05$), bu inkübasyon süresinin kontrole göre TGF-β1 mRNA ekspresyon düzeyi üzerinde etkin olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). 750 µg/mL L-EPS'nin 24 saat uygulamasında ise TGF-β1, Smad3, Smad4 mRNA ekspresyon düzeylerindeki artışın kontrole göre anlamlı olduğu saptanmış olup ($*p<0,05$), bu inkübasyon süresinin Smad2 mRNA düzeyi üzerinde etkili olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte, 1000 µg/mL L-EPS uygulaması ile her iki inkübasyon süresinde de TGF-β1, Smad2, Smad3 ve Smad4 mRNA ekspresyon düzeylerindeki artış, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($*p<0,05$). L-EPS konsantrasyonları ikili olarak karşılaştırıldığında; 18 saat uygulamalarının TGF-β1, Smad3 ve Smad4 mRNA ekspresyon düzeylerindeki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiş olup ($*p<0,05$), bu inkübasyon süresinde konsantrasyon miktarındaki değişimin Smad2 mRNA ekspresyon düzeyinde etkili olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Her iki konsantrasyonun 24 saat uygulamaları ikili olarak karşılaştırıldığında ise TGF-β1, Smad2 ve Smad4 mRNA ekspresyon düzeylerindeki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($*p<0,05$) ve Smad3 mRNA ekspresyon düzeyinde konsantrasyon değişiminin etkin olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

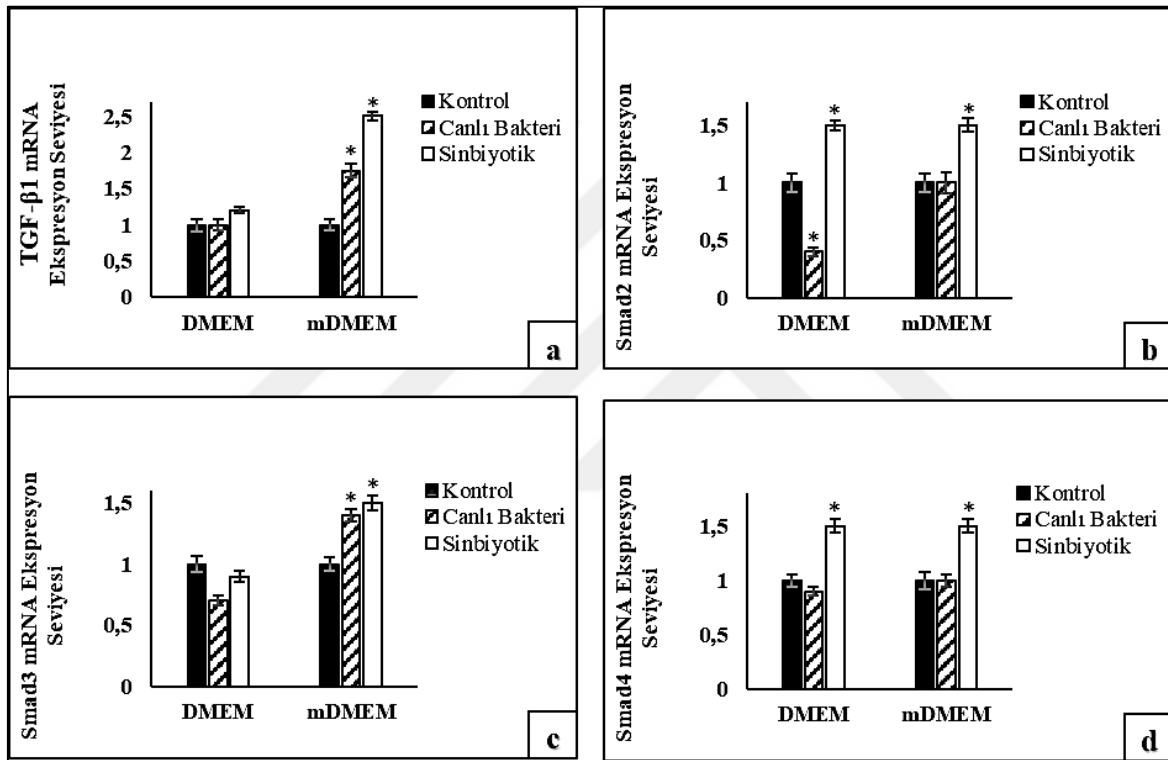


Şekil 4.13. L929 hücrelerine uygulanan L-EPS'nin TGF-β1/Smad sinyal yolağı üzerindeki modulator etkisi. (a) TGF-β1, (b) Smad2, (c) Smad3 ve (d) Smad4 mRNA ekspresyonu sonuçları, n: 3, OD ± SD

DMEM ortamında denenen canlı bakteri uygulamasının TGF-β1/Smad Sinyal yolağındaki dört gen üzerinde; sinbiyotik uygulamasının ise TGF-β1 ve Smad3 genleri üzerinde etkin olmadığı belirlenmiştir. DMEM ortamında canlı bakterinin Smad2 ve Smad4 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyinde etkili olmadığı tespit edilirken, sinbiyotik uygulamasının TGF-β1/Smad sinyal yolağındaki 4 genin de mRNA ekspresyon düzeyini arttırarak bu sinyal yolağı üzerinde etkin olduğu saptanmıştır. mDMEM ortamında 24 saat sinbiyotik uygulaması ile TGF-β1 mRNA ekspresyon düzeyi 2,5 (kontrole göre 1,5 kat artış); Smad2, Smad3 ve Smad4 mRNA ekspresyon düzeyleri 1,5 (kontrole göre 0,5 kat artış) olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.14'te verilmiştir.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, DMEM ortamında canlı bakteri uygulamasının Smad2 mRNA ekspresyon düzeyini kontrole göre anlamlı miktarda azalttığı (* $p < 0,05$), ancak, TGF-β1, Smad3 ve Smad4 mRNA ekspresyon düzeyi üzerinde kontrole göre etkin olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$). DMEM ortamında sinbiyotik uygulaması sonucunda ise Smad2 ve Smad4 mRNA ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı bir artış bulunmuş olup (* $p < 0,05$), TGF-β1 ve Smad3 mRNA ekspresyon

düzeyi üzerinde kontrole göre anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$). mDMEM ortamında ise canlı bakteri uygulaması sonucu TGF- β 1 ve Smad3 mRNA ekspresyon düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($*p<0,05$), ancak, Smad2 ve Smad4 mRNA ekspresyon düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak dikkate değer bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). mDMEM ortamında sinbiyotik uygulanması sonucunda ise istatistiksel olarak TGF- β 1, Smad2, Smad3 ve Smad4 genlerinin her birinde kontrole göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($*p<0,05$).



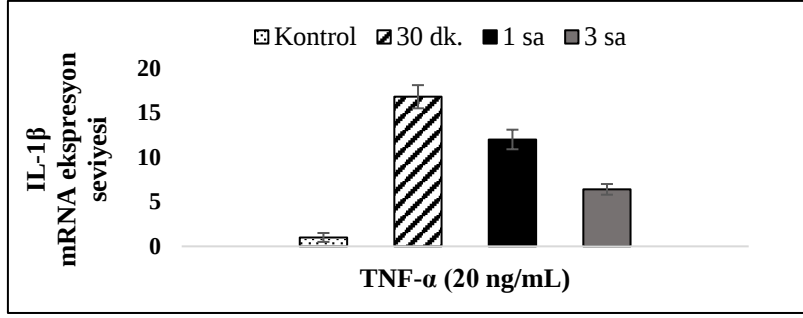
Şekil 4.14. L929 hücrelerine 24 saat uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerindeki modölatör etkisi. (a) TGF- β 1, (b) Smad2, (c) Smad3 ve (d) Smad4 mRNA ekspresyonu sonuçları, Sonuçlar, n: 3, OD $\pm$ SD

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, L-EPS ve mDMEM ortamında uygulanan sinbiyotiğin TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerinde etkili olduğu tespit edilmiş olup, sinbiyotiğin L-EPS uygulaması kadar öne çıkmadığı dikkat çektiğinden, bu sinyal yolağında en etkin olan uygulamanın L-EPS uygulamaları olduğu söylenebilir. 750 ve 1000 μ g/mL L-EPS konsantrasyonlarının sonuçları kıyaslandığında ise 1000 μ g/mL L-EPS uygulamalarının TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerinde daha etkin olduğu söylenebilir.

4.7. TNF- α ile İndüklenen İnflamasyon Modelinde L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotiğin Anti-inflamatuar Etkileri

Yüksek miktarlardaki pro-inflamatuar sitokinlerin varlığı ve şiddetli enfeksiyonlar ile karakterize edilen kronik yaraların iyileşmesi çoğunlukla inflammatuar fazda durur ve iyileşme fazları akut yaralarda olduğu gibi normal şekilde ilerleyemez. Pro-inflamatuar sitokin olan TNF- α 'nın hasarlanmış dokulardaki yüksek konsantrasyonu, kronik yaraların patofizyolojisinde rol oynayan en önemli sebeplerden birisidir. Yüksek miktardaki TNF- α varlığı; diğer pro-inflamatuar sitokinlerin ve nitrik oksitin aşırı miktarda üretimine, fibroblast proliferasyonu ile migrasyonunun engellenmesine ve böylelikle yaraların kronikleşmesine neden olur. Bu bilgiler doğrultusunda, probiyotik uygulamalarının yara iyileşmesindeki anti-inflamatuar etkilerinin belirlenmesi, bu uygulamaların yüksek inflamasyon seyrindeki kronikleşmiş yaralar üzerinde etkili olabileceklerinin gösterilmesi bakımından kritiktir.

Çalışmamızda, TNF- α ile indüklenen L929 fibroblast hücrelerinde *in vitro* inflamasyon modelinin oluşturulması ve bu modelde L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin pro-inflamatuar sitokinler olan intelökin 1 beta (IL-1 β) ve interlökin 6 (IL-6) ile nitrik oksit üretiminden sorumlu olan indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) genlerinin üzerindeki etkilerinin qRT-PCR ile belirlenmesi amaçlanmıştır. İlgili genlerin mRNA ekspresyon analizleri yapılmadan önce, inflamasyonu tetikleyen en iyi TNF- α uygulama süresinin tespiti için ön çalışma yapılmıştır. Bu ön çalışmada, MTT analizinde elde edilen hücre canlılığı değerleri (Şekil 4.4) göz önünde bulundurularak inflamasyonu indüklemeye kullanılabilecek ve hücreler üzerinde toksisiteye neden olmayan en yüksek doz olarak 20 ng/mL TNF- α uygulaması seçilmiş olup, TNF- α 'nın 30 dk, 1 saat ve 3 saat uygulamalarından sonra 18 saat DMEM besiyeri ile inkübe edilen L929 hücrelerinde IL-1 β mRNA ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Yapılan ön çalışmada elde edilen sonuçlar Şekil 4.15'te verilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda, *in vitro* inflamasyon modelinin oluşturulmasında 30 dk. TNF- α uygulamasının en iyi uygulama dozu olduğu tespit edilmiştir. Devam eden çalışmalarda *in vitro* inflamasyon modelinin oluşturulması için TNF- α uygulaması 20 ng/mL ve 30 dk. olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



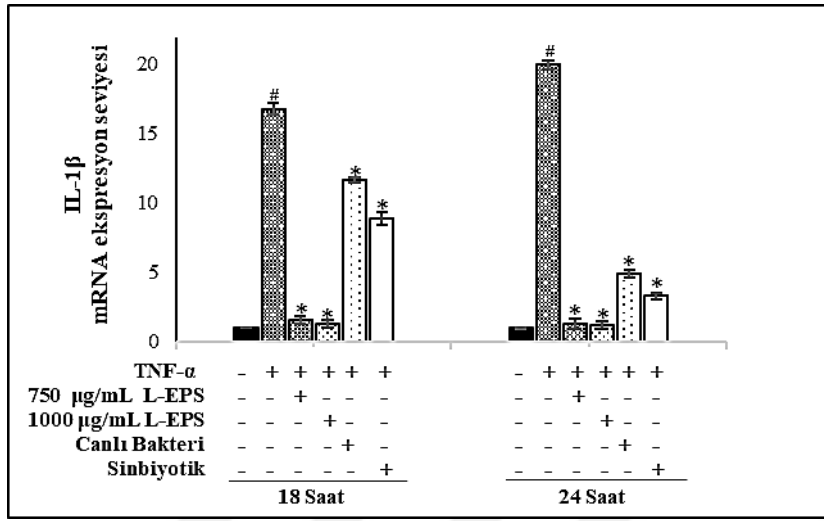
Şekil 4.15. 20 ng/mL TNF- α ile 30 dk., 1 saat ve 3 saat indüklenen L929 hücrelerinde 18 saat DMEM uygulaması sonrası tespit edilen IL-1 β mRNA ekspresyon seviyeleri.

Oluşturulan *in vitro* inflamasyon modelinin ardından çalışmada kullanılacak uygulama grupları olarak, düşük sitotoksik etkileri tespit edilen 750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS; $6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri; $6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ve 750 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS kombinasyonu olarak sinbiyotiğin 18 ve 24 saat uygulamaları seçilmiştir. Çalışmamızda, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarında daha düşük toksisiteye sahip olan mDMEM uygulamaları seçilmiştir. Kontrol grubu olarak yalnızca DMEM ve mDMEM uygulaması yapılan L929 hücreleri kullanılmıştır.

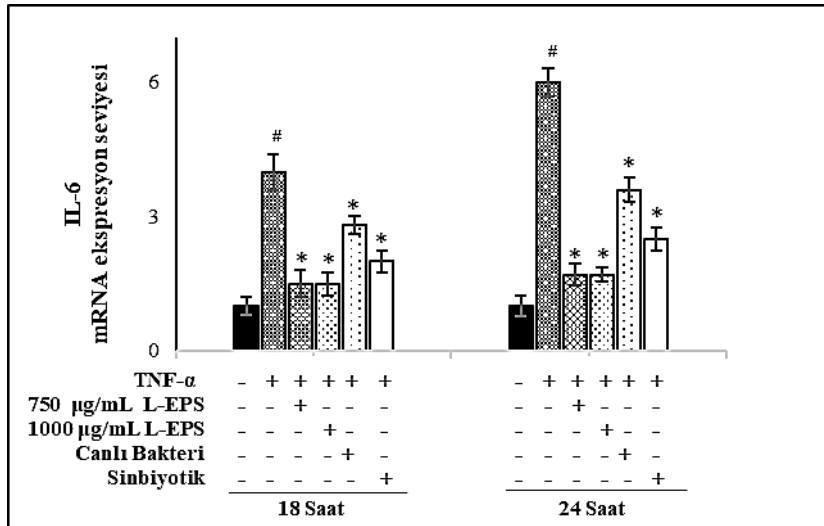
IL-1 β mRNA ekspresyon sonuçları Şekil 4.16'da, IL-6 mRNA ekspresyon sonuçları Şekil 4.17'de, iNOS mRNA ekspresyon sonuçları Şekil 4.18'de verilmiştir. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının tüm uygulama koşullarında TNF- α uygulanmış kontrol grubuna kıyasla IL-1 β , IL-6 ve iNOS mRNA ekspresyon düzeylerini dikkate değer miktarda azalttığı tespit edilmiştir. 750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS uygulamaları ile IL-1 β ile IL-6 mRNA düzeylerinde üzerinde benzer etki gözlemlenirken, 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS'nin iNOS üzerinde daha etkili olduğu bulunmuştur. Canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları içerisinde ise en iyi sinbiyotik uygulamasının etki ettiği görülmüştür. Uygulamaların ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeylerini azaltma katsayıları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, tüm uygulama koşullarında TNF- α ile indüklenen L929 hücrelerinde artan IL-1 β , IL-6 ve iNOS mRNA ekspresyon düzeylerindeki artışın kontrole göre anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($\#p < 0,05$). Bununla birlikte tüm uygulama koşullarında L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları ile IL-1 β , IL-6 ve iNOS mRNA ekspresyon düzeylerindeki TNF- α uygulanan kontrol gruplarına göre azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($*p < 0,05$). 750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS uygulamaları ikili olarak karşılaştırıldığında, her iki inkübasyon süresinde de konsantrasyon

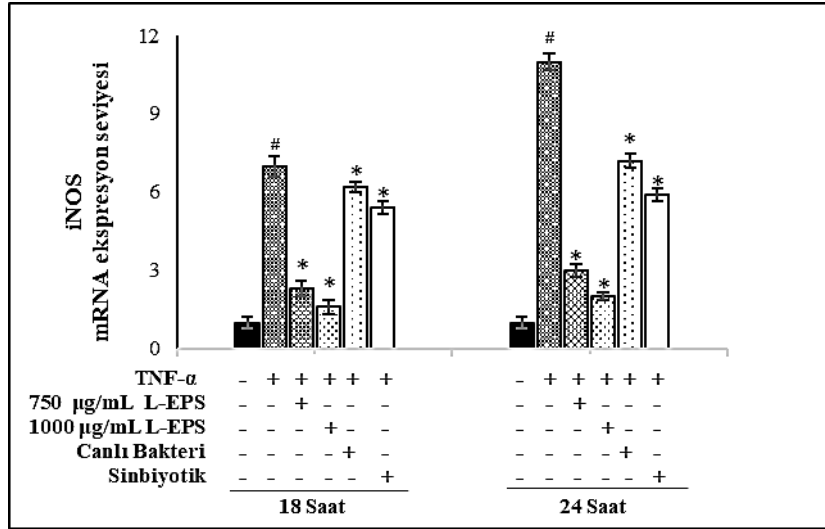
değişimine bağlı IL-1 β ve IL-6 mRNA ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamış olup ($p>0,05$), iNOS mRNA ekspresyon düzeyleri arasında konsantrasyon değişimine bağlı anlamlı fark tespit edilmiştir ($*p<0,05$). Bununla birlikte, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları ikili olarak karşılaştırıldığında, tüm uygulama koşullarında azalan IL-1 β , IL-6 ve iNOS mRNA ekspresyon düzeylerindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($*p<0,05$).



Şekil 4.16. TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerine uygulanan L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin IL-1 β mRNA ekspresyonu üzerine etkileri, n: 3, OD $\pm$ SD



Şekil 4.17. TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerine uygulanan L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin IL-6 mRNA ekspresyonu üzerine etkileri, n: 3, OD $\pm$ SD



Şekil 4.18. TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerine uygulanan L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotikğin iNOS mRNA ekspresyonu üzerine etkileri, n: 3, OD $\pm$ SD

Çizelge 4.2. L929 hücrelerinde TNF- α ile indüklenme sonu artan IL-1 β , IL-6 ve iNOS mRNA ekspresyon düzeylerindeki L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları ile tespit edilen azalma miktarlarının katsayıları

		Uygulamaların mRNA ekspresyon düzeyini azaltma katsayıları			
Gen adı	İnkübasyon süresi (Saat)	750 µg/mL L-EPS	1000 µg/mL L-EPS	Canlı bakteri	Sinbiyotik
<i>IL-1β</i>	18	10,5	13,0	1,5	1,9
<i>IL-1β</i>	24	15,4	16,7	4,1	6,1
<i>IL-6</i>	18	2,6	2,6	1,5	2,0
<i>IL-6</i>	24	3,5	3,5	1,7	2,4
<i>iNOS</i>	18	3,0	4,4	1,3	1,5
<i>iNOS</i>	24	3,6	5,6	1,5	1,9

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, L929 hücrelerinde TNF- α ile indüklenen inflamasyon modelinde en iyi anti-inflamatuar etkiyi L-EPS uygulamalarının gösterdiği, ikinci sırada sinbiyotiklerin ve üçüncü sırada canlı bakteri uygulamasının anti-inflamatuar etki gösterdiği belirtilebileceği gibi tüm probiyotik kaynaklı uygulamaların anti-inflamatuar etki gösterebilme potansiyelinin bulunduğu söylenebilir. Ayrıca, yapılan uygulamaların Çizelge 4.2’de verilen ilgili genler üzerindeki mRNA ekspresyon düzeylerini azaltma katsayıları karşılaştırıldığında, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotikğin anti-inflamatuar etkideki en etkin inkübasyon sürelerinin 24 saat olduğu belirlenmiştir.

4.8. L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotiğin Fibroblast Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Flow Sitometri ile Belirlenmesi

Fibroblast proliferasyonu, yara iyileşmesinin proliferasyon fazında gerçekleşen hücresel olaylardan biridir. Yaralanma sonrasında fibroblast proliferasyonunun artışı ile hasarlanan doku boşluğunun fibroblastlar tarafından doldurulması ve çoğalan fibroblastlar aracılığıyla ECM bileşenlerinin üretilerek yara matriksinin oluşumu, yara iyileşmesi için oldukça önemlidir. Literatürde, yara bölgesinde bulunan yüksek konsantrasyonlardaki TNF- α varlığının fibroblast proliferasyonunu inhibe ettiği ve bu sebeple yara iyileşmesinde aksaklıkların meydana geldiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, hem sağlıklı L929 hücrelerinde hem de TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerine uygulanan L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin proliferatif etkilerinin flow sitometri ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, proliferasyon kiti içerisinde bulunan ve hücre nükleusuna bağlanan CSF boyası ile mumele edilen hücrelerin, nükleustaki yarılanan boya miktarının tespit edilmesi prensibine dayanarak hücrelerin % bölünme frekansları saptanmıştır.

Flow sitometri ile yapılan proliferasyon çalışmalarında uygulamaların inkübasyon süresinin, çalışmada kullanılacak hücrelerin iki katına çıkma süresinin (doubling-time) üzerinde olması önerilmektedir. Bu doğrultuda çalışmada öncesinde, çalışmada kullanılabilecek inkübasyon süresinin seçilebilmesi için L929 fibroblastlarının flow sitometri ile hücre kültüründeki iki katına çıkma sürelerine bakılmış ve bu süre ~22 saat olarak tespit edilmiş olup, uygulamaların kullanılabilecek uygun inkübasyon süresi 24 saat olarak seçilmiştir. Çalışmada kullanılan uygulama grupları ise önceki çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda seçilmiş olup, 750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS; $6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ve $6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ile 750 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS kombinasyonu sinbiyotik olarak belirlenmiş ve canlı bakteri ile sinbiyotik uygulamaları için mDMEM uygulamaları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan TNF- α uygulama koşulları ise bir önceki çalışmamızda *in vitro* inflamasyon modelinin oluşturulmasında kullanılan koşullara göre seçilmiş olup, 20 ng/mL ve 30 dk. uygulanması uygun görülmüştür. Kontrol grubu olarak, uygulama gruplarına uygun olacak şekilde yalnızca DMEM veya mDMEM uygulanmış L929 hücreleri kullanılmıştır.

Sonuçlar, yalnızca DMEM uygulanan kontrol grubu hücrelerinin 24 saate %75,44 bölündüğünü göstermiştir. L-EPS uygulanan hücrelerde ise her iki konsantrasyon için eşit

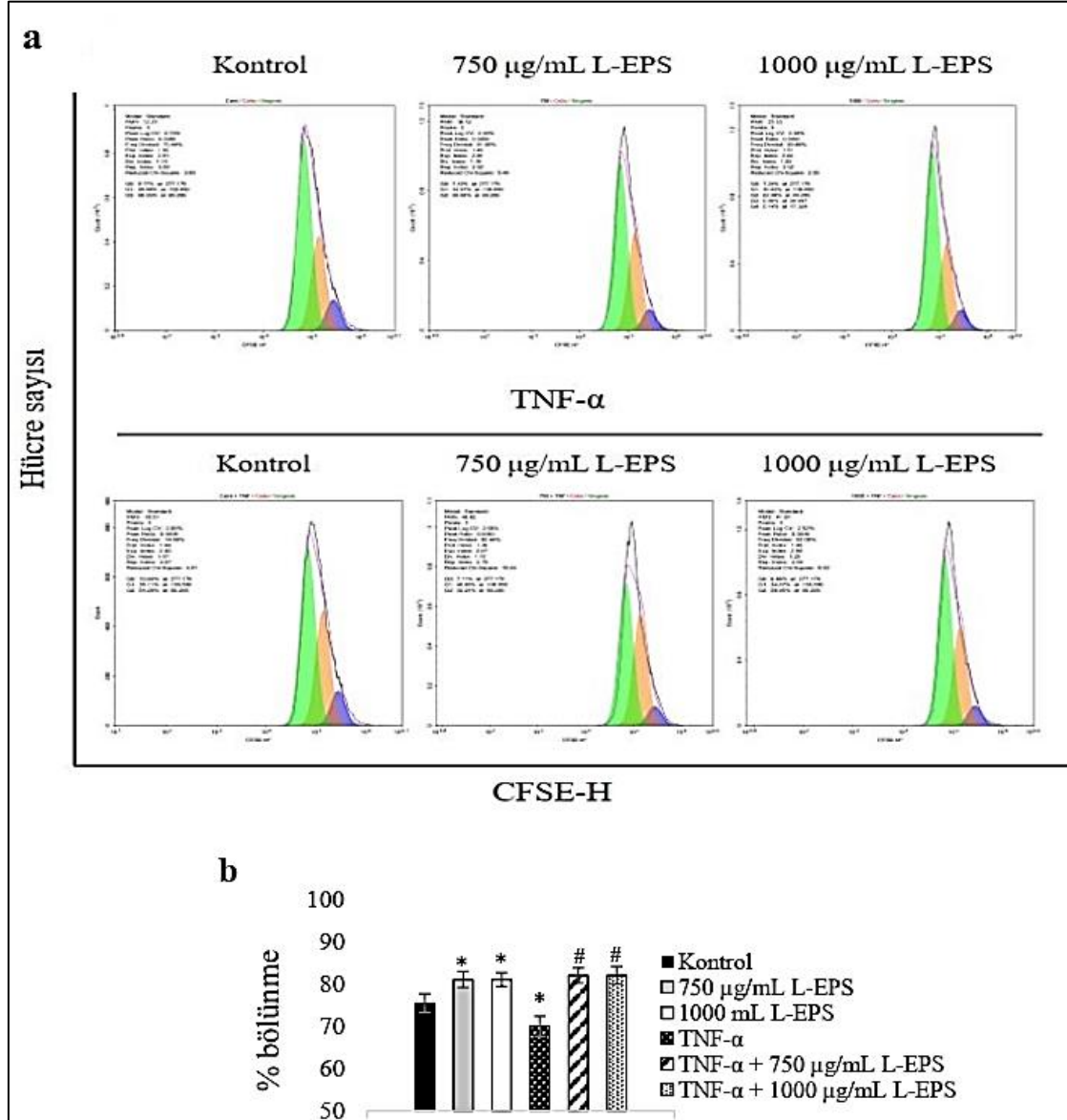
proliferatif etki tespit edilmiş olup, hücrelerin L-EPS uygulamaları sonucunda %81 bölündüğü (kontrole göre %6 daha fazla) tespit edilmiştir. TNF- α uygulaması yapılan L929 hücrelerinin ise %70 oranında bölündüğü tespit edilmiş olup, hücrelerin kontrole göre %5,44 daha az bölündüğü tespit edilmiş ve TNF- α 'nın anti-proliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerinde L-EPS uygulamalarının ise her iki konsantrasyonda da eşit proliferatif etki oluşturduğu saptanmış olup, hücrelerin L-EPS uygulamaları ile %82 bölündüğü ve TNF- α uygulanmış kontrole göre %12 proliferasyonu indüklediği bulunmuştur (Şekil 4.19).

Her iki konsantrasyondaki L-EPS'nin uygulanması sonucu artan % bölünme değerlerinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (* $p<0,05$). TNF- α uygulaması sonucu azalan % bölünme değerinin istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı olduğu belirlenmiştir (* $p<0,05$). TNF- α ile indüklenmiş hücrelerde ise her iki konsantrasyondaki L-EPS uygulamaları sonucu artan % bölünme sonuçlarının TNF- α uygulanmış kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (# $p<0,05$).

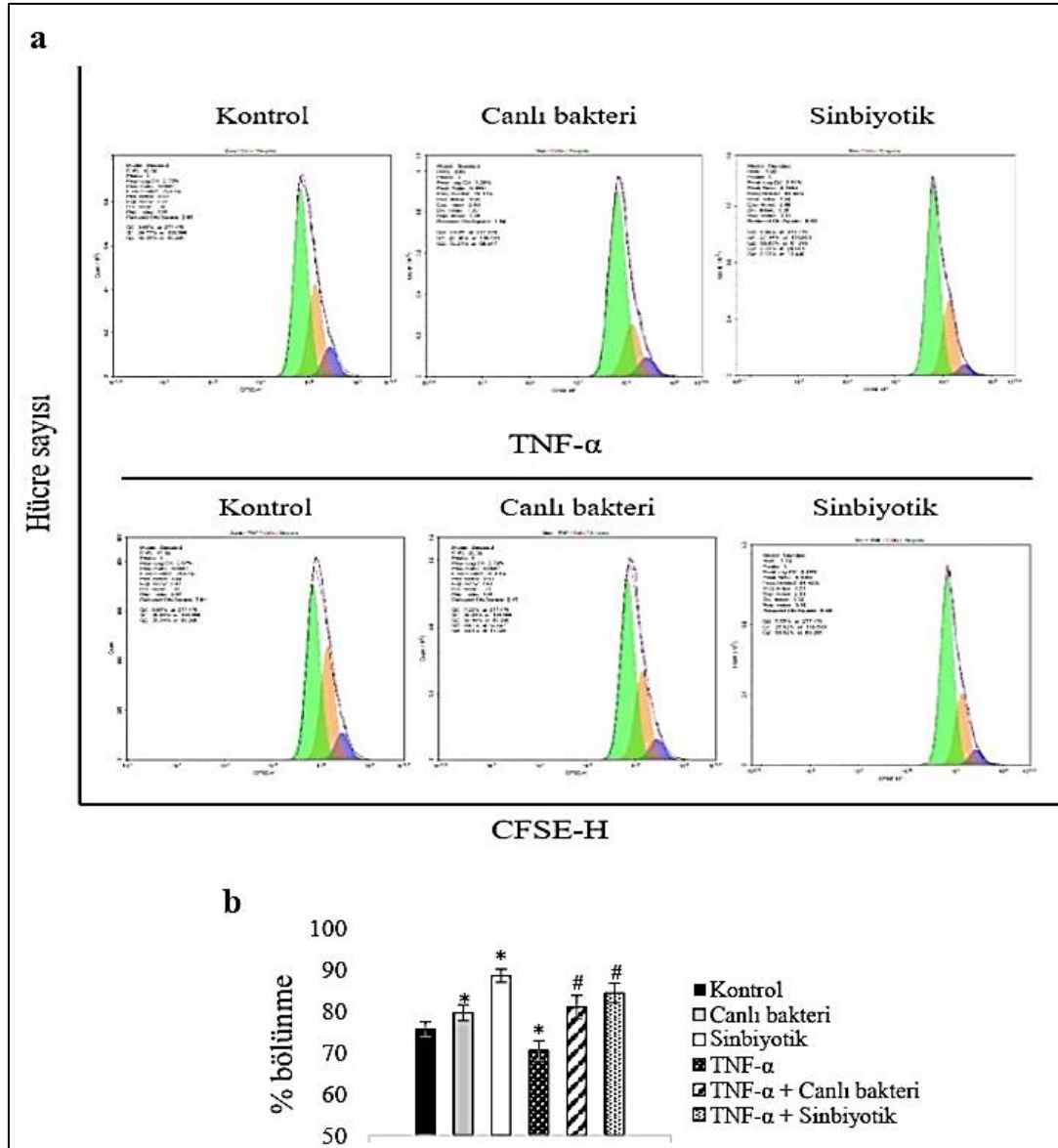
mDMEM uygulaması yapılan kontrol grubu hücrelerinin 24 saatte %75,67 bölündüğü belirlenmiş olup, % bölünme değerleri canlı bakteri uygulaması yapılan hücrelerde %79,67 (kontrole göre %4 daha fazla) ve sinbiyotik uygulaması yapılan hücrelerde %88,63 (kontrole göre %12,96 daha fazla) olarak tespit edilmiştir. mDMEM ortamında yapılan TNF- α uygulaması sonucunda L929 hücrelerinin bölünme oranı %70,5 olarak saptanmış ve kontrol grubuna göre bölünme oranında %5,17'lik bir azalma görülmüştür. TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerinde canlı bakteri uygulaması ile %81'lik bölünme (TNF- α uygulanmış kontrol grubuna göre %10,5 daha fazla) ve sinbiyotik uygulaması ile %84,42'lik bölünme (TNF- α uygulanmış kontrol grubuna göre %13,92 daha fazla) tespit edilmiştir (Şekil 4.20).

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulaması sonucu artan % bölünme değerleri kontrole göre anlamlı bulunmuştur (* $p<0,05$). mDMEM ortamında uygulanan TNF- α uygulaması ile azalan % bölünme değerinin, yalnızca mDMEM uygulanan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (* $p<0,05$). TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerinde ise hem canlı bakteri hem de sinbiyotik uygulamalarının % bölünme oranını TNF- α uygulanmış kontrole göre anlamlı miktarda arttırdığı belirlenmiştir (# $p<0,05$). Ayrıca, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının ikili

kıyaslanmasında % bölünme değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır (* $p<0,05$).



Şekil 4.19. 750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS'nin 24 saat uygulanması sonucu sağlıklı ve TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerinde elde edilen proliferasyon sonuçları. (a) Flow sitometri analizi sonuçları, (b) % bölünme değerleri, n:3, OD $\pm$ SD



Şekil 4.20. Canlı bakteri ve sinbiyotığın 24 saat uygulanması sonucu sağlıklı ve TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerinde elde edilen proliferasyon sonuçları. (a) Flow sitometri analizi sonuçları, (b) % bölünme değerleri, n:3, OD $\pm$ SD

4.9. L-EPS, Canlı Bakteri ve Sinbiyotığın Pro-anjiyojenik Potansiyellerinin *in ovo* Koryoallantoik Membran (CAM) Modelinde İncelenmesi

Anjiyogenez, yara iyileşmesinin proliferasyon fazının önemli süreçlerinden biridir. Yara iyileşmesi sırasında, hasarlanan dokuda yoğun bir şekilde neovaskülarizasyon gerçekleşerek yara bölgesinin onarımı desteklenir. İyileşme sırasında, yoğun bir şekilde yeni kılcal damarların oluşumu ve hasarlanan kan damarlarının onarımını takiben yara bölgesinde yeni bir vasküler ağın oluşumu sağlanır. Oluşan yeni vasküler ağ ise yara bölgesinin beslenmesinde, yara bölgesine oksijen taşınmasında, yara matriksinin ve sitokinlerin

regülasyonunda rol alır. Bu sebeplerden dolayı, yeni kan damalarının oluşumunun sağlanması yara tedavi yöntemlerinde önemli bir parametredir. Bu çalışmada, *in ovo* bir teknik olan embriyolu tavuk yumurtasında, koryoallantoik membran (chorioallantoic membran, CAM) modeli kullanılarak L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotığın pro-anjiyojenik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

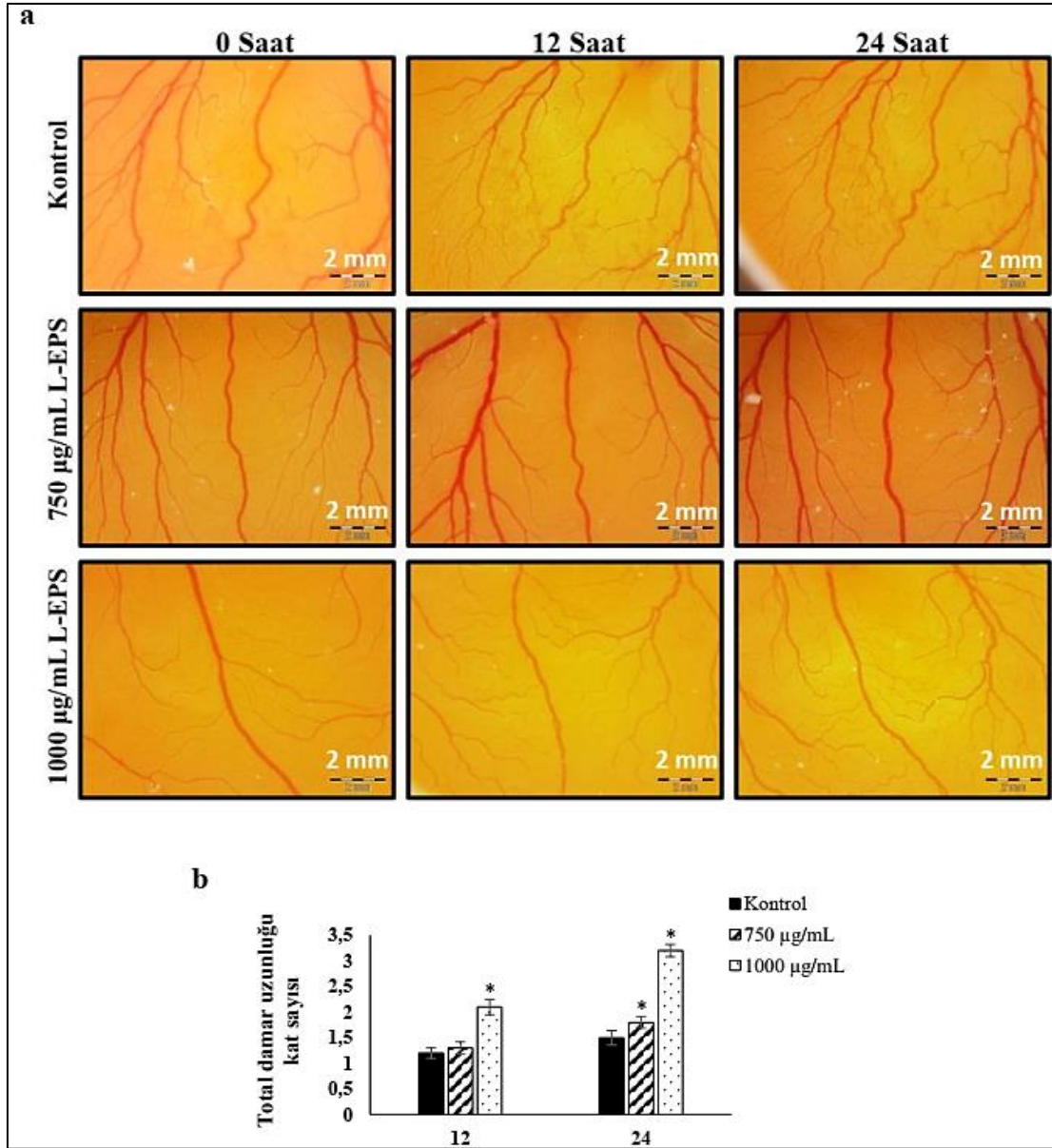
Çalışmada kullanılan uygulama grupları önceki çalışmalardaki sonuçlarımız da göz önünde bulundurularak seçilmiş olup, toksik olmayan ve yara iyileşmesinin farklı aşamalarında etkin olduğunu belirlediğimiz 750 ve 1000 µg/mL L-EPS'nin, $6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakterinin ve $6,5 \times 10^5$ cfu/mL canlı bakteri ile 750 µg/mL L-EPS kombinasyonunun sinbiyotik olarak kullanılması uygun görülmüş, uygulamaların inkübasyon süreleri 12 ve 24 saat olarak belirlenmiştir. Çalışmada L-EPS'ler 1xPBS içerisinde hazırlanmış olup, canlı organizmanın laktik asit bakterinin oluşturacağı asidik pH ortamından dolayı zarar görmemesi için canlı bakteri ve sinbiyotik %1,3 NaHCO₃ içeren 1xPBS içerisinde hazırlanarak uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak, uygulama gruplarına uygun olacak şekilde yalnızca 1xPBS veya NaHCO₃ içeren 1xPBS uygulanmış embriyolu yumurtalar kullanılmıştır.

750 µg/mL L-EPS'nin 12 saat uygulanması sonucunda total damar uzunluğu kat sayısı 1,3 olarak belirlemiş olup, 0,3 katlık bir artış tespit edilmiştir. 750 µg/mL L-EPS'nin 24 saat uygulanması sonucunda ise total damar uzunluğu kat sayısı 1,7'e yükselmiş ve 0,7 katlık bir artış gözlenmiştir. 1000 µg/mL L-EPS uygulanması sonucunda total damar uzunluğu 12 saat sonra 2,1'e yükselmiş olup (1,1 kat artış), 24 saat sonra 3,2'ye yükselmiştir (2,2 kat artış). Sonuçlar Şekil 4.21'de verilmiştir.

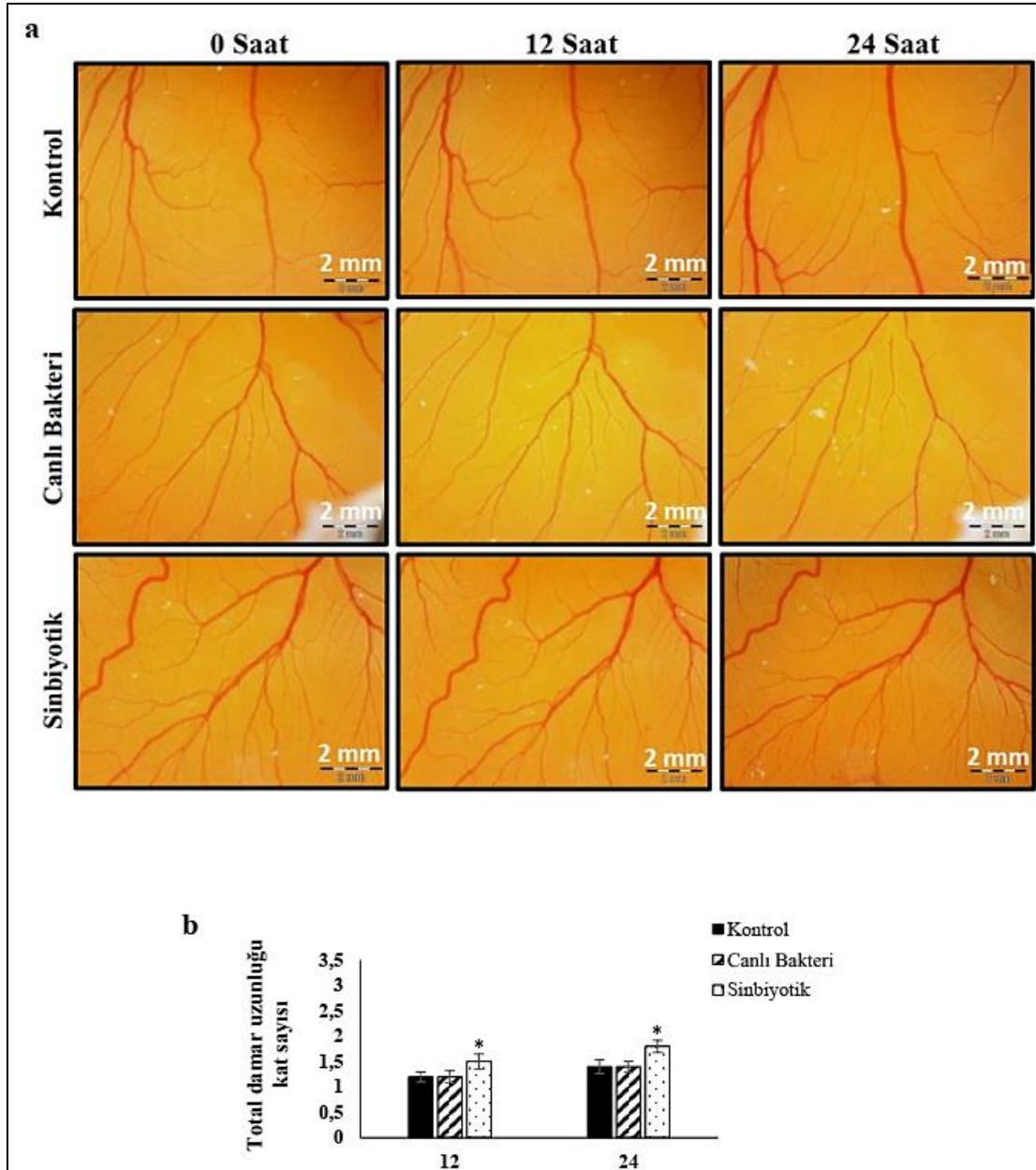
750 µg/mL L-EPS'nin 12 saat uygulanması sonucu artan total damar uzunluğunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamış olup ($p > 0,05$), 750 µg/mL L-EPS'nin 24 saat ve 1000 µg/mL L-EPS'nin hem 12 hem de 24 saat uygulamaları sonucunda elde edilen total damar uzunluğu kat sayıları kontrole göre anlamlı bulunmuştur ($*p < 0,05$). Her iki konsantrasyon için 12 ve 24 saat sonuçları ikili olarak kıyaslandığında, inkübasyon sürelerine bağlı değişen total damar uzunluğu kat sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($*p < 0,05$). 750 ve 1000 µg/mL L-EPS konsantrasyonları ikili olarak kıyaslandığında ise her iki inkübasyon süresinde de elde edilen total damar uzunlu kat sayılarındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($*p < 0,05$).

Canlı bakterinin 12 ve 24 saat uygulamaları sonucun total damar uzunluğunda dikkate değer bir değişim gözlenmemiştir. Sinbiyotik uygulanması sonucunda total damar uzunluğu 12 saat sonra 1,5'e yükselmiş olup (0,5 kat artış), 24 saat sonra 1,8'e yükselmiştir (0,8 kat artış). Sonuçlar Şekil 4.22'de verilmiştir.

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, canlı bakterinin 12 ve 24 saat uygulamalarının total damar uzunluğu sonuçlarında kontrole göre anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Sinbiyotiğin hem 12 hem de 24 saat uygulamaları sonucunda artan total damar uzunluğu kat sayılarının ise kontrole göre anlamlı olduğu tespit edilmiştir. ($*p<0,05$). Sinbiyotik uygulamasının 12 ve 24 saat sonuçları ikili olarak kıyaslandığında, inkübasyon sürelerine bağlı değişen total damar uzunluğu kat sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($*p<0,05$).



Şekil 4.21. 750 ve 1000 µg/mL L-EPS'nin 12 ve 24 saat uygulamalarının pro-anjiyojenik etkileri. (a) L-EPS'nin anjiyogenez üzerine etkisinin *in ovo* CAM modelinde mikroskopik gösterilimi (1x) ve (b) uygulama sonrası ölçülen total damar uzunluğu kat sayısı değerleri, n: 3, OD ± SD



Şekil 4.22. Canlı bakteri ve sinbiyotiğin 12 ve 24 saat uygulamalarının pro-anjiyojenik etkileri. (a) Uygulamaların anjiyogenez üzerine etkisinin *in ovo* CAM modelinde mikroskopik gösterilimi (1x) ve (b) uygulama sonrası ölçülen total damar uzunluğu kat sayısı değerleri, n: 3, OD $\pm$ SD

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, tüm uygulama grupları içerisinde 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS en iyi pro-anjiyojenik etkiyi gösterirken, sinbiyotik uygulamasında ikinci sırada en iyi pro-anjiyojenik etki tespit edilmiştir. 750 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS'nin 24 saat uygulamasının anjiyogenez üzerinde etkili olduğu tespit edilmiş olsa da 1000 $\mu\text{g/mL}$ L-EPS uygulaması kadar etkin olmadığı görülmüştür. Ayrıca sonuçlar, canlı bakterinin pro-anjiyojenik etkisinin olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak, çalışmada kullanılan probiyotik kaynaklı

uygulamalar içerisinde L-EPS ve sinbiyotiğin pro-anjiyojenik etkilerinin olduğu söylenebilir.





5. TARTIŞMA

Cilt, vücudu dış çevreden ayıran, farklı fiziksel ve kimyasal faktörlere karşı organizmayı koruyan, patojenlere karşı savunma hattı olarak rol alan ve termoregülatör fonksiyona sahip bir bariyerdir (Boer ve diğerleri, 2016). Farklı faktörlere karşı duyarlı olan ciltte meydana gelebilecek bozulmalar uzuv kaybına ve ölümlere neden olabilir (Murphree, 2017). Pek çok farklı faktörün etkileri sonucu meydana gelen cilt problemleri küresel olarak ciddi sağlık yüküne neden olmaktadır (Lim ve diğerleri., 2017).

Yara; cilt, mukoza ya da doku bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanır (Kujath, 2008). Cilt yaralarının iyileşmesi, hücre migrasyonunun ve proliferasyonunun birbiriyle ilişkili mekanizmalarını, ekstrasellüler matriksin (ECM) sentezini, iyileşme sürecini koordine eden büyüme faktörlerini ve sitokinleri içeren kompleks bir süreç olup, yara iyileşme süreci inflamasyon, proliferasyon ve remodeling olmak üzere üç temel faz ile gerçekleşir (Gushiken ve diğerleri, 2021). Yaralar, akut ve kronik yaralar olmak üzere iki grup altında sınıflandırılır (Whitney, 2005). Yara iyileşme süreci akut yaralarda olduğu gibi normal devam etmediğinde yaralar gecikir veya kronikleşir (Han ve Ceilley, 2017). (Han ve Ceilley, 2017). Diyabet, kanser ve vaskülopati gibi hastalıkların neden olduğu kronik yaraların iyileşmesi genellikle inflamatuvar fazda durur ve iyileşme sürecindeki fazların mekanizmaları olağan şekilde ilerlemez (Frykberg ve Banks, 2015; Negut ve diğerleri, 2018; X. Zhang ve diğerleri, 2020). Klinikte genellikle tedavisi zor olan bu yaralarda sistemik antibiyotik tedavileri, çeşitli pansumanlar ve yara iyileşmesini desteklemek için yapılan operatif debridmanlar kullanılır. Rutin kronik yara tedavilerinin uzun sürmesi ve sistemik antibiyotik kullanımına bağlı yan etkilerin yüksek olması nedeniyle, yara iyileşme patofizyolojisinin mekanizmalarını çoklu hedefleyen ve yan etkileri düşük yeni terapötik ajanların bulunmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir (X. Zhang ve diğerleri, 2020).

Probiyotikler, faydalı etkileri ve ürettikleri biyoaktif bileşenler bakımından araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Indira ve diğerleri, 2019). Farklı faydaları ve ürettikleri bileşenler bakımından değerlendirildiğinde probiyotiklerin antioksidan, immün düzenleyici, antimikrobiyal, anti-inflamatuvar, anti-obezite, anti-diyabetik, anti-kanser, nöroprotektif, anti-alerjik ve doku onarımını teşvik etme gibi farklı etkileri literatürde bildirilmiştir (Fijan, 2016; Lukic ve diğerleri, 2017; Plaza-Diaz ve diğerleri, 2017; Wang ve diğerleri, 2017; Mazhary ve diğerleri, 2019; Michael ve diğerleri, 2019; Tukenmez ve diğerleri, 2019; Sirin

ve Aslim, 2020; Ranjha ve diğ erleri, 2021). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, probiyotiklerin cilt sağlığı üzerindeki etkileri dermatolojik olarak dikkat çekmektedir (Kumar ve diğ erleri, 2014).

Probiyotik ekzopolisakkaritleri (EPS) biyo-uyumlu ve biyo-parçalanabilir olmaları, düşük sitotoksik etkide olmaları ve kimyasal işlevsellikleri bakımından değerlendirildiğinde probiyotik kaynaklı bu biyopolimerin yara iyileştirici etken madde veya yara biyomalzemesi olma potansiyeli bulunmaktadır (Banerjee ve diğ erleri, 2021; Hivechi ve diğ erleri, 2021). Literatürde, probiyotiklerden elde edilen EPS'lerin cilt yaraları üzerindeki etkilerini gösteren sadece iki çalışma bulunmakta olup, bu çalışmalar; probiyotik kaynaklı EPS'lerinin antioksidan özelliklerini, *in vivo* yara kapanması ve kollajen birikimi üzerindeki etkisini (Trabelsi ve diğ erleri, 2017), anti-elastaz ve anti-kollajenaz aktivitelerini (Shirzad ve diğ erleri, 2018) gösteren, sınırlı sayıda deneysel çalışmalardır. Bahsedilen bu potansiyellerine rağmen günümüze kadar probiyotik kaynaklı EPS'lerin, yara iyileşme fazlarındaki birçok mekanizma üzerindeki etkisinin ortaya konulduğu bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, ekibimiz tarafından farklı proje ve çalışmalarda yapılan kapsamlı taramalar sonucu ön plana çıkan ve yüksek EPS  retme kapasitesine sahip olan *Lactobacillus plantarum* GD2 suşundan elde edilen L-EPS kullanılmıştır. Sirin ve Aslim'in (2020) yaptıkları çalışmada, *L. plantarum* GD2 suşundan elde edilen EPS'nin miktarı 385 mg/L olarak tespit edilmiş olup, çalışmamızda da bu miktarın $398 \pm 4,4$ mg/L olduğu tespit edilmiş ve suşun EPS  retme kapasitesi bu çalışma sonucunu desteklenmiştir. Literatürde *L. plantarum* türünün farklı suşlarından elde edilen EPS miktarları 69-324 mg/L aralığında farklı miktarlarda tespit edilmiştir (Bouzar ve diğ erleri, 1996; Kimmel ve Roberts, 1998; Ismail ve Nampoothiri, 2010; Wang ve diğ erleri, 2015; Zhou ve diğ erleri, 2016; L. Zhang ve diğ erleri, 2020; Sirin ve Aslim, 2020). Diğer *L. plantarum* suşlarına kıyasla daha yüksek miktarda EPS  reticisi olan bu suşun, biyoteknolojik olarak EPS  retiminde yüksek potansiyelde kullanımının mümkün olabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının L929 hücrelerinde sitotoksik etkilerinin olup olmadığı tespit edilmiş olup, çalışmada kullanılacak etkin olan ve hücreler üzerinde toksik olmayan en yüksek konsantrasyon ve uygulama süresi aralığı belirlenmiştir. Çalışmada, laktik asit bakterilerinin üretebileceği laktik asit ve asit içerikli

diğer metabolitlerden kaynaklı farklılık gösterebilecek hücre canlılığının incelenebilmesi için canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarında DMEM besiyeri ile yapılan çalışmalara ek sodyum bikarbonat (NaHCO_3) içeren modifiye DMEM (mDMEM) besiyeriyle de hücre canlılığı tespiti yapılmıştır. Çalışmada kontrol grubu olarak, uygulama gruplarına uygun olacak şekilde yalnızca DMEM ve mDMEM uygulaması yapılan L929 hücreleri kullanılmıştır.

L-EPS uygulamalarının, L929 hücreleri üzerinde %4-20 arasında değişen düşük oranlarda hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Her iki konsantrasyondaki L-EPS'nin (750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$) 18, 24 ve 36 saat uygulamalarında hücre canlılığının azalması ile birlikte, canlılıkta dikkate değer bir azalma olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda, uygulamaların sitotoksik etkileri ISO 10993-5 standartlarına göre değerlendirilmiştir. ISO 10993-5 standartlarına göre sitotoksikite değerleri; hücre ölümü $\geq$ %50 ise yüksek derecede sitotoksik etki, %50-21 aralığında ise orta derecede sitotoksik etki, %20-11 ise düşük derecede sitotoksik etki ve $\leq$ %10 ise sitotoksik olmayan etki olarak değerlendirilir. Çalışmamızda, yüksek konsantrasyon ve sürede dahi L-EPS'nin %80 üzerinde hücre canlılığını koruduğu görülmüştür. Literatürde, laktik asit bakterilerinden elde edilen EPS'nin güvenli sitotoksikite değerinin %10-20 aralığında olması gerektiği bildirilmiştir (EL-Adawi ve diğerleri, 2012). Elde ettiğimiz hücre canlılığı sonuçları, *L. plantarum* GD2 L-EPS'sinin toksisite açısından literatürde verilen değer aralığını karşıladığını göstermekte ve sonucumuz ile ilgili yaptığımız çıkarımımızı desteklemektedir. Mojibi, Tafvizi ve Torbati (2019)'nin yaptıkları çalışmada *Lactobacillus paracasei* ve *Lactobacillus brevis*'ten elde edilen EPS'lerin, L929 hücreleri üzerinde yüksek konsantrasyonlarda (40 mg/mL) ve sürelerde (72 saat) bile %40'tan fazla hücre ölümüne neden olmadığı gösterilmiştir. Dilna ve diğerlerinin (2015) yaptığı çalışmada ise, *L. plantarum*'dan elde edilen EPS'nin sağlıklı fibroblast hücreleri olan L6 hücrelerine 500 $\mu\text{g/mL}$ uygulamasının %35 sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Literatürdeki çalışmalar göz önüne alındığında, hücrelere uygulanan yüksek konsantrasyon ve süredeki EPS'nin düşük sitotoksikite etkisi bulgularımızı doğrulamaktadır.

Canlı bakterilerin DMEM besi ortamında L929 hücrelerine uygulanması sonucu %16,8-39,8; mDMEM besi ortamında ise %10,8-28,5 arasında değişen oranlarda hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Sinbiyotik uygulamalarının ise L929 hücreleri üzerinde DMEM besi ortamında %19,9-46,8; mDMEM besi ortamında ise %16,4-34,6 arasında değişen

oranlarda hücre ölümüne sebep olduğu saptanmıştır. Canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının her iki besiyerinde de yüksek miktar ve sürelerdeki hücre ölümü oranı L-EPS uygulamalarına göre daha yüksek olsa da tüm uygulamalarda belirlenen toksisite değerlerinin ISO standartlarına göre dikkate değer olmadığı söylenebilir. DMEM besi ortamında ölüm oranının daha da yüksek olmasının, pH değerinin mDMEM'e göre ~3-3,6 oranında daha düşük olmasından kaynaklı olduğu ve bu pH düşüşünün de canlı bakterilerin ortamda laktik asit üretmeye devam etmesinden dolayı olduğu söylenebilir.

Hücre canlılığı sonuçları genel olarak ele alındığında, ISO standartlarına göre “etken maddelerin *in vitro* sitotoksitesi” kriterlerine göre L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının tüm uygulama koşullarında, L929 fibroblast hücreleri üzerinde dikkate değer toksisiteye neden olmadığı ve bu uygulamaların yara iyileşmesi çalışmasında kullanılabilecek biyogüvenli uygulamalar olduğu söylenebilir. Bu bilgiler ışığında, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış ve klinikte kullanılan toksik yan etkileri yüksek yara iyileştirici ajanlara alternatif olarak kullanılabilme potansiyeli yüksektir. Polisakkaritlerin biyomalzeme olarak kullanılabilirliklerini desteleyen en önemli özellikleri biyo-uyumlu ve biyo-parçalanabilir olmaları ile birlikte toksik olmayan etkilere sahip olmalarıdır (Sood ve diğerleri, 2021). Biyo-uyumlu ve biyo-parçalanabilir olmalarının yanı sıra düşük sitotoksik etkilere sahip olmaları EPS'lerin, biyomalzeme geliştirici bir ürün olarak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilme potansiyelini kuvvetlendirmektedir (Banerjee ve diğerleri, 2021; Hivechi ve diğerleri, 2021).

Yara iyileşmesinin geç inflamasyon fazından yaranın tam iyileşmesine kadar olan süreçte aktif rol alan fibroblastların yara bölgesine migrasyonu, proliferasyon fazının başlaması ve sağlıklı bir yara iyileşmesi için önemli bir parametredir (Addis ve diğerleri, 2020). Yara iyileşmesi çalışmalarında, potansiyel terapötik ajanların hücre migrasyonunu modüle etme kapasitelerinin incelenmesinde ve migrasyon ile ilişkili yara kapanmasının aydınlatılmasında *in vitro* yara modeli kullanılmaktadır (Sarro ve diğerleri, 2019).

Çalışmamızda, L929 fibroblastlarında oluşturulan *in vitro* yara modelinde L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik fibroblast migrasyonunu indükleyerek yara kapanma oranına bağlı, etkin uygulama dozları ve süreleri tespit edilmiştir.

L-EPS uygulamasının L929 hücrelerinde %10,1-42,1 değer aralığında yara kapanmasını teşvik ettiği tespit edilmiş olup; 18, 24 ve 36 saat L-EPS uygulamalarında yara kapanmasının artan uygulama süresine ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişen oranlarda arttığı saptanmıştır. Tüm uygulamalar birlikte değerlendirildiğinde, en iyi *in vitro* yara kapatma potansiyeline sahip uygulamaların 1000 µg/mL L-EPS'nin 24 saat (%40,4) ve 36 saat (%42,1) uygulamaları olduğu belirlenmiştir. Ancak, 1000 µg/mL L-EPS'nin 24 ve 36 saat uygulamaları ikili kıyaslandığında yara kapatma değerleri arasında anlamlı bir farklılık yoktur. Bunun nedeni artan uygulama süresine bağlı olarak L-EPS uygulamasının hücre canlılığını etkilemesi olabilir. Bu kapsamda, düşük sitotoksik etkiye ve en iyi yara kapatma oranına sahip olan 18 ve 24 saat 1000 µg/mL L-EPS uygulamaları sonucu, *in vitro* yara bölgesine göç eden fibroblastların taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri *in vitro* yara kapanma sonuçlarını desteklemiştir. Sonuç olarak, 1000 µg/mL L-EPS'nin 18 ve 24 saat uygulanmaları; kontrol grubuna kıyasla 1,8-2,5 kat yara iyileşmesini teşvik etme potansiyelleri ve dikkate değer toksik etki göstermemeleri sebebiyle, fibroblast migrasyonu aracılı yara kapanmasında kullanılabilecek uygulamalar olarak değerlendirilebilir.

DMEM besiyerinde canlı bakteri uygulamasının %52,2-79,4 (4,75-5,2 kat) ve sinbiyotik uygulamasının %75-100 (6,8-7,0 kat) değer aralığında yara kapanmasını teşvik ettiği tespit edilmiştir. mDMEM besiyerinde ise canlı bakteri uygulamasının %48-58 (4,2-4,4 kat) ve sinbiyotik uygulamasının %49,6-65 (4,3-4,6 kat) değer aralığında yara kapanmasını indüklediği bulunmuştur. *In vitro* yara analizi sonuçlarına göre, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaları içerisinde, tüm ortam koşullarında sinbiyotik uygulamaları öne çıkmıştır. Ayrıca tüm uygulama koşullarında 24 saat inkübasyon süresinin yara kapanmasında daha etkin olduğu tespit edilmiştir. DMEM besi ortamında uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin ise mDMEM uygulamalarına göre yara kapanmasında daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Literatürde, etken maddelerin %30-60 arasındaki *in vitro* yara kapatma değeri orta derecede etkili kabul edilirken, %60 ve üzeri kapanma değerleri yüksek derecede etkili kabul edilmektedir (Walter ve diğerleri, 2010; Balekar ve diğerleri, 2012, Dandannavar ve diğerleri, 2019; Balasubramaniam ve diğerleri, 2020). Bu kapsamda, L-EPS'nin yara kapanmasında orta derecede, canlı bakterinin orta-yüksek derecede ve sinbiyotiğin yüksek derecede etkili olduğu söylenebilir.

Yara iyileşmesinde ECM depozisyonunu ve yeniden şekillenmesini sağlamasının yanı sıra (Jones ve diğerleri, 2015) yaralanma sonrası dermin onarılması ile doku boşluğunun kapanmasında rol oynayan fibroblast migrasyonunun (Ottosson ve diğerleri, 2017) probiyotik L-EPS'si, canlı bakteri ve sinbiyotik ile indüklenmesi, probiyotik kaynaklı bu uygulamaların yara iyileşmesinde etkin birer terapötik ajan olarak kullanılabilme potansiyellerinin olduğunu göstermiş olması bakımından oldukça önemlidir. Ayrıca, doku mühendisliğinde kullanılan ve doku rejenerasyonunu destekleyen biyomateriyallerin hücre migrasyonunu teşvik edici özellikte olması önemli bir kriter olup (Cui ve diğerleri, 2021), düşük sitotoksik etkiye sahip ve kullanımı biyo-güvenli olan L-EPS'nin, fibroblast migrasyonunu indükleme yeteneği de göz önünde bulundurulduğunda, probiyotik L-EPS'nin doku rejenerasyonunda biyomalzeme geliştirici polimer olarak kullanılabilme potansiyelinin olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, sinbiyotiklerin, probiyotiklerin ve prebiyotiklerin ayrı olarak uygulanmasına kıyasla bakteri metabolizmasını ve gelişimini destekleyerek konak üzerinde daha yararlı etkiler sağlayabildikleri bilinmektedir (Pandey ve diğerleri, 2015; Batista ve diğerleri, 2020). Çalışmamızda sinbiyotik uygulamasının, L-EPS ve canlı bakteri uygulamalarına göre fibroblast migrasyonu aracılığıyla *in vitro* yara kapanmasını daha fazla tetiklemesinin sebebinin, canlı probiyotik bakteri ve L-EPS'nin birlikte uygulanmalarında oluşturdıkları faydalı sinerjik etkilerden dolayı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, canlı bakterilerin DMEM ile uygulamalarında, uygulama süresi ve uygulanan bakteri konsantrasyonunun artışına bağlı olarak besiyerindeki pH değerinin azaldığı tespit edilmiştir. Canlı bakteri uygulaması ile DMEM besiyerinde ölçülen pH aralığı ~4-4,6 olup, mDMEM besiyerinde ölçülen pH aralığı ~7-7,2 olarak belirlenmiştir. DMEM ile yapılan canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının mDMEM uygulamalarına göre *in vitro* yara kapanmasını daha fazla teşvik etme sebebinin laktik asit bakterilerinin ürettikleri asit metabolitlerinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ekstrasellüler pH gradienti yara ortamının karakteristik özelliğidir. Hücre yüzeyinde bulunan ve hücre migrasyonunda rol alan integrin reseptörleri asit ile indüklenerek hücre migrasyonunu regüle edebilmektedir (Paradise ve diğerleri, 2013). Hesaplamalı moleküler dinamik simülasyonlar aracılığıyla yapılan çalışmalarda asidik ekstrasellüler ortamın, hücre yüzeyindeki integrin alfa-5 beta-3 (integrin $\alpha_5\beta_3$) aktivasyonunu indükleyerek hücre migrasyonunu tetiklediği tespit edilmiştir (Paradise ve diğerleri, 2011). Literatürde asidik ekstrasellüler pH ortamının hücre migrasyonu ile ilişkisini ortaya koyan çalışmalar, DMEM ile yapılan canlı bakteri ve

sinbiyotik uygulamalarının laktik asit bakterilerinin üretebilecekleri asit metabolitlerinden dolayı hücrelerin migrasyonunu daha fazla tetikleyebileceğini vurgulamış olup, bu durum düşüncemizi desteklemiştir.

Yara enfeksiyonu, yara iyileşmesini olumsuz etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Eğer hasarlı dokudaki enfeksiyon giderilemezse daha kritik komplikasyonlar meydana gelir ve bu durum uzuv kaybı veya ölüm ile sonuçlanabilir. Bu sebeplerden dolayı, yara enfeksiyonunun giderilmesi, yara iyileşmesindeki gecikmeyi ve meydana gelebilecek komplikasyonların önüne geçilmesi ile gerçekleştirilecek kritik durumları önlemektedir (Leaper ve diğerleri, 2015). Yara iyileşmesinde asidik ortam, antimikrobiyal aktivite sağlayarak ve bakteriyel son ürünlerin toksisitesini azaltarak yara enfeksiyonunun kontrol altına alınmasını sağlamaktadır (Nagoba ve diğerleri, 2015). Ancak, yara iyileşmesinde kullanılan bazı antiseptiklerin fibroblast canlılığını olumsuz etkilediği görülürken, bazıları ise fibroblast migrasyonunu inhibe etmektedir (Falcone ve diğerleri, 2021). Çalışmamızda, DMEM ortamında uygulanan probiyotik canlı bakteri ve sinbiyotiğin, mDMEM ortamındaki uygulamalarına kıyasla daha etkili bir şekilde yara kapanmasını destekledikleri belirlenmiştir. Bu durum, toksisitesi düşük olan ve hücre migrasyonunu güçlü bir şekilde tetikleyebilen canlı bakteri ve sinbiyotiğin, asitliğe müdahale edilmeksizin uygulandıklarında, enfeksiyon riski yüksek olan kritik yaralarda antiseptik ve antimikrobiyal aktivitede kullanılabilme potansiyellerinin olduğunu düşündürmektedir. Bu düşüncenin desteklenebilmesi için canlı bakteri ve sinbiyotiğin, enfeksiyonlu yara modellerinde etkilerinin ileri düzeyde araştırılarak antiseptik ve antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi önerilmektedir.

Ciltte meydana gelen yaralanma sonrası, yara matriksinin yapısal bütünlüğün sağlanması ve yara bölgesinde geçici bir bağ dokusunun oluşması için ECM bileşenleri üretilir (Potekaeve ve diğerleri, 2021). Kollajen, temel olarak fibroblastlar tarafından üretilen ve yara bölgesinde matriks oluşumunu destekleyerek geçici bağ dokusunun oluşmasını sağlayan önemli bir ECM bileşenidir (Mathew-Steiner ve diğerleri, 2021). Fibronektin de kollajen gibi yara matriksinin oluşumunda, hücre migrasyonunda ve dokunun re-epiteliazasyonunda rol alan önemli bir adhezif moleküldür. Çalışmamızda, probiyotik L-EPS'sinin, canlı probiyotik bakterinin ve sinbiyotiklerin L929 hücrelerinde ECM bileşenlerinden olan kollajen tip 1 alfa 1 (COL1A1) ve fibronektin (FN) üzerine etkileri araştırılmış olup, her iki ECM bileşenin hem oluşum düzeyleri hem de mRNA'ya göre gen ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. L-EPS uygulamaları ile COL1A1 oluşum düzeyi ve gen ekspresyon

seviyelerinde en iyi sonuç 18 saat uygulama süresinde elde edilmiş olup (sırasıyla kontrole göre 0,7 kat ve 0,6 kat artış), her iki konsantrasyonun da birbirine yakın etki gösterdiği saptanmıştır. COL1A1 oluşum düzeyi ve gen ekspresyonu sonuçları birbirini doğrulamıştır. DMEM ortamında uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotik COL1A1 oluşum düzeyi ve gen ekspresyonunu düşürürken, mDMEM ortamında uygulanan canlı bakterinin ve sinbiyotik COL1A1 oluşum düzeyi ve gen ekspresyonunu arttırmıştır. Asidik ekstrasellüler pH ortamının, ekstrasellüler matriks bileşenlerinin yıkımından sorumlu matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9) ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir (Suzuki ve diğerleri, 2014). DMEM ortamında uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin, COL1A1 oluşum düzeyi ve mRNA ekspresyon seviyesini düşürme sebebi, bu uygulamaların asidik metabolit üretimi ile ortam pH'sını düşürmesi ve matriks yıkıcı enzimleri aktifleştirmesinden dolayı olabilir. Bu görüşün desteklenebilmesi için DMEM ortamında uygulanan canlı bakteri ve sinbiyotiğin matriks enzimleri üzerindeki etkilerinin moleküler düzeyde araştırılması gerekmektedir.

Literatürde EPS'lerin kollajen sentezini indükleyici etkilerini gösteren herhangi bir çalışma bulunmaması ile birlikte farklı polisakkaritlerin kollajen sentezi üzerine etkilerini gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır. Kim ve diğerlerinin (2018) yaptığı çalışmada, marin bakterilerinden elde edilen uzun zincirli sülfatlanmış bir polisakkarit olan fukoidanın kollajen sentezini 1,5 kat arttırdığı gösterilmiştir. Bodin ve diğerlerinin (2020) yaptığı çalışmada, deniz yosunu *Ulva intestinalis*'ten elde edilen ve %22 polisakkarit içeren protein fraksiyonunun insan dermal fibroblastlarında kollajen sentezini kontrole kıyasla ~1.5 kat arttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, pozitif kontrol olarak kullanılan ve yara iyileşmesinde de kullanılan hiyalüronik asidin 48 saat uygulanmasının, insan dermal fibroblastlarında kollajen sentezini kontrole kıyasla ~0,3 kat artırdığı tespit edilmiştir. Diğer polisakkaritlere kıyasla, kollajen sentezini daha yüksek oranda indükleyen L-EPS ile canlı bakteri ve sinbiyotiğin kollajen indükleyici etkilerinin, akut yaralarda daha hızlı yara kapanmasını sağlayabileceği ve kronik yaralarda azalan ECM sentezini artırıp kapanmayan doku boşluklarının doldurularak yara iyileşmesini destekleyebileceği düşünülmektedir.

Kollajen oluşum düzeyinin ve gen ekspresyonunun indüklenmesinde 18 saat L-EPS uygulamalarının öne çıkmasına rağmen *in vitro* yara analizi sonuçlarına göre fibroblast migrasyonunun en iyi indüklendiği L-EPS uygulama sürelerinin 24 ve 36 saat olduğu tespit edilmiştir. Yara matriksinin mekanobiyojisi, fibroblastların yara bölgesine göçü için

oldukça önemlidir. Fibroblastlar yara bölgesine göç ettiğinde, yara bölgesindeki kollajenler ile olan etkileşimi fibroblastların morfolojisini ve ECM modülasyonunu etkiler (Rhee, 2009). Bu bilgiler doğrultusunda, yara bölgesine fibroblastların göç etmesinden önce kollajen sentezinin gerçekleşmesi, yara yatağının mekaniksel olarak hazırlanıp, göç eden fibroblastların yara iyileşmesinde daha etkin rol almasını ve ECM sentezinin artarak daha hızlı yara kapanmasını sağlayabilme potansiyelinde olabilir. Bu düşüncenin desteklenmesi için, kollajen sentezi ve fibroblast migrasyonu arasındaki mekanobiyolojik regülasyonun moleküler ve sitolojik olarak daha detaylı araştırılması gerekmektedir.

Çalışmamızda, probiyotik kaynaklı uygulamaların tüm uygulama koşullarında FN oluşum düzeyi ve gen ekspresyonu üzerinde bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Ancak, bu durumun fibroblast migrasyonu aracılı yara kapanmasında negatif bir etkisinin olmadığı *in vitro* yara analizi sonuçlarında görülmüştür. Ayrıca, fibronektin üzerinde etkisinin olmadığı belirlenen uygulamaların diğer farklı ECM bileşenleri üzerinde etkilerinin olma potansiyeli olabilir. Bu sebeple, devam eden çalışmalarda L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin farklı ECM bileşenleri üzerindeki etkilerinin moleküler düzeyde ortaya konularak incelenmesi önerilmektedir.

Ciltte bir yaralanmanın meydana gelmesinden hemen sonra birçok sinyal yolağı devreye girer ve yara iyileşme mekanizmalarının başlaması tetiklenir. Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1)/Smad sinyal yolağı, yara iyileşmesinde rol oynayan bu mekanizmalardan biri olup, hasarlanan cilt dokusunun onarımı bu sinyal yolağı ile dermis düzeyinde başlatılır (Bielefeld ve diğerleri, 2013). Yaralanma sonrasında TGF- β 1, transmembran TGF- β 1 reseptörlerine bağlanarak Smad2 ve Smad3 proteinlerinin fosforilasyonuna ve dimerizasyona neden olur. Fosforile olan Smad2/3 dimeri (R-Smadlar) Smad4 (Co-Smad) ile birleşerek, heteromerik Smad2/3/4 kompleksini oluşturur ve bu kompleks, nuklear por kompleksinde bulunan nukleoporinler aracılığıyla transkripsiyon faktörü olarak nukleusa transloke olur (Yamada ve diğerleri, 2013). TGF- β 1'in reseptörleri ile olan bu etkileşimi yara iyileşmesinin aşağı-akış (down-stream) sinyallenmesini indükleyerek yara iyileşmesi esnasında fibroblast proliferasyonu, migrasyonu ve kollajen sentezi üzerinde fonksiyonel rol oynar (Bielefeld ve diğerleri, 2013; Finnson ve diğerleri, 2013; Gilbert ve diğerleri, 2016). Bu kapsamda, probiyotik L-EPS'sinin, canlı probiyotik bakterinin ve sinbiyotiğin TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerindeki etkilerinin gösterilmesi, probiyotik kaynaklı uygulamaların bu sinyal yolağı aracılığıyla yara iyileşmesindeki fibroblast proliferasyonu,

migrasyonu ve kollajen sentezini indükleyici etkilerinin birbiri ile ilişkilendirilebilmesi ve potansiyel yara iyileştirici ajanlar olarak etki mekanizmalarının ortaya konulması bakımından önemlidir. Çalışmamızda, probiyotik L-EPS'sinin, canlı probiyotik bakterinin ve sinbiyotiklerin TGF- β 1, Smad2, Smad3 ve Smad4 genleri üzerindeki modölatör etkileri qRT-PCR ile incelenmiştir.

L-EPS'nin tüm uygulamalarının TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. L-EPS, Smad genlerinin ekspresyon düzeyinde en iyi artışı 18 saat inkübasyon süresinde Smad2 ve Smad3 genleri üzerinde gösterirken, 24 saat inkübasyon süresinde en iyi artışı Smad4 ve TGF- β 1 ekspresyon düzeylerinde göstermiştir. TGF- β 1/Smad sinyal yolağındaki genlerin ekspresyon düzeyindeki en iyi artış 1000 μ g/mL L-EPS uygulamalarında tespit edilmiştir. mRNA ekspresyon düzeyindeki en yüksek artışın ise Smad3 geninde olduğu belirlenmiştir (kontrole göre 4,4 kat artış). Canlı bakteri uygulamasının DMEM ortamında 4 gen üzerinde de etkili olmadığı, mDMEM ortamında ise yalnızca TGF- β 1 ve Smad3 genleri üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Sinbiyotiğin DMEM ortamında uygulanmasının Smad2 ve Smad4 mRNA ekspresyonları üzerinde etkili olduğu tespit edilmiş, ancak TGF- β 1 ve Smad3 mRNA ekspresyon düzeyinde dikkate değer bir değişime neden olmadığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, mDMEM ortamında uygulanan sinbiyotiğin TGF- β 1, Smad2, Smad3 ve Smad4 mRNA ekspresyon düzeylerini dikkate değer miktarda artırdığı tespit edilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, 1000 μ g/mL L-EPS'nin ve sinbiyotiğin mDMEM ortamındaki uygulaması ile L929 fibroblastlarında TGF- β 1/Smad sinyal yolağında bulunan TGF- β 1, Smad2, Smad3 ve Smad4 genleri üzerinde mRNA ekspresyon düzeyinde etkili olduğu ve bu uygulamaların TGF- β 1/Smad sinyal yolağının indüklenmesinde etkin olduğu söylenebilir. Literatürde EPS'lerin, canlı probiyotik bakterilerin ve sinbiyotiklerin TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerindeki etkilerini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, farklı polisakkarit uygulamaların TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerine etkilerini gösteren birkaç çalışma bulunmaktadır. Zhang ve diğerlerinin (2019) yaptıkları çalışmada, *Bletilla striata*'dan elde edilmiş mannitol ve glukoz rezidüleri içeren polisakkarit bazlı hidrojel TGF- β 1, Smad2 ve Smad4 mRNA ekspresyon seviyelerini arttırarak, bu polisakkaritin TGF- β 1/Smad sinyal yolağı aracılığıyla kollajen üretimini indüklediği ve yara iyileşmesini hızlandığı tespit edilmiştir. You ve diğerlerinin (2021) yaptıkları çalışmada ise *Panax notoginseng* kökünden elde edilen heteroglikan polisakkaritlerinin, hidrojen peroksit ile

oksidatif hasar oluşturulmuş insan dermal fibroblastlarında TGF- β 1, Smad2, Smad3 ve Smad4 mRNA ekspresyon düzeylerini arttırarak prokollajen sentezini indüklediği gösterilmiştir. Literatürde vurgulandığı gibi bizim çalışmamızda da L-EPS ve sinbiyotik uygulamalarıyla TGF- β 1/Smad sinyal yolağının indüklenmesi ve COL1A1 sentezindeki artışın paralellik göstermesi dikkat çekmiştir. Buna bağlı olarak, probiyotik kaynaklı bu uygulamaların TGF- β 1/Smad sinyal yolağının indüklenmesi ile COL1A1 sentezinde rol oynayarak, migrasyon ve yara kapanmasını sağladığı söylenebilir. Canlı bakterilerin uygulanması ile artan *in vitro* yara kapanmasına, indüklenen COL1A1 oluşum düzeyine ve mRNA ekspresyonuna rağmen, bu uygulamanın TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerinde etkin olmadığı tespit edilmiştir. Bu sebeple, canlı probiyotik bakterilerinin farklı yara iyileşme mekanizmaları (metalloproteinazların ve inhibitörlerinin regülasyonu, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı gibi) ile yara kapanmasını ve kollajen sentezini tetiklediği düşünülmektedir. Bu görüşün desteklenebilmesi için canlı bakteri uygulamalarının farklı yara mekanizmaları üzerindeki etkilerinin daha detaylı araştırılması gerekmektedir.

Smad3, inflamasyon kaynaklı artan peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptörün (PPAR) ekspresyonunu baskılayıp yara inflamasyonunu modüle eder ve bu yolla yara inflamasyonun zamanında baskılanmasının kontrolünü sağlar (Tan ve diğerleri, 2004). Çalışmamızda, L-EPS'nin TGF- β 1/Smad sinyal yolağında en fazla Smad3 geni üzerinde etkili olduğu tespit edilmiş olup, L-EPS'nin yara inflamasyonu üzerinde Smad3 aracılığıyla anti-inflamatuar etki gösterebileceği düşünülmektedir.

Yara iyileşmesi, akut yaralarda olduğu gibi normal olarak devam etmediği takdirde aksar ve yaralar kronikleşir. Kronik yaralarda inflamasyon durumu sürekli olarak devam eder ve yara iyileşmesi inflamatuvar fazda durur (Zhao ve diğerleri, 2016). Cilt yaralarının iyileşmesinde meydana gelen bu aksamalardaki en büyük etkenlerden birisi pro-inflamatuar sitokin olan tümör nekroz faktör alfanın (TNF- α) yara dokusundaki yüksek miktarlarıdır. Yüksek miktardaki TNF- α varlığı, özellikle diyabetik yaralardaki bozulmuş iyileşme mekanizmaları ile yakından ilişkili olup (Buck ve diğerleri, 1996), yara iyileşmesindeki gecikme TNF- α 'nın neden olduğu fibroblast apoptozunun tetiklenmesi ve fibroblast proliferasyonunun inhibe edilmesi ile karakterize edilir (Wang ve diğerleri, 2014). Ayrıca, yüksek TNF-a seviyeleri, tip I kollajen ve fibronektin gibi ECM proteinlerinin üretimini engeller. Bu durum ise ECM depozisyonunda azalmaya ve yara iyileşmesinin engellenmesine neden olur. Venöz bacak ülserleri gibi kronik yaralarda artan nitrik oksit (NO) üretimi, peroksinitrit yoluyla yara

iyileşmesinin gecikmesine ve granülasyon dokunun hasarlanmasına sebep olur (Al-Rikabi ve diğerleri, 2021). NO üretiminden sorumlu olan indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS), TNF- α , interlökin 1 (IL-1) ve interlökin 6 (IL-6) gibi pro-inflamatuar sitokinler tarafından sinerjistik olarak uyarılır ve aşırı miktarlarda üretilen iNOS yara iyileşmesinin olumsuz yönde etkilenmesine sebep olur (Wang ve diğerleri, 2017). Bahsedilen sebeplerden ötürü, kronik yaralardaki inflamasyonun giderilmesi ve yaraların iyileşme sürecinin akut yaralarda olduğu gibi seyredebilmesi amacıyla yara iyileşmesinde kullanılabilecek güçlü anti-inflamatuar ajanların keşfi oldukça önemlidir (Zhao ve diğerleri, 2016). Çalışmamızda, TNF- α ile inflamasyonun indüklendiği L929 hücrelerinde probiyotik kaynaklı uygulamaların anti-inflamatuar etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

In vitro inflamasyon modeli oluşturulmadan önce, modelin oluşturulmasında kullanılabilecek etkin TNF- α dozunun ve süresinin belirlenmesi için MTT çalışması yapılmıştır. Hücre canlılığı sonuçlarında 10 ve 20 ng/mL TNF- α 'nın tüm uygulama sürelerinde dikkate değer bir toksisiteye neden olmadığı tespit edilmiş olup, probiyotik kaynaklı uygulamaların da aynı koşullarda inflamasyonun tetiklendiği hücreler üzerinde dikkate değer bir toksik etkiye sebep olmadığı saptanmıştır. Devam eden çalışmalarda, *in vitro* inflamasyon modelinin oluşturulması için L929 hücrelerinde 20 ng/mL TNF- α 'nın 30 dk. inkübasyon süresi kullanılmıştır. Çalışmamızda, IL-1 β mRNA ekspresyon seviyesinin 30 dk. TNF- α uygulamasından sonra artan sürelerde giderek azaldığı tespit edilmiş olup, literatürde TNF- α 'nın erken inflamatuvar yanıt oluşturan bir pro-inflamatuar sitokin olduğu belirtilmiştir (Kapadia ve diğerleri, 1995; Mizgerd ve diğerleri, 2001; Zhou ve diğerleri, 2009; Kallioli ve diğerleri, 2010; Lee ve diğerleri, 2017; Yang ve diğerleri, 2018).

Çalışmamızda, TNF- α ile L929 fibroblast hücrelerinde oluşturulan *in vitro* inflamasyon modelinde L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik pro-inflamatuar sitokinler olan IL-1 β ve IL-6 ile nitrik oksit üretiminden iNOS genlerinin üzerindeki etkileri qRT-PCR ile incelenmiştir. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının, tüm uygulama koşullarında TNF- α uygulanmış kontrol grubuna kıyasla IL-1 β , IL-6 ve iNOS mRNA ekspresyon düzeylerini dikkate değer miktarda azalttığı belirlenmiş olup, özellikle kronik yaralarda aşırı üretilen IL-1 β ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin baskılanması sonucu probiyotik kaynaklı uygulamaların kronik yaralarda etkin olabileceği öngörülmektedir (Mirza ve diğerleri, 2013; Shaikh-Kader ve diğerleri, 2021). Bununla birlikte, tüm uygulama grupları içerisinde L-EPS'nin en iyi anti-inflamatuar etki gösterdiği belirlenmiştir. Canlı bakteri ve sinbiyotik

uygulamaları içerisinde ise en iyi sinbiyotik uygulamasının anti-inflamatuar etki gösterdiği görülmüştür. Uygulamaların anti-inflamatuar etkileri inkübasyon sürelerine göre değerlendirildiğinde, en iyi etkiyi 24 saat uygulama süresinin gösterdiği belirlenmiştir. Tüm uygulamalarda L-EPS uygulamasının anti-inflamatuar etkinliği ve pro-inflamatuar sitokinleri baskılaması, benzer şekilde kollajen oluşumu ve TGF- β 1/Smad sinyal yolağındaki genlerin ekspresyonunun artışıyla öne çıkması ile L-EPS'nin birbiri ile ilişkili inflamasyon, proliferasyon ve ECM üretim mekanizmaları üzerinden etkin bir yara iyileştirici etkisi olduğu söylenebilir. Dolayısıyla, L-EPS'den yara iyileşmesinde çoklu mekanizmaları hedefleyen terapötik bir yara iyileştirici ajan veya biyomalzeme geliştirebilmek mümkün olabilir.

TNF- α /nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) aktivitesi ile kronikleşen yaralarda TGF- β /Smad sinyal yolağının etkisi ile inflamasyonun baskılanması ve yara iyileşmesinin hızlanması mümkündür (Al-Mulla ve diğerleri, 2011). Anti-inflamatuar etkileri belirlenen L-EPS ve sinbiyotiğin, aynı zamanda TGF- β /Smad sinyal yolağı üzerinde de etkili oluşu, bu uygulamaların TGF- β /Smad yolağı aracılığıyla geç iyileşen yaralardaki inflamasyonu baskılayarak yara iyileşmesini hızlandırabileceği düşünülmektedir. Bu düşüncenin desteklenebilmesi için kronik yara modellerinde L-EPS ve sinbiyotiğin TGF- β 1/Smad sinyal yolağı üzerindeki etkilerinin açığa çıkarılması gerekmektedir. Kronik yaralarda yüksek miktardaki NO varlığı, kollajen sentezinin azalmasına neden olmaktadır (Park ve diğerleri, 2013). L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin, NO üretiminden sorumlu iNOS mRNA düzeyi üzerindeki baskılayıcı etkileri ile kronik yaralarda NO üretimini azaltarak kollajen sentezini indüklemesi ve kronik yaraların kapanmasını desteklemesi mümkün olabilir. Ayrıca, L-EPS'nin diyabetik yaralar ve yanık yaraları gibi yüksek inflamasyon seviyeleri sebebi ile geç iyileşen yaralarda (Wang ve kullanılabilecek anti-inflamatuar etkide bir biyomalzeme ürünü olarak da kullanılabilmek potansiyeli söz konusu olabilir.

Steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), yara iyileşmesinde hem inflamasyonu azaltmada hem de yara ağrısının azalmasında oldukça etkilidir (Esen ve diğerleri, 2008; Su ve diğerleri, 2010). Ancak, NSAID'lerin kan damarları ve cilt üzerinde anti-proliferatif etki göstermeleri sebebiyle yara iyileşmesindeki kullanımları hala tartışmalıdır (Anderson ve Hamm, 2012). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda kullanılan probiyotik kaynaklı uygulamaların anti-inflamatuar ajan olarak kullanılan ancak yüksek yan etkilere sahip muadillerine göre güçlü anti-inflamatuar etki

göstererek inflamasyon kaynaklı ağırlı yaraların tedavisinde kullanılabilecek yeni terapötik ajanlar olabile potansiyellerinin bulunduğı söylenebilir. Bununla birlikte, diyabetik ayak yaralarında tespit edilen yüksek TNF- α seviyelerinden kaynaklanan inflamasyonun neden olduğı fibroblast ölümü sebebiyle geciken yara iyileşmelerinde (Landis ve diğeri, 2010) probiyotik kaynaklı uygulamaların kullanılabile potansiyellerinin olabileceğı düşünölmektedir. Bu görüşün desteklenebilmesi için *in vivo* diyabetik yara modelinde, probiyotik kaynaklı uygulamaların anti-inflamatuar etkinliğinin araştırılması ve bu uygulamaların inflamatuvar sitokinler üzerindeki modölatör etkilerinin açığa çıkarıldığı detaylı moleküler analizlerin yapılması gerekmektedir.

Fibroblast proliferasyonu, yaralanma sonrası oluşın doku boşluğunun çoğalan fibroblastlar ile doldurulup, yara bölgesinde artın fibroblast sayısına bağı olarak tahrip olan ECM'nin fibroblastlar tarafından yeniden sentezlenmesi açısından oldukça önemlidir (Bainbridge, 2013; Finnson ve diğeri, 2013). Ayrıca kronik yaralarda, inflamasyon kaynaklı fibroblast apoptozunun tetiklenmesi ve fibroblast proliferasyonunun inhibe edilmesi ECM üretimine ket vurulmasına sebep olur ve yara iyileşme fazlarındaki mekanizmalarda aksaklıkların meydana gelmesine neden olur (Landis ve diğeri, 2014).

Çalışmamızda, hem sağıklı hem de TNF- α ile indüklenmiş L929 hücrelerine uygulanan L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğın hücreler üzerindeki proliferatif etkileri flow sitometri ile belirlenmiştir. Hem sağıklı hem de TNF- α ile inflamasyonun indüklendiğı L929 hücrelerinde probiyotik kaynaklı uygulamaların her birinin proliferatif etkisinin olduğı tespit edilmiştir. En iyi proliferatif etkiyi sinbiyotik uygulamalarının, ikinci sırada L-EPS'nin ve üçüncü sırada canlı bakterinin gösterdiği belirlenmiştir. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğın yara iyileşmesinde, fibroblast proliferasyonunu indükleyerek yara kapanmasını destekleyebilecek terapötik ajanlar olarak kullanılabilecekleri düşünölmektedir. Ayrıca L-EPS ve sinbiyotiğın, kollajen oluşumu ve gen ekspresyonu üzerindeki indükleyici etkileri ve fibroblast migrasyonunu teşvik etmelerinin yanı sıra proliferatif etki de göstermeleri, bu uygulamaların TGF- β 1/Smad sinyal yolağı aracılığıyla yara iyileşmesini destekleyebileceğı görüşümüzün bir kanıtı olmuştur. Probiyotik kaynaklı uygulamaların, inflamasyonun indüklendiğı ve proliferasyonun inhibe edildiğı L929 hücreleri üzerinde proliferatif etki oluşturdukları tespit edilmiştir. Bu sonucumuz probiyotik kaynaklı uygulamaların, yüksek TNF- α varlığıyla fibroblast proliferasyonun engellenmesi ve fibroblast apoptozunun tetiklenmesi sonucu oluşın yüksek doku kaybına sahip kronik yaralarda proliferatif etkili

ajanlar olarak kullanılabilme potansiyellerinin olabileceğini düşündürmektedir. Bu görüşümüzün desteklenebilmesi için uygulamaların *in vivo* yara modellerinde histolojik ve sitolojik etkilerinin araştırılması gerekmektedir.

Yara iyileşmesinde kullanılabilme potansiyeli olan biyomalzemelerde temel olarak aranan özellikler; biyo-uyumlu, biyogüvenilir ve biyo-parçalanabilir olma, toksik olmama, hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu destekleme, anti-inflamatuar etki gösterebilme, hücre hareketliliği ve adezyonunu desteklenebilmesi için pürüzlü yüzey alanına sahip olma, hücre invazyonunun ve endotel filizlenmenin sağlanabilmesi için mikro-gözenekli olma şeklinde sıralanabilir (Dhivya ve diğerleri, 2015; Mastrullo ve diğerleri, 2020; Wang ve diğerleri, 2021; Xu ve diğerleri, 2021; Niculescu ve Grumezescu, 2022). Çalışmamızda *L. plantarum* GD2 L-EPS'sinin; toksik olmadığı, hücre migrasyonunu indükleyebildiği, proliferatif etkiye sahip olduğu ve yara inflamasyonu ile ilişkili genler üzerinde anti-inflamatuar etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, ekibimiz tarafından yapılan farklı bir çalışmada, bu tez çalışmasında kullandığımız *L. plantarum* GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin nano-ölçekli topolojik özellikleri incelenmiş olup, L-EPS'nin atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntülerinde pürüzlü bir yüzey alanına sahip olduğunu belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada, L-EPS'nin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntülerinde gözenekli bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir (Sirin ve Aslim, 2020). Bu bilgiler biyo-uyumlu ve biyogüvenli olduğu bilinen L-EPS'nin yara iyileşmesinde kullanılabilecek bir biyomalzeme olma potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir. Ancak, bu görüşümüzün desteklenebilmesi için L-EPS'nin biyomateryal olabilme kriterleri bakımından fiziko-kimyasal özelliklerinin kapsamlı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

Anjiyogenez, yara iyileşmesi için kritik öneme sahiptir. Hasarlanan dokuda oluşan kan damarları, yara dokusuna besin ve oksijen taşınmasını sağlar (Li ve diğerleri, 2003). Yaralanma sonrasında yoğun bir şekilde yeni kılcal damarların oluşumu ve hasarlanan kan damarlarının onarımını takiben yara bölgesinde yeni bir vasküler ağın oluşumu sağlanır (Honnegowda ve diğerleri, 2015). Yaralanma sonrası hasarlanan dokudaki yetersiz perfüzyon kronik yaraların patofizyolojisinin altında yatan önemli problemlerden biridir. Pro-anjiyojenik büyüme faktörlerinin uygulanması ve vaskülarize yapı iskelelerinin kullanımı neovaskülarizasyonu kısmen desteklese de yara mikro-çevresine uygun revaskülarizasyonu sağlayabilecek yeni tedavi yaklaşımları hala araştırılmaktadır (Demidova-Rice ve diğerleri, 2012; Shahin ve diğerleri, 2020).

Çalışmamızda, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin pro-anjiyojenik etkileri *in ovo* koryoallantoik membran (CAM) modeli kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada, L-EPS ve sinbiyotiğin pro-anjiyojenik etkide olduğu gözlemlenmiş olup, canlı bakterinin pro-anjiyojenik etkisinin olmadığı saptanmıştır. L-EPS uygulamaları içerisinde 1000 µg/mL L-EPS'nin anjiyogenez üzerine etkisinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca L-EPS'nin sinbiyotiğe göre daha fazla pro-anjiyojenik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm uygulamalar içerisinde 24 saat inkübasyon süresi pro-anjiyojenik etki bakımından öne çıkmıştır. Anjiyogenez üzerinde canlı bakteri uygulaması etkin değilken sinbiyotik uygulamasının pro-anjiyojenik etkide olması, sinbiyotik içerisindeki L-EPS'nin canlı bakteri gelişimini ve metabolizmasını daha fazla desteklemesi sonucu daha yoğun metabolit üretiminden dolayı olabileceği düşünülmektedir. Literatürde, probiyotik kaynaklı uygulamaların ve farklı polisakkaritlerin CAM modelinde pro-anjiyojenik etkilerini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte, farklı modellerde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Matou ve diğerlerinin (2005) yaptıkları çalışmada, mezofilik bakteri *Alteromonas infernus*'tan elde edilen heteropolisakkarit yapıdaki aşırı sülfatlanmış EPS'nin, *in vitro* tübüler model oluşturulabilen insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVEC) anjiyogenezin indüklenmesinden sorumlu fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF-2) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) seviyelerini arttırdığı, bu sebeple mezofilik bakteri EPS'sinin pro-anjiyojenik etki gösterebileceği bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, su yosunu *Ascophyllum nodosum*'dan elde edilen fukoidanın aşırı sülfatlanmış fraksiyonun HUVEC hücrelerinde vaskülarizasyonu indükleyerek pro-anjiyojenik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Marinval ve diğerleri, 2016). Jiang ve diğerlerinin (2021) yaptıkları bir çalışmada, kırmızı deniz yosunu *Bangia fuscopurpurea*'dan elde edilen sülfatlanmış porfir benzeri polisakkaritin HUVEC hücrelerinde VEGF reseptör kinaz inhibitörünü önemli ölçüde inhibe ederek bu polisakkaritin pro-anjiyojenik etki gösterdiği saptanmıştır.

Diyabetik, venöz ve iskemik ülser gibi kronik yaraların patofizyolojisinin altında yatan en önemli nedenlerden birisi bozulmuş anjiyogeneze bağlı kronik hipoksi ve mikro-besin iletim bozukluğudur (Honnegowda ve diğerleri, 2015). Kronik yaralarda kullanılan anjiyogenez hedefli mevcut terapötik ajanların yetersizliği sebebiyle pro-anjiyojenik etki gösterebilecek etken maddelerin araştırılması günümüzde hala devam etmektedir (Wietecha ve DiPietro, 2013; Chu ve diğerleri, 2021). Pro-anjiyojenik etkileri tespit edilen L-EPS ve sinbiyotiğin, kronik yaralarda anjiyogenez mekanizmalarını destekleyerek, yeni kan damarlarının oluşumu sayesinde yara dokusuna oksijen ve mikro-besin taşıyarak kronik yara kapanmasını

destekleyebileceği düşünölmekte olup, bu görüşün desteklenebilmesi için *in vivo* kronik yara modellerinde ileri düzey çalışmaların yapılması gerekmektedir. Ayrıca, L-EPS ve sinbiyotik uygulamalarının, akut yaralarda yara bölgesindeki revaskülarizasyonu destekleyerek daha hızlı yara kapatma potansiyeline sahip olabileceği söylenebilir.





6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, ekibimiz tarafından farklı çalışmalarda ve projelerde yapılmış kapsamlı taramalar ile probiyotik özellikleri ortaya konmuş, potansiyel probiyotik *Lactiplantibacillus plantarum* GD2 suşu, bu suştan elde edilen liyofilize ekzopolisakkarit (L-EPS) ve canlı probiyotik bakteri ile L-EPS karışımı sinbiyotik olarak kullanılmıştır. Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde aşağıdaki çıkarımlar ve öneriler yapılmıştır:

1. Çalışmada L-EPS (750-1000 µg/mL; 0-36 saat), canlı probiyotik bakteri ($6,5 \times 10^5$ - $1,9 \times 10^6$ cfu/mL; 0-24 saat) ve sinbiyotiğin ($6,5 \times 10^5$ - $1,9 \times 10^6$ canlı bakteri ve 750-1000 µg/mL L-EPS kombinasyonu; 0-24 saat) artan konsantrasyon ve sürelerde L929 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi araştırılmış olup, tüm uygulamaların toksisite açısından kabul edilebilir oranda olduğu belirlenmiştir. Bu uygulamaların yara iyileşmesinde kullanılabilecek biyogüvenli uygulamalar olduğunu göstermesi bakımından önemli bir sonuç olmuştur. Ayrıca, çalışmada kullanılan probiyotik L-EPS'sinin sitotoksik etkisinin olmaması ve biyolojik polimer yapısında olması sebebiyle, L-EPS'nin doku mühendisliği uygulamalarında yara iyileştirici biyomalzeme geliştirilmesinde kullanılabilmek potansiyeli olabilir.
2. Çalışmamızda, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının fibroblast hücrelerinde oluşturulan *in vitro* yara modelinde, yara bölgesine fibroblast migrasyonunu indükleyerek yara kapanma oranına bağlı, yara iyileştirme potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar, L-EPS, probiyotik canlı bakteri ve sinbiyotiğin fibroblast migrasyonunu indükleyerek yara kapanmasını teşvik ettiklerini göstermiş olup, migrasyonda en yüksek etkiyi sinbiyotik uygulaması göstermiştir. Yara iyileşmesinin proliferasyon fazının önemli aşamalarından biri olan fibroblast migrasyonunun indüklenmesi, yara bölgesinde fibroblastlar aracılığıyla ekstrasellüler matriksin (ECM) depozisyonunun sağlanmasına paralel olarak, doku boşluğunun kapatılması ve yeni bir bağ dokunun oluşması bakımından önemlidir. Dolayısıyla, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamaların fibroblast migrasyonunu indükleyerek yara kapanmasını desteklemeleri, bu uygulamaların aynı zamanda yara bölgesine göç eden fibroblastlar aracılığıyla ECM sentezini de arttırarak, doku boşluğunu hızlıca doldurabilecek etkin ajanlar olarak kullanılabilmek potansiyellerinin olduğunu

düşündürmektedir. Devam eden basamaklardaki sonuçlarımız, bu çıkarımımızı destekler nitelikte olmuştur.

3. Çalışmada, laktik asit bakterilerinin üretebilecekleri asidik metabolitlerinin hücre migrasyonu üzerine etkilerinin araştırılması için DMEM besiyeri ile yapılan canlı bakteri ve sinbiyotik çalışmalarına ek, besiyeri pH'sını nötralize ederek geliştirilen modifiye DMEM (mDMEM) çalışmalarda kullanılmıştır. Sonuçlarımız, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının DMEM ortamında fibroblast migrasyonunu, mDMEM uygulamalarına kıyasla daha fazla tetiklediğini göstermiştir. Literatürler asidik ekstrasellüler ortamın, hücre migrasyonunu tetikleyici bir faktör olabileceğini vurgulamıştır. Bu bilgi elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir. Ayrıca, asidik ortam pH'sının yara enfeksiyonunda antiseptik ve antimikrobiyal etki gösterdiği literatürdeki farklı çalışmalarda gösterilmiş olup, toksisitesi düşük olan ve hücre migrasyonunu önemli ölçüde tetikleyen canlı bakteri ve sinbiyotiğin asitliğe müdahale edilmediği uygulamalarının, enfeksiyon riski yüksek olan kritik yaralarda kullanılabilme ihtimalinin olduğunu düşündürmektedir. Bu düşüncenin desteklenebilmesi için enfeksiyonlu yara modellerinde ileri düzey çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.
4. ECM birikimi, yaralanma sebebi ile oluşan doku boşluğunun doldurulması ve yara iyileşme fazlarının olağan şekilde ilerlemesi için önemlidir. Çalışmamızda, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin kollajen ve fibronektin oluşumu ve gen ekspresyonları üzerindeki etkileri incelenmiş olup, sonuçlar L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin kollajen üretimi ve gen ekspresyonu üzerinde indükleyici etkileri olduğunu göstermiştir. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotik uygulamalarının kollajen indükleyici etkilerinin, akut yaralarda daha hızlı yara kapanmasını sağlayabileceği ve kronik yaralarda azalan ECM sentezini arttırıp kapanmayan doku boşluklarının doldurularak yara iyileşmesini destekleyebileceği düşünülmektedir.
5. Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1)/Smad sinyal yolağı, yara iyileşmesinin aşağı akış (down-stream) yolağını regüle ederek hücre migrasyonu, proliferasyonu ve ECM sentezinde kilit rol oynamaktadır. Çalışmamızda, L-EPS ve sinbiyotiğin TGF- β 1/Smad sinyal yolağını modüle ettiğini ancak, canlı bakterinin etkisi olmadığını göstermiştir. Sonuçlarımız genel olarak değerlendirildiğinde L-EPS ve sinbiyotiğin, TGF- β 1/Smad yolağı aracılığıyla yara iyileşmesini destekleyebileceği tespit edilmiş olup, bu sinyal yolağının fibroblast migrasyonu, proliferasyonu ve kollajen sentezi ile

ilişkili olabileceği literatürde bildirilmiştir. Elde ettiğimiz diğer sonuçlar bunu desteklemiştir.

6. L-EPS'nin TGF- β 1/Smad sinyal yolağındaki genler üzerine etkisi incelendiğinde mRNA ekspresyon düzeyindeki en yüksek artışın Smad3 geninde olduğu görülmüştür. Smad3, inflamasyon kaynaklı artan peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptörün (PPAR) ekspresyonunu baskılayıp yara inflamasyonunu modüle eder ve bu yolla yara inflamasyonun zamanında baskılanmasını sağlayabilir. Bu sebeple, L-EPS'nin yara inflamasyonu üzerinde Smad3 aracılığıyla anti-inflamatuar etki gösterebileceği düşünülmektedir.
7. Geç iyileşen veya iyileşmeyen yaralarda, yüksek tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) konsantrasyonunun neden olduğu yara inflamasyonunun baskılanması güncel yara tedavisi yaklaşımlarından birisidir. Çalışmamızda, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin L929 hücrelerinde interlökin 1 beta (IL-1 β), interlökin 6 (IL-6) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gen ekspresyonlarını baskılayarak anti-inflamatuar etki gösterdikleri tespit edilmiş olup, en iyi anti-inflamatuar etkiye L-EPS'nin sahip olduğu bulunmuştur. L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin anti-inflamatuar ajan olarak kullanılan ancak yüksek toksisiteye sahip muadillerine göre güçlü anti-inflamatuar etki göstererek geç iyileşen veya iyileşmeyen yaraların tedavisinde kullanılabilecek yeni terapötik ajanlar olabileceğini söylenebilir. Ayrıca, L-EPS'nin diyabetik yaralar ve yanık yaraları gibi yüksek inflamasyon seviyeleri sebebi ile geç iyileşen yaralarda kullanılabilecek anti-inflamatuar etkide bir biyomalzeme ürünü olarak da kullanılabilmek potansiyeli de söz konusu olabilir.
8. Fibroblast proliferasyonu, yaralanma sonrası oluşan doku boşluğunun çoğalan fibroblastlar ile doldurulup, yara bölgesinde artan fibroblast sayısına bağlı olarak tahrip olan ECM'nin fibroblastlar tarafından yeniden sentezlenmesi açısından oldukça önemlidir. Çalışmamızda, L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotiğin L929 hücreleri üzerindeki proliferatif etkide olduğu tespit edilmiş olup, proliferasyonu en fazla sinbiyotiklerin indüklediği tespit edilmiştir. Sinbiyotiklerin, L-EPS ve canlı bakteri uygulamalarına kıyasla proliferasyonda daha etkin olmalarının sebebinin birlikte uygulanmaları ile oluşturdukları sinerjistik etkilerden dolayı olabileceği düşünülmektedir.
9. Yüksek TNF- α varlığı, fibroblastlar üzerinde inflammatuar etki ile birlikte anti-proliferatif etki de oluşturarak yaraların geç iyileşmesine veya kronikleşmesine neden olmaktadır. Çalışmamızda, *in vitro* inflamasyon modelini oluşturmada kullandığımız

TNF- α uygulama dozu ve süresinin (20 ng/mL, 30 dk.) anti-proliferatif etkisinin olduğu tespit edilmiş olup, TNF- α uygulamasıyla proliferasyonu baskılanan L929 fibroblast hücrelerine uygulanan L-EPS, canlı bakteri ve sinbiyotığın L929 hücreleri üzerinde proliferatif etki gösterdikleri saptanmış olup, probiyotik kaynaklı uygulamaların, yüksek inflamasyon sebebi ile kronikleşen doku kayıplı derin yaralarda anti-inflamatuar etkilerinin yanı sıra proliferatif etkileri ile birlikte yara kapanmasını destekleyebilecekleri düşünülmektedir.

10. Anjiyogenez, yaralanma sonucu oluşan doku hasarının kan damarları aracılığıyla beslenip, hasarlı dokuya oksijen taşınabilmesi ve oluşan yeni damarlar aracılığıyla taşınan mikro-besinler ile yara iyileşmesinin hızlanması bakımından önemlidir. Çalışmamızda, L-EPS ve sinbiyotığın, *in ovo* embriyonlu anjiyogenez modelinde pro-anjiyojenik etki göstererek damar uzunluğunu ve yeni kılcal kan damarlarının oluşmasını teşvik ettiği belirlenmiştir. Anjiyogenez sonuçlarımız, L-EPS ve sinbiyotik uygulamalarının yara iyileşmesinde etkili bir şekilde uygulanabilirliğini ve ürün haline gelme potansiyelini daha da kuvvetlendirmiştir.
11. Biyo-uyumluluk, biyogüvenilirlik ve biyo-parçalanabilirlik, toksik olmama, hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu destekleme ve anti-inflamatuar etki gösterebilme, yara iyileştirmede kullanılan biyomalzemelerde aranan önemli kriterlerden olup çalışmamızda kullanılan probiyotik L-EPS'nin bahsedilen tüm kriterleri taşıdığı belirlenmiştir. Ayrıca, hücre hareketliliği ve adezyonunun desteklenebilmesi için pürüzlü yüzey alanına sahip olma, hücre invazyonunun ve endotel filizlenmenin sağlanabilmesi için mikro-gözenekli olma biyomalzemelerde aranan diğer önemli iki kriterdir. Çalışmamızda kullanılan *L. plantarum* GD2 L-EPS'nin ekibimiz tarafından yapılan farklı bir çalışmada yüzey alanının pürüzlü ve gözenekli olduğu saptanmış olup, bu bulgular L-EPS'nin biyomalzeme ürünü olarak kullanılma potansiyelini kuvvetlendirmektedir.
12. Bu tez çalışması kapsamında, probiyotik kaynaklı uygulamaların TGF- β 1/Smad sinyal yolağı aracılığıyla fibroblast proliferasyonu ve migrasyonu teşvik edici ve kollajen sentezini indükleyici etkilerinin yanı sıra anti-inflamatuar ve pro-anjiyojenik etkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur. Literatürde, probiyotik kaynaklı uygulamaların cilt yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini gösteren birkaç çalışma olsa da birçok mekanizma üzerindeki etkilerini ortaya koyan herhangi bir çalışma bulunmaması sebebiyle bu bulgular, probiyotik uygulamalarının yara iyileşmesi alanında kullanılabilirliği bakımından bu açığı kapatacak özgün ve öncül olma potansiyelindedir. Bu yüksek lisans

tez çalışması, çok yönlü yara iyileştirme özelliklerinin ortaya konulması bakımından probiyotik uygulamaların yara iyileşmesinde yeni terapötik ajanlar olarak kullanılabilme potansiyelini güçlendirmiştir. Ayrıca, çalışmamızda yara iyileştirici özellikleri belirlenen ve yara iyileşme ürünlerinde biyopolimer olarak kullanılabilme potansiyeline sahip L-EPS'nin yeni bir biyomalzeme olarak kullanılabilirliği vurgulanmış olmakla birlikte, özellikle biyo-uyumlu yara iyileştirici biyomalzeme geliştirmeye yönelik devam çalışmalarının yapılması önerilmektedir.





KAYNAKLAR

- Abdo, J. M., Sopko, N. A., and Milner, S. M. (2020). The applied anatomy of human skin : a model for regeneration. *Wound Medicine*, 28, 1-10.
- Agarwal, P. K., Singh, A., Gaurav, K., Goel, S., Khanna, H. D., and Goel, R. K. (2009). Evaluation of wound healing activity of extracts of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*) in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(1), 32-40.
- Aich, A., Afrin, L. B., and Gupta, K. (2015). Mast cell-mediated mechanisms of nociception. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29069-29092.
- Akita, S., Akino, K., and Hirano, A. (2013). Basic fibroblast growth factor in scarless wound healing. *Advances in Wound Care*, 2(2), 44-49.
- Akopian, A. N. (2011). Regulation of nociceptive transmission at the periphery via TRPA1-TRPV1 interactions. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(1), 89-94.
- Alam, A., Leoni, G., Wentworth, C. C., Kwal, J. M., Wu, H., Ardita, C. S., Swanson, P. A., Lambeth, J. D., Jones, R. M., Nusrat, A., and Neish, A. S. (2014). Redox signaling regulates commensal mediated mucosal homeostasis and restitution and requires formyl peptide receptor 1 (FPR1). *Mucosal Immunology*, 7(3), 645-655.
- Al-Ghazzewi, F. H. and Tester, R. F. (2014). Impact of prebiotics and probiotics on skin health. *Beneficial Microbes*, 5(2), 99-107.
- Al-Mathkhury, H. J. F. and Al-Aubeidi, H. J. A. R. (2008). Probiotic effect of lactobacilli on mice incisional wound infections. *Al-Nahrain Journal of Science*, 11(3), 111-116.
- Al-Mulla, F., Leibovich, S. J., Francis, I. M., and Bitar, M. S. (2011). Impaired TGF- β signaling and a defect in resolution of inflammation contribute to delayed wound healing in a female rat model of type 2 diabetes. *Molecular BioSystems*, 7(11), 3006-3020.
- Al-Rikabi, A. H., Tobin, D. J., Riches-Suman, K., and Thornton, M. J. (2021). Dermal fibroblasts cultured from donors with type 2 diabetes mellitus retain an epigenetic memory associated with poor wound healing responses. *Scientific Reports*, 11(1), 1-13.
- Alsawalha, M., Al-Subaie, A. M., Al-Jindan, R. Y., Bolla, S. R., Salahuddin, M., Veeraraghavan, V. P., Sen, D., Balakrishna, J. P., Ravi, P. K., and Joseph, J. P. (2019). *Dioscorea villosa* leaf extract enhances *in vitro* wound healing and expression of extra cellular matrix factors transforming growth factor-beta 1 and collagen-1 in L929 cell lines. *Pharmacognosy Magazine*, 15(66), 483-494.
- Amin, N. and Doupis, J. (2016). Diabetic foot disease : from the evaluation of the ‘foot at risk’ to the novel diabetic ulcer treatment modalities. *World Journal of Diabets*, 7(7), 153-164.
- Anderson, K. and Hamm, R. L. (2012). Factors that impair wound healing. *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists*, 4(4), 84-91.

- Angelin, J. and Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853-865.
- Arena, M. P., Spano, G., and Fiocco, D. (2017). β -Glucans and probiotics. *American Journal of Immunology*, 13(1), 34-44.
- Arpino, V., Brock, M., and Gill, S. E. (2015). The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biology*, 44, 247-254.
- Atiyeh, B. S., Dibo, S. A., and Hayek, S. N. (2009). Wound cleansing , topical antiseptics and wound healing. *International Wound Journal*, 6(6), 420-430.
- Atkin, L., Bućko, Z., Montero, E. C., Cutting, K., Moffatt, C., Probst, A., Romanelli, M., Schultz, G. S., and Tettelbach, W. (2019). Implementing TIMERS : the race against hard-to-heal wounds. *Journal of Wound Care*, 28(3), 1-50.
- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A. M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., and Gian Vincenzo Zuccotti (2011). Probiotics and health : an evidence-based review. *Pharmacological Research*, 63(5), 366-376.
- Bae, J., Jang, K., Park, S., and Jin, H. K. (2005). Promotion of dermal wound healing by polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* in rats. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 67(1), 111-114.
- Bahar, D. Ü. (2021). Yara iyileştirme özellikli polimerlerin yara örtülerinde kullanımı. *İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13, 157-181.
- Bainbridge, P. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of Wound Care*, 22(8), 407-412.
- Bakır, B. O. (2012). Prebiyotik, probiyotik ve sinbiyotiklere genel bakış. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 40(2), 178-182.
- Balasubramaniam, M. P., Murugan, P., Chenthamara, D., Ramakrishnan, S. G., Salim, A., Lin, F. H., Robert, B., and Subramaniam, S. (2020). Synthesis of chitosan-ferulic acid conjugated poly (vinyl alcohol) polymer film for an improved wound healing. *Materials Today Communications*, 25, 101510.
- Balekar, N., Katkam, N. G., Nakpheng, T., Jehtae, K., and Srichana, T. (2012). Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 817-824.
- Banerjee, A., Sarkar, S., Govil, T., González-Faune, P., Cabrera-Barjas, G., Bandopadhyay, R., Salem, D. R., and Sani, R. K. (2021). Extremophilic exopolysaccharides : biotechnologies and wastewater remediation. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1-17.
- Bashir, K. M. I. and Choi, J. S. (2017). Clinical and physiological perspectives of β -glucans: the past, present, and future. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1-48.
- Batista, V. L., Da Silva, T. F., De Jesus, L. C. L., Dias Coelho-Rocha, N., Barroso, F. A. L., Tavares, L. M., Azevedo, V., Mancha-Agresti, P., and Drumond, M. M. (2020). Probiotics, prebiotics, synbiotics, and paraprobiotics as a therapeutic alternative for

- intestinal mucositis running head: alternative treatment for intestinal mucositis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1-17.
- Baum, C. L. and Arpey, C. J. (2005). Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic Surgery*, 31(6), 674-686.
- Behm, B., Babilas, P., Landthaler, M., and Schreml, S. (2012). Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 26(7), 812-820.
- Bekiaridou, A., Karlafti, E., Oikonomou, I. M., Ioannidis, A., and Papavramidis, T. S. (2021). Probiotics and their effect on surgical wound healing: a systematic review and new insights into the role of nanotechnology. *Nutrients*, 13(12), 1-14.
- Bertazzoni, E., Donelli, G., Midtvedt, T., Nicoli, J., and Sanz, Y. (2013). Probiotics and clinical effects: is the number what counts ?. *Journal of Chemotherapy*, 25(4), 193-212.
- Bessa, L. J., Fazii, P., Di Giulio, M., and Cellini, L. (2015). Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *International Wound Journal*, 12(1), 47-52.
- Bielefeld, K. A., Amini-Nik, S., and Alman, B. A. (2013). Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(12), 2059-2081.
- Bjarnsholt, T., Alhede, M., Jensen, P. Ø., Nielsen, A. K., Johansen, H. K., Homøe, P., Høiby, N., Givskov, M., and Kirketerp-Møller, K. (2015). Antibiofilm properties of acetic acid. *Advances in Wound Care*, 4(7), 363-372.
- Bobadilla, A. V. P., Arévalo, J., Sarró, E., Byrne, H. M., Maini, P. K., Carraro, T., Balocco, S., Meseguer, A., and Alarcón, T. (2019). *In vitro* cell migration quantification method for scratch assays. *Journal of the Royal Society Interface*, 16(151), 1-11.
- Bodin, J., Adrien, A., Bodet, P. E., Dufour, D., Baudouin, S., Maugard, T., & Bridiau, N. (2020). *Ulva intestinalis* protein extracts promote *in vitro* collagen and hyaluronic acid production by human dermal fibroblasts. *Molecules*, 25(9), 2091.
- Boer, M., Duchnik, E., Maleszka, R., and Marchlewicz, M. (2016). Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 33(1), 1-5.
- Boyko, T. V, Longaker, M. T., and Yang, G. P. (2018). Review of the current management of pressure ulcers. *Advances in Wound Care*, 7(2), 57-67.
- Buck, M., Houglum, K., and Chojkier, M. (1996). Tumor necrosis factor- α inhibits collagen $\alpha 1(I)$ gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. *American Journal of Pathology*, 149(1), 195-204.
- Bzducha-Wróbel, A., Kieliszek, M., and Błażej, S. (2013). Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with

- glycerol as a carbon source. *European Food Research and Technology*, 237(4), 489-499.
- Cagno, R. Di, Angelis, M. De, Calasso, M., Vincentini, O., Vernocchi, P., Ndagijimana, M., Vincenzi, M. De, Dessi, M. R., Guerzoni, M. E., and Gobetti, M. (2010). Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *Proteomics*, 10(11), 2175-2190.
- Caley, M. P., Martins, V. L., and O'Toole, E. A. (2015). Metalloproteinases and wound healing. *Advances in Wound Care*, 4(4), 225-234.
- Cañedo-Dorantes, L. and Cañedo-Ayala, M. (2019). Skin acute wound healing: a comprehensive review. *International Journal of Inflammation*, 2019, 1-15.
- Chen, C., Lai, C., Huang, H., Huang, W., Toh, H.-S., Weng, T. C., Chuang, Y. C., Lu, Y. C., and Tang, H. J. (2019). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species against *Enterobacteriaceae*. *Frontiers in Microbiology*, 10(789), 1-10.
- Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V, Kozarov, E., Sobenin, I. A., and Orekhov, A. N. (2015). Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 5(781), 1-9.
- Cho, M., Hunt, T. K. and Hussain, M. Z. (2001). Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 280(5), 2357-2363.
- Chomiski, V., Gragnani, A., Bonucci, J., Correa, S. A. A., Noronha, S. M. R. D., and Ferreira, L. M. (2016). Keratinocyte growth factor and the expression of wound-healing-related genes in primary human keratinocytes from burn patients. *Acta Cirurgica Brasileira*, 31(8), 505-512.
- Chu, B., He, J. M., Liu, L. L., Wu, C. X., You, L. L., Li, X. L., Wang, S, Chen, C. S., and Tu, M. (2021). Proangiogenic peptide nanofiber hydrogels for wound healing. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(3), 1100-1110.
- Chuang, Y. C., Cheng, M. C., Lee, C. C., Chiou, T. Y., and Tsai, T. Y. (2019). Effect of ethanol extract from *Lactobacillus plantarum* TWK10-fermented soymilk on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rat. *AMB Express*, 9(1), 1-11.
- Cordaillat-Simmons, M., Rouanet, A., and Pot, B. (2020). Live biotherapeutic products: the importance of a defined regulatory framework. *Experimental and Molecular Medicine*, 52(9), 1397-1406.
- Dandannavar, V. S., Balakrishna, J. P., Dhawale, L., Joseph, J. P., Gollapalli, S. S. R., Pillai, A. A., and Veeraraghavan, V. P. (2019). Wound-healing potential of methanolic extract of *Rhaphidophora korthalsii* leaves possibly mediated by collagen and fibronectin expression in L929 cell line. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 9(8), 813-820.
- Das, A., Sudhahar, V., Chen, G., Kim, H. W., Youn, S., Finney, L., Vogt, S., Yang, J., Kweo, J., Surenkhuu, B., Ushio-Fukai, M., and Fukai, T. (2016). Endothelial antioxidant-1: a

- key mediator of copper-dependent wound healing *in vivo*. *Scientific Reports*, 6(1), 1-16.
- Dave, S. R., Upadhyay, K. H., Vaishnav, A. M., and Tipre, D. R. (2020). Exopolysaccharides from marine bacteria: production, recovery and applications. *Environmental Sustainability*, 3(2), 139-154.
- Delbarre-Ladrat, C., Sinquin, C., Lebellenger, L., Zykwinska, A., and Collic-Jouault, S. (2014). Exopolysaccharides produced by marine bacteria and their applications as glycosaminoglycan-like molecules. *Frontiers in Chemistry*, 2(85), 1-15.
- Demidova-Rice, T. N., Durham, J. T., and Herman, I. M. (2012). Wound healing angiogenesis: innovations and challenges in acute and chronic wound healing. *Advances in Wound Care*, 1(1), 17-22.
- Denkova, R., Teneva, D., Denkova, Z., and Kostov, G. (2017). Antimicrobial activity of probiotic microorganisms : mechanisms of interaction and methods of examination. *Antimicrobial Research: Novel Bioknowledge and Educational Programs*, 201-212.
- DesJardins-Park, H. E., Mascharak, S., Chinta, M. S., Wan, D. C., and Longaker, M. T. (2019) The spectrum of scarring in craniofacial wound repair. *Frontiers in Physiology*, 10, 1-14.
- Dhivya, S., Padma, V. V., and Santhini, E. (2015). Wound dressings-a review. *BioMedicine*, 5(4), 1-5.
- Diep, D. B., Havarstein, L. S., Nissen-meyer, J., and Nes, I. F. (1994). The gene encoding plantaricin a , a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* Cll , is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 160-166.
- Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A., and Nampoothiri, K. M. (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1179-1186.
- Dogan, K. H (2019). *Wound Healing- Current Perspectives* (First edition). London: IntechOpen, 65, 73.
- Dreifke, M. B., Jayasuriya, A. A., and Jayasuriya, A. C. (2015). Current wound healing procedures and potential care. *Materials Science and Engineering: C*, 48, 651-662.
- Dubey, A. K., Podia, M., Priyanka, Raut, S., Singh, S., Pinnaka, A. K., and Khatri, N. (2021). Insight into the beneficial role of *Lactiplantibacillus plantarum* supernatant against bacterial infections, oxidative stress, and wound healing in A549 cells and BALB/c mice. *Frontiers in Pharmacology*, 12(728614), 1-14.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., and Smith, F. (1956) . Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.

- EL-Adawi, H. I., Khalil, M. A., EL-Sheekh, M. M., El-Deeb, N. M. and Hussein, M. Z. (2012). Cytotoxicity assay and antioxidant activities of the lactic acid bacterial strains, *African Journal of Microbiology Research*, 6(8), 1700-1712.
- Ellis, S., Lin, E. J., and Tartar, D. (2018). Immunology of wound healing. *Current Dermatology Reports*, 7(4), 350-358.
- Ersoy, E. S. E. N., Sucullu, I., Sinan, H., Küçükodacı, Z., Filiz, A. I., Yucel, E., and Akin, M. L. (2008). The effects of non-steroid anti-inflammatory drugs on healing of colonic anastomosis in rats. *Eastern Journal of Medicine*, 13(1-2), 13-18.
- Fijan, S. (2016). Antimicrobial effect of probiotics against common pathogens. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*, 191-221.
- Finnsen, K. W., McLean, S., Di Guglielmo, G. M., and Philip, A. (2013). Dynamics of transforming growth factor beta signaling in wound healing and scarring. *Advances in Wound Care*, 2(5), 195-214.
- Fitridge, R. and Thompson, M. (2011). *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* (Third edition). South Australia: University of Adelaide Press, 423, 449.
- Frykberg, R. G. and Banks, J. (2015). Challenges in the treatment of chronic wounds. *Advances in Wound Care*, 4(9), 560-582.
- Gainza, G., Villullas, S., Pedraz, J. L., Hernandez, R. M., and Igartua, M. (2015). Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(6), 1551-1573.
- Gan, P., Zhang, L., Chen, Y., Zhang, Y., Zhang, F., Zhou, X., Zhang, X., Gao, B., Zhen X, Zhang J., and Zheng, L. T. (2015). Anti-inflammatory effects of glaucocalyxin B in microglia cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 128(1), 35-46.
- Ghilardi, S. J., O'Reilly, B. M., and Sgro, A. E. (2020). Intracellular signaling dynamics and their role in coordinating tissue repair. *Wires Systems Biology and Medicine*, 12(3), 1-26.
- Gohel, M. S., Windhaber, R. A. J., Tarlton, J. F., Whyman, M. R., and Poskitt, K. R. (2008). The relationship between cytokine concentrations and wound healing in chronic venous ulceration. *Journal of Vascular Surgery*, 48(5), 1272-1277.
- Gonzalez, A. C. D. O., Costa, T. F., Andrade, Z. D. A., and Medrado, A. R. A. P. (2016). Wound healing-a literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91, 614-620.
- González, M. P. B. and Quiñones-Gutiérrez, Y. (2018). Antibiosis of cefotaxime / clindamycin and *Lactobacillus acidophilus* on related bacteria to diabetic foot ulcer. *Food and Nutrition Sciences*, 9(4), 277-289.
- Gouin, O., L'Herondelle, K., Lebonvallet, N., Le Gall-Ianotto, C., Sakka, M., Buhé, V., Plée-gautier, E., Carré, J., Lefeuvre, L., and Misery, L. (2017). TRPV1 and TRPA1 in

cutaneous neurogenic and chronic inflammation: Pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein & Cell*, 8(9), 644-661.

Granstein, R. D. and Luger, T. A. (2009). *Neuroimmunology of the Skin* (First edition). Berlin: Springer, 89,102.

Gu, Y. Y., Liu, X. S., Huang, X. R., Yu, X. Q., and Lan, H. Y. (2020). Diverse role of TGF- β in kidney disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(123), 1-13.

Guerra, A., Belinha, J., and Jorge, R. N. (2018). Modelling skin wound healing angiogenesis: a review. *Journal of Theoretical Biology*, 459, 1-17.

Gushiken, L. F. S., Beserra, F. P., Bastos, J. K., Jackson, C. J., and Pellizzon, C. H. (2021). Cutaneous wound healing: an update from physiopathology to current therapies. *Life*, 11(7), 1-15.

Hadid, M. A., Al-Shaibani, A. B., and Al-Mukhtar, S. A. (2015). Treatment of bacteria causing burn wound infections by *Lactobacillus Reuteri* as a probiotic. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(2), 116-125.

Haensel, D., and Dai, X. (2018). Epithelial-to-mesenchymal transition in cutaneous wound healing: Where we are and where we are heading. *Developmental Dynamics*, 247(3), 473-480.

Häkkinen, L., Larjava, H., and Koivisto, L. (2011). Granulation tissue formation and remodeling. *Endodontic Topics*, 24(1), 94-129.

Halper, J., Leshin, L. S., Lewis, S. J., and Li, W. I. (2003). Wound healing and angiogenic properties of supernatants from *Lactobacillus* cultures. *Experimental Biology and Medicine*, 228(11), 1329-1337.

Han, G. and Ceilley, R. (2017). Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Advances in Therapy*, 34(3), 599-610.

Han, N., Jia, L., Su, Y., Du, J., Guo, L., Luo, Z., and Liu, Y. (2019). *Lactobacillus reuteri* extracts promoted wound healing via PI3K/AKT/ β -catenin/TGF β 1 pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 1-11.

Havran, W. L. and Jameson, J. M. (2010). Epidermal T cells and wound healing. *The Journal of Immunology*, 184(10), 5423-5428.

Hivechi, A., Milan, P. B., Modabberi, K., Amoupour, M., Ebrahimzadeh, K., Gholipour, A. R., Sedighi, F., Amini, N., Bahrami, S. H., Rezapour, A., Hamidi, M., and Delattre, C. (2021). Synthesis and characterization of exopolysaccharide encapsulated pcl/gelatin skin substitute for full-thickness wound regeneration. *Polymers*, 13(6), 1-16.

Honnegowda, T. M., Kumar, P., Udupa, E. G. P., Kumar, S., Kumar, U., and Rao, P. (2015). Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing. *Plastic and Aesthetic Research*, 2(5), 244-249.

- Huang, Y. C., Huang, K. Y., Lew, W. Z., Fan, K. H., Chang, W. J., and Huang, H. M. (2019). Gamma-irradiation-prepared low molecular weight hyaluronic acid promotes skin wound healing. *Polymers*, 11(7), 1-12.
- Hughes, R. L. (2020). A review of the role of the gut microbiome in personalized sports nutrition. *Frontiers in Nutrition*, 6(191), 1-27.
- Huseini, H. F., Rahimzadeh, G., Fazeli, M. R., Mehrazma, M., and Salehi, M. (2012). Evaluation of wound healing activities of kefir products. *Burns*, 38(5), 719-723.
- Indira, M., Venkateswarulu, T. C., Peele, K. A., Bobby, N., and Krupanidhi, S. (2019). Bioactive molecules of probiotic bacteria and their mechanism of action : a review. 3 *Biotech*, 9(8), 1-11.
- Iorio, V., Troughton, L. D., and Hamill, K. J. (2015). Laminins: roles and utility in wound repair. *Advances in Wound Care*, 4(4), 250-263.
- Ismail, B., and Nampoothiri, K. M. (2010). Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Archives of Microbiology*, 192(12), 1049-1057.
- ISO, E. (2009). 10993-5. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Test for *in vitro* cytotoxicity. *International Organization for Standardization*: Geneva, Switzerland.
- İnternet 1: L929 hücre hattının özellikleri, <https://www.atcc.org/products/ccl-1>, Son Erişim Tarihi: 06.02.2022.
- Jahrom, M. A. M., Zangabad, P. S., Basri, S. M. M., Zangabad, K. S., Ghamarypour, A., Aref, A. R., Karimi, M., and Hamblin, M. R. (2018). Nanomedicine and advanced technologies for burns: preventing infection and facilitating wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 123, 33-64.
- Jampani, K., Nagaraja, A., Peddireddy, S., and Kumar, S. (2014). Linear scleroderma: a series of all clinical variants. *Our Dermatology Online*, 5(2), 185-187.
- Jia, K., Tong, X., Wang, R., and Song, X. (2018). The clinical effects of probiotics for inflammatory bowel disease. *Medicine*, 97(51), 1-9.
- Jiang, F., Liu, G. S., Disting, G. J., and Chan, E. C. (2014). NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- β -mediated fibrotic responses. *Redox Biology*, 2(1), 267-272.
- Jiang, L., Liu, B., Qi, Y., Zhu, L., Cui, X., and Liu, Z. (2020). Antagonistic effects of activin A and TNF- α on the activation of L929 fibroblast cells via Smad3-independent signaling. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.
- Jiang, Y., Zhang, J., Zhao, X., Zhao, W., Yu, Z., Chen, C., and Yang, Z. (2018). Complete genome sequencing of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* K25 provides genetic evidence for the probiotic functionality and cold endurance capacity of the strain. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82(7), 1225-1233.
- Jiang, Z., He, P., Wu, L., Yu, G., Zhu, Y., Li, L., Ni, H., Oda, T., and Li, Q. (2021). Structural characterization and pro-angiogenic property of a polysaccharide isolated from red

- seaweed *Bangia fusco-purpurea*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 705-717.
- Jindatanmanusan, P., Luanraksa, S., Boonsiri, T., Nimmanon, T., and Arnutti, P. (2018). Wound fluid matrix metalloproteinase-9 as a potential predictive marker for the poor healing outcome in diabetic foot ulcers. *Pathology Research International*, 2018, 1-5.
- Jones, E. M., Cochrane, C. A., and Percival, S. L. (2015). The Effect of pH on the Extracellular Matrix and Biofilms. *Advances in Wound Care*, 4(7), 431-439.
- Jonkman, J. E., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., and Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion & Migration*, 8(5), 440-451.
- Joung, E. J., Lee, M. S., Choi, J. W., Kim, J. S., Shin, T., Jung, B. M., Yoon, N. Y., Lim, C. W., Kim J. I., and Kim, H. R. (2012). Anti-inflammatory effect of ethanolic extract from *Myagropsis myagroides* on murine macrophages and mouse ear edema. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 1-11.
- Jun, J. I., Kim, K. H., and Lau, L. F. (2015). The matricellular protein CCN1 mediates neutrophil efferocytosis in cutaneous wound healing. *Nature Communications*, 6(1), 1-14.
- Kallioliass, G. D., & Ivashkiv, L. B. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(1), 49-62.
- Kamoun, E. A., Kenawy, E. R. S., and Chen, X. (2017). A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research*, 8(3), 217-233.
- Kanamarlapudi, S. L. R. K. And Muddada, S. (2017). Characterization of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. *BioMed Research International*, 2017(4201809), 1-11.
- Kanta, J. (2011). The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 54(3), 97-101.
- Kaoud, H. A. E. (2018). *Tissue Regeneration* (First edition). London: Intechopen, 65, 75.
- Kapadia, S. A. M. I. R., Torre-Amione, G., Yokoyama, T., and Mann, D. L. (1995). Soluble TNF binding proteins modulate the negative inotropic properties of TNF-alpha *in vitro*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 268(2), 517-525.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., and Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *International Scholarly Research Notices*, 2013(481651), 1-7.
- Keyes, B. E., Liu, S., Asare, A., Naik, S., Levorse, J., Polak, L., Lu, C.P., Nikolova, M., Pasolli, H. A., and Fuchs, E. (2016). Impaired epidermal to dendritic T cell signaling slows wound repair in aged skin. *Cell*, 167(5), 1323-1338.

- Khan, H., Jiskani, A. R., Kumari, D., Rafique, M., Kirmani, F., and Azmi, M. A. (2019). Anti-inflammatory effects of topical *Lactobacillus acidophilus* and antibiotic in wound repair on the basis of microscopic parameters: a comparative study in rats. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 7(8), 3044-3049.
- Kılıççalan, İ., Doğrul, B. N., Erkovan, A., and Aşçı, E. S. (2021). The Effects of Acyclovir on Angiogenesis in Chick Chorioallantoic Membrane Model. *Turkish Medical Student Journal*, 8(3), 111-114.
- Kim, S. Y., and Nair, M. G. (2019). Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunology and Cell Biology*, 97(3), 258-267.
- Kimoto-Nira, H., Reiji Aoki, K. S., Suzuki, C., and Mizumachi, K. (2012). Oral intake of heat-killed cells of *Lactococcus lactis* strain H61 promotes skin health in women. *Journal of Nutritional Science*, 1(18), 1-7.
- Kloc, M., Ghobrial, R. M., Wosik, J., Lewicka, A., Lewicki, S., and Kubiak, J. Z. (2019). Macrophage functions in wound healing. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(1), 99-109.
- Knackstedt, R., Knackstedt, T., and Gatherwright, J. (2020). The role of topical probiotics on wound healing: a review of animal and human studies. *International Wound Journal*, 17(6), 1687-1694.
- Koh, T. J. and Dipietro, L. A. (2020). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 13(e23), 1-12.
- Korting, H. C., Schöllmann, C., and White, R. J. (2011). Management of minor acute cutaneous wounds: importance of wound healing in a moist environment. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(2), 130-137.
- Kos, B., Šušković, J., Beganović, J., Gjuračić, K., Frece, J., Iannaccone, C., and Canganella, F. (2008). Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), 699-707.
- Kovacova-Hanusikova, E., Buday, T., Gavliakova, S., and Plevkova, J. (2015). Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergologia et Immunopathologia*, 43(5), 498-506.
- Kristiansen, P. E., Fimland, G., Mantzilas, D., and Nissen-meyer, J. (2005). Structure and mode of action of the membrane-permeabilizing antimicrobial peptide pheromone plantaricin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 22945-22950.
- Krzyszczczyk, P., Schloss, R., Palmer, A., and Berthiaume, F. (2018). The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Frontiers in Physiology*, 9(419), 1-22.
- Kujath, P. and Michelsen, A. (2008). Wounds—From physiology to wound dressing. *Deutsches Arzteblatt International*, 105(13), 239.
- Kumar, P. and Kothari, V. (2021). *Wound Healing Research* (First edition). Singapore: Springer, 301-330.

- Kuroyanagi, M. and Kuroyanagi, Y. (2017). Tissue-engineered products capable of enhancing wound healing. *Aims Materials Science*, 4(3), 561-581.
- Lazaro, J. L., Izzo, V., Meaume, S., Davies, A. H., Lobmann, R., and Uccioli, L. (2016). Elevated levels of matrix metalloproteinases and chronic wound healing: an updated review of clinical evidence. *Journal of Wound Care*, 25(5), 277-287.
- Leaper, D., Assadian, O., and Edmiston, C. E. (2015). Approach to chronic wound infections. *British Journal of Dermatology*, 173(2), 351-358.
- Lee, D. E., Huh, C.-S., Ra, J., Choi, I. D., Jeong, J. W., Kim, S., Ryu, J. H., Seo, Y. K., Koh, J. S., Lee, J. H., Sim, J. H., and Ahn, Y.T. (2015). Clinical evidence of effects of *Lactobacillus plantarum* HY7714 on skin aging: a randomized, double blind, placebo-controlled study. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12), 2160-2168.
- Lee, J. W., Lee, J., Um, S. H., and Moon, E. Y. (2017). Synovial cell death is regulated by TNF- α -induced expression of B-cell activating factor through an ERK-dependent increase in hypoxia-inducible factor-1 α . *Cell Death & Disease*, 8(4), 1-12.
- Lenselink, E. A. (2015). Role of fibronectin in normal wound healing. *International Wound Journal*, 12(3), 313-316.
- León-López, A., Morales-Peñaloza, A., Martínez-Juárez, V. M., Vargas-Torres, A., Zeugolis, D. I., and Aguirre-Álvarez, G. (2019). Hydrolyzed collagen-sources and applications. *Molecules*, 24(22), 1-16.
- Lew, L. C. and Liong, M. T. (2013). Bioactives from probiotics for dermal health: functions and benefits. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1241-1253.
- Li, H., Duann, P., Lin, P., Zhao, L., Fan, Z., Tan, T., Zhou, X., Sun, M., Fu, M., Orange, M., Sermersheim, M., Ma, H., He, D., Steinberg, S. M., Higgins, R., Zhu, H., John, E., Zeng, C., Guan, J., and Ma, J. (2015). Modulation of wound healing and scar formation by MG53 protein-mediated cell membrane repair. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(40), 24592-24603.
- Li, J., Chen, J., and Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 9-18.
- Li, J., Zhang, Y. P., and Kirsner, R. S. (2003). Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microscopy Research and Technique*, 60(1), 107-114.
- Liang, C. C., Park, A. Y., and Guan, J. L. (2007). *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature Protocols*, 2(2), 329-333.
- Lichtman, M. K., Otero-vinas, M., and Falanga, V. (2016). Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. *Wound Repair and Regeneration*, 24(2), 215-222.
- Lim, H. W., Collins, S. A. B., Resneck, J. S., Bolognia, J. L., Hodge, J. A., Rohrer, T. A., Van Beek, M. J., Margolis, D. J., Sober, A. J., Weinstock, M. A., Nerenz, D. R., Smith

- Begolka, W., and Moyano, J. V. (2017). The burden of skin disease in the United States. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76(5), 958-972.
- Linley, E., Denyer, S. P., McDonnell, G., Simons, C., and Maillard, J. Y. (2012). Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1589-1596.
- Liu, Q., Yu, Z., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., and Chen, W. (2020). Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier. *Microbial Cell Factories*, 19(23), 1-11.
- Loo, A. E. K., Ho, R., and Halliwell, B. (2011). Mechanism of hydrogen peroxide-induced keratinocyte migration in a scratch-wound model. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(4), 884-892.
- Loo, A. E. K., Wong, Y. T., Ho, R., Wasser, M., Du, T., Ng, W. T., and Halliwell, B. (2012). Effects of hydrogen peroxide on wound healing in mice in relation to oxidative damage. *Plos One*, 7(11), 1-13.
- Lu, D. Y., Tang, C. H., Liou, H. C., Teng, C. M., Jeng, K. C., Kuo, S. C., Le, F. Y., and Fu, W. M. 2007. YC-1 attenuates LPS-induced proinflammatory responses and activation of nuclear factor- κ B in microglia. *British Journal of Pharmacology*, 151 (3), 396-405.
- Lu, Y., Lou, J., Liu, X., and Wang, S. (2017). Oxysophocarpine reduces oxygen-glucose deprivation-induced microglial activation and injury. *American Journal of Translational Research*, 9(5), 2266-2275
- Luk, P. P., Sinha, S. N., and Lord, R. (2005). Upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in faster-healing leg ulcers. *Journal of Wound Care*, 14(8), 373-381.
- Lukic, J., Chen, V., Strahinic, I., Begovic, J., Lev-Tov, H., Davis, S., Tomic-Canic, M., and Pastar, I. (2017). Probiotics or pro-healers: the role of beneficial bacteria in tissue repair. *Wound Repair Regeneration*, 25(6): 912-922
- Macneil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445(7130), 874-880.
- Maibach, H. and Honari, G. (2014). Skin Structure and Function. *Applied Dermatotoxicology : Clinical Aspects*, 1-10.
- Majtan, J. and Jesenak, M. (2018). β -Glucans: multi-functional modulator of wound healing. *Molecules*, 23(4), 1-15.
- Marinval, N., Saboural, P., Haddad, O., Maire, M., Bassand, K., Geinguenaud, F., Djaker, N., Akrou, K. B., de la Chapelle, M. L., Robert, R., Oudar, O., Guyot, E., Morizot, C. L., Sutton, A., Chauvierre, C., Chaubet, F., Charnaux, N., and Hlawaty, H. (2016). Identification of a pro-angiogenic potential and cellular uptake mechanism of a LMW highly sulfated fraction of fucoidan from *Ascophyllum nodosum*. *Marine Drugs*, 14(10), 1-21.

- Marshall, C. D., Hu, M. S., Leavitt, T., Barnes, L. A., Lorenz, H. P., and Longaker, M. T. (2018). Cutaneous scarring : basic science, current treatments, and future directions. *Advances in Wound Care*, 7(2), 29-45.
- Marshall, V. M. and Rawson, H. L. (1999). Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science & Technology*, 34(2), 137-143.
- Mastrullo, V., Cathery, W., Velliou, E., Madeddu, P., and Campagnolo, P. (2020). Angiogenesis in tissue engineering: as nature intended?. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(118), 1-13.
- Mathew-Steiner, S. S., Roy, S., and Sen, C. K. (2021). Collagen in wound healing. *Bioengineering*, 8(5), 1-15.
- Matou, S., Collic-Jouault, S., Galy-Fauroux, I., Ratiskol, J., Sinquin, C., Guezennec, J., Fischer, A. M., and Helley, D. (2005). Effect of an oversulfated exopolysaccharide on angiogenesis induced by fibroblast growth factor-2 or vascular endothelial growth factor *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*, 69(5), 751-759.
- Matsumoto, S., Tanaka, R., Okada, K., Arita, K., Hyakusoku, H., Miyamoto, M., Tabata, Y., and Mizuno, H. (2013) The effect of control-released basic fibroblast growth factor in wound healing: histological analyses and clinical application. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*, 1(6), 1-9.
- Maver, T., Maver, U., Pivec, T., Kurečič, M., Peršin, Z., and Kleinschek, K. S. (2018). *Bioactive Polysaccharide Materials for Modern Wound Healing* (First edition). Cham: Springer, 9, 24.
- Mazhary, Z., Fard, N. A., Minuchehr, Z., and Javanshir, N. (2020). Package of anti-allergic probiotic *Lactobacillus* by focusing on the regulatory role of immunosuppressive motifs in allergy. *Informatics in Medicine Unlocked*, 18, 100280.
- Menke, N. B., Ward, K. R., Witten, T. M., Bonchev, D. G., and Diegelmann, R. F. (2007). Impaired wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 19-25.
- Mescher, A. L. (2017). Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration*, 4(2), 39-53.
- Michael, D. R., Davies, T. S., Loxley, K. E., Allen, M. D., Good, M. A., Hughes, T. R., and Plummer, S. F. (2019). *In vitro* neuroprotective activities of two distinct probiotic consortia. *Beneficial Microbes*, 10(4), 437-447.
- Mirza, R. E., Fang, M. M., Ennis, W. J., and Koh, T. J. (2013). Blocking interleukin-1 β induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes*, 62(7), 2579-2587.
- Mirza, S., Hossain, M., Mathews, C., Martinez, P., Pino, P., Gay, J. L., Rentfro, A., McCormick, J. B., and Fisher-Hoch, S. P. (2012). Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF- α , IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican American: a cross-sectional study. *Cytokine*, 57(1), 136-142.

- Mizgerd, J. P., Spieker, M. R., and Doerschuk, C. M. (2001). Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNF receptor 1 and type I IL-1 receptor during *Escherichia coli* pneumonia in mice. *The Journal of Immunology*, 166(6), 4042-4048.
- Moghadam, S. S., Khodaii, Z., Zadeh, S. F., Ghooshchian, M., Aghmiyuni, Z. F., and Shabestari, T. M. (2018). Synergistic or antagonistic effects of probiotics and antibiotics- alone or in combination- on antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 13(3), 1-5.
- Mohammed, A., Seid, M. E., Gebrecherkos, T., Tiruneh, M., and Moges, F. (2017). Bacterial isolates and their antimicrobial susceptibility patterns of wound infections among inpatients and outpatients attending the university of gondar referral hospital Northwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology*, 2017, 1-11.
- Mohammedsaeed, W., Cruickshank, S., McBain, A. J., and O'Neill, C. A. (2015). *Lactobacillus rhamnosus* GG lysate increases re-epithelialization of keratinocyte scratch assays by promoting migration. *Scientific Reports*, 5(1), 1-11.
- Mohseni, S., Bayani, M., Bahmani, F., Tajabadi-ebrahimi, M., Bayani, M. A., Jafari, P., and Asemi, Z. (2018) The effects of probiotic administration on wound healing and metabolic status in patients with diabetic foot ulcer : a randomized, double-blind, placebo-controlled trial , *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, 34(3), 1-25.
- Mojibi, P., Tafvizi, F., and Bikhof Torbati, M. (2019). Cell-bound exopolysaccharide extract from indigenous probiotic bacteria induce apoptosis in HT-29 cell-line. *Iranian Journal of Pathology*, 14(1), 41-51.
- Monteiro, C. R. A. V., Carmo, M. S. do, Melo, B. O., Alves, M. S., Santos, C. I. dos, Monteiro, S. G., Bomfim, M. R. Q., Fernandes, E. S., and Monteiro-Neto, V. (2019). *In vitro* antimicrobial activity and probiotic potential of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* against species of *Clostridium*. *Nutrients*, 11(2), 448.
- Muniandy, K., Gothai, S., Badran, K. M. H., Kumar, S. S., Esa, N. M., and Arulselvan, P. (2018). Suppression of proinflammatory cytokines and mediators in LPS-Induced RAW 264.7 macrophages by stem extract of *Alternanthera sessilis* via the inhibition of the NF- κ B pathway. *Journal of Immunology Research*, 2018(3430684), 1-12.
- Murphree, R. W. (2017). Impairments in skin integrity. *Nursing Clinics of North Am*, 52(3), 405-417.
- Murray, R. Z., West, Z. E., Cowin, A. J., and Farrugia, B. L. (2019). Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns & Trauma*, 7(2), 1-9.
- Nagarajan, V., Peng, M., Tabashsum, Z., Salaheen, S., Padilla, J., and Biswas, D. (2019). Antimicrobial effect and probiotic potential of phage resistant *Lactobacillus plantarum* and its interactions with zoonotic bacterial pathogens. *Foods*, 8(194), 1-13.
- Nagoba, B. S., Selkar, S. P., Wadher, B. J., and Gandhi, R. C. (2013). Acetic acid treatment of pseudomonal wound infections-a review. *Journal of Infection and Public Health*, 6(6), 410-415.

- Nazir, Y., Hussain, S. A., Hamid, A. A., and Song, Y. (2018). Probiotics and their potential preventive and therapeutic role for cancer, high serum cholesterol, and allergic and HIV diseases. *BioMed Research International*, 2018(3428437), 1-18.
- Negut, I., Grumezescu, V., and Grumezescu, A. M. (2018). Treatment strategies for infected wounds. *Molecules*, 23(9), 1-23.
- Neuman, M. G., Nanau, R. M., Oruña-Sanchez, L., and Coto, G. (2015). Hyaluronic acid and wound healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 18(1), 53-60.
- Niculescu, A. G. and Grumezescu, A. M. (2022). An up-to-date review of biomaterials application in wound management. *Polymers*, 14(3), 1-24.
- Nour, S., Imani, R., Khodaei, M., Alizadeh, A., Rabiee, N., and Moazzeni, S. M. (2019). A review of accelerated wound healing approaches: biomaterial-assisted tissue remodeling. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(10), 1-15.
- Nunan, R., Harding, K. G., and Martin, P. (2014). Clinical challenges of chronic wounds : searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Disease Models & Mechanisms*, 7(11), 1205-1213.
- Nwodo, U. U., Green, E., and Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002-14015.
- Nyman, E., Henricson, J., Ghafouri, B., Anderson, C. D., and Kratz, G. (2019). Experimental hyaluronic acid accelerates re-epithelialization and alters protein expression in a human wound model. *Plastic and Reconstructive Surgery – Global Open*, 7(5), 1-7.
- O'Mahony, L., Akdis, M., and Akdis, C. A. (2011). Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *Mechanisms of Allergic Diseases*, 128(6), 1153-1162.
- Ogawa, R. (2019). *Total Scar Management: From Lasers to Surgery for Scars, Keloids, and Scar Contractures* (First edition). Singapore: Springer, 4.
- Olczyk, P., Mencner, Ł., and Komosinska-Vassev, K. (2014). The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *BioMed Research International*, 2014(747584), 1-8.
- Ong, J. S., Taylor, T. D., Yong, C. C., Khoo, B. Y., Sasidharan, S., Choi, S. B., Ohno, H., and Liong, M. T. (2019). *Lactobacillus plantarum* USM8613 aids in wound healing and suppresses *Staphylococcus aureus* infection at wound sites. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(1), 125-137.
- Ozgurtas, T., Aydin, I., Tapan, S., Avci, O., and Erbil, M. K. (2008). Bilberry inhibits angiogenesis in chick chorioallantoic membrane. *BioFactors*, 33(3), 161-164.
- Pandey, K. R., Naik, S. R., and Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577-7587.

- Paradise, R. K., Lauffenburger, D. A., and Van Vliet, K. J. (2011). Acidic extracellular pH promotes activation of integrin $\alpha\text{v}\beta 3$. *PloS One*, 6(1), 1-12.
- Paradise, R. K., Whitfield, M. J., Lauffenburger, D. A., and Vliet, K. J. Van (2013). Directional cell migration in an extracellular pH gradient : a model study with an engineered cell line and primary microvascular endothelial cells. *Experimental Cell Research*, 319(4), 487-497.
- Park, J. E., Abrams, M. J., Efron, P. A., and Barbul, A. (2013). Excessive nitric oxide impairs wound collagen accumulation. *Journal of Surgical Research*, 183(1), 487-492.
- Park, J. W., Hwang, S. R., and Yoon, I. S. (2017). Advanced Growth factor delivery systems in wound management and skin regeneration. *Molecules*, 22(8), 1-20.
- Patapoutian, A., Tate, S., and Woolf, C. J. (2009). Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(1), 55-68.
- Pavel, T. I., Chircov, C., Rădulescu, M., and Grumezescu, A. M. (2020). Regenerative wound dressings for skin cancer. *Cancers*, 12(10), 2954.
- Peral, M. C., Martinez, M. A. H., and Valdez, J. C. (2009). Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns. *International Wound Journal*, 6(1), 73-81.
- Pinto, D., Marzani, B., Minervini, F., Calasso, M., Giuliani, G., Gobbetti, M., and Angelis, M. D. (2011). Peptides plantaricin A synthesized by *Lactobacillus plantarum* induces *in vitro* proliferation and migration of human keratinocytes and increases the expression of TGF- $\beta 1$, FGF7, VEGF-A and IL-8 genes. *Peptides*, 32(9), 1815-1824.
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Vilchez-Padial, L. M., and Gil, A. (2017). Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. *Nutrients*, 9(6), 555.
- Portela, R., Leal, C. R., Almeida, P. L., and Sobral, R. G. (2019). Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microbial Biotechnology*, 12(4), 586-610.
- Potekaev, N. N., Borzykh, O. B., Medvedev, G. V., Pushkin, D. V., Petrova, M. M., Petrov, A. V., Dmitrenko, D. V., Karpova, E. I., Demina, O. M., and Shnayder, N. A. (2021). The role of extracellular matrix in skin wound healing. *Journal of Clinical Medicine*, 10(24), 1-14.
- Poutahidis, T., Kearney, S. M., Levkovich, T., Qi, P., Varian, B. J., Lakritz, J. R., Ibrahim, Y. M., Chatzigiagkos, A., Alm, E. J., and Erdman, S. E. (2013). Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin. *Plos One*, 8(10), 1-17.
- Prabhurajeshwar, C. and Chandrakanth, K. (2019). Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria *in-vitro* by probiotic lactobacilli strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental*, 23, 97-115.

- Prince, T., McBain, A. J., and Neill, C. A. O. (2012). *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-induced cell death by competitive exclusion. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5119-5126.
- Raja, K. S., Garcia, M. S., and Isseroff, R. R. (2007). Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Frontiers in Bioscience*, 12(3), 2849-2868.
- Ramawat, K. G. and Merillon, J. M. (2015). *Polysaccharides* (First edition). Switzerland: Springer, 2137, 2150.
- Ramos, A. N., Sesto Cabral, M. E., Nosedá, D., Bosch, A., Yantorno, O. M., and Valdez, J. C. (2012). Antipathogenic properties of *Lactobacillus plantarum* on *Pseudomonas aeruginosa*: the potential use of its supernatants in the treatment of infected chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 20(4), 552-562.
- Rangaraj, A. G., Harding, K. G., and Leaper, D. (2011). Role of collagen in wound management. *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*, 7(2), 54-63.
- Ranjha, M. M. A. N., Shafique, B., Batool, M., Kowalczewski, P. Ł., Shehzad, Q., Usman, M., Manzoor, M. F., Zahra, S. M., Yaqub S., and Aadil, R. M. (2021). Nutritional and health potential of probiotics: a review. *Applied Sciences*, 11(23), 11204.
- Rathinamoorthy, R. and Sasikala, L. (2011). Polysaccharide fibers in wound management. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 38-44.
- Reinke, J. M. and Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35-43.
- Rhee, S. (2009). Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Experimental & Molecular Medicine*, 41(12), 858-865.
- Rippa, A. L., Kalabusheva, E. P., and Vorotelyak, E. A. (2019). Regeneration of dermis : scarring and cells involved. *Cells*, 8(6), 1-30.
- Rodrigues, K. L., Gaudino Caputo, L. R., Tavares Carvalho, J. C., Evangelista, J., and Schneedorf, J. M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(5), 404-408.
- Rowan, M. P., Cancio, L. C., Elster, E. A., Burmeister, D. M., Rose, L. F., Natesan, S., Chan, R. K., Christy, R. J., and Chung, K. K. (2015). Burn wound healing and treatment : review and advancements. *Critical Care*, 19(1), 1-12.
- Sabino, F. and Auf dem Keller, U. (2015). Matrix metalloproteinases in impaired wound healing. *Metalloproteinases In Medicine*, 2, 1-8.
- Sahana, T. G. and Rekha, P. D. (2019). A bioactive exopolysaccharide from marine bacteria *Alteromonas* sp. PRIM-28 and its role in cell proliferation and wound healing *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 10-18.

- Sahana, T. G. and Rekha, P. D. (2020). A novel exopolysaccharide from marine bacterium *Pantoea* sp. YU16-S3 accelerates cutaneous wound healing through Wnt/ β -catenin pathway. *Carbohydrate Polymers*, 238, 116191.
- Salimi Elizei, S., Poormasjedi-Meibod, M. S., Wang, X., Kheirandish, M., and Ghahary, A. (2017). Kynurenic acid downregulates IL-17/IL-23 axis *in vitro*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 431(1), 55-65.
- Sanlibaba, P. and Çakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology: Open Access*, 2(2), 1-5.
- Savari, R., Shafiei, M., Galehdari, H., and Kesmati, M. (2019). Expression of VEGF and TGF- β genes in skin wound healing process induced using phenytoin in male rats. *Jundishapur Journal of Health Sciences*, 11(1), 1-5.
- Savitskaya, I. S., Shokatayeva, D. H., Kistaubayeva, A. S., Ignatova, L. V., and Digel, I. E. (2019). Antimicrobial and wound healing properties of a bacterial cellulose based material containing *B. subtilis* cells. *Heliyon*, 5(10), 1-11.
- Sawicka, K. M., Seeliger, M., Musaev, T., Macri, L. K., and Clark, R. A. F. (2015). Fibronectin interaction and enhancement of growth factors: importance for wound healing. *Advances in Wound Care*, 4(8), 469-478.
- Schmid, J., Sieber, V., and Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6, 496.
- Schwarz, R. I. (2015). Collagen I and the fibroblast: high protein expression requires a new paradigm of post-transcriptional, feedback regulation. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 3, 38-44.
- Selvakumar, G., Iyappan, K., and Suguna, L. (2020). Biomaterials and wound healing: a mini review. *Annals of Operative Surgery*, 1(1004), 10-12.
- Sen, C. K. (2019). Human wounds and its burden: an updated compendium of estimates. *Advances in Wound Care*, 8(2), 39-48.
- Shah, P., Keppler, L., and Rutkowski, J. (2014). A review of platelet derived growth factor playing pivotal role in bone regeneration. *Journal of Oral Implantology*, 40(3), 330-340.
- Shahin, H., Elmasry, M., Steinvall, I., Söberg, F., and El-Serafi, A. (2020). Vascularization is the next challenge for skin tissue engineering as a solution for burn management. *Burns & Trauma*, 8, 1-12.
- Shai, A., Maibach, H. I. (2005). *Wound Healing and Ulcers of the Skin* (First edition). Berlin: Springer, 7, 15.
- Shaikh-Kader, A., Houreld, N. N., Rajendran, N. K., and Abrahamse, H. (2021). Levels of cyclooxygenase 2, interleukin-6, and tumour necrosis factor- α in fibroblast cell culture models after photobiomodulation at 660 nm. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1-13.

- Shankar, M., Ramesh, B., Kumar, D. R., and Niranjana, B. M. (2014). Wound healing and its importance-a review. *Der Pharmacologia Sinica*, 1(1), 24-30.
- Shanmugam, M. and Abirami, R. G. (2019). Microbial polysaccharides- chemistry and applications. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 9(1), 73-78.
- Shiomi, T., Lemaître, V., D'Armiento, J., and Okada, Y. (2010). Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathology International*, 60(7), 477-496.
- Shirzad, M., Hamed, J., Motevaseli, E., and Modarressi, M. H. (2018). Anti-elastase and anti-collagenase potential of Lactobacilli exopolysaccharides on human fibroblast. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup1), 1051-1061.
- Sinha, A., Sagar, S., Madhumathy, M., and Osborne, W. J. (2019). Probiotic bacteria in wound healing; an *in-vivo* study. *Iranian Journal of Biotechnology*, 17(4), 11-15.
- Sirin, S. and Aslim, B. (2020). Characterization of lactic acid bacteria derived exopolysaccharides for use as a defined neuroprotective agent against amyloid beta 1–42-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Scientific Reports*, 10(1), 1-18.
- Sirin, S. and Aslim, B. (2021). Protective effect of exopolysaccharides from lactic acid bacteria against amyloid beta1-42induced oxidative stress in SH-SY5Y cells: Involvement of the AKT, MAPK, and NF- κ B signaling pathway. *Process Biochemistry*, 106, 50-59.
- Sood, A., Gupta, A., and Agrawal, G. (2021). Recent advances in polysaccharides based biomaterials for drug delivery and tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 1-24.
- Stunova, A. and Vistejnova, L. (2018). Dermal fibroblasts- a heterogeneous population with regulatory function in wound healing. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 39, 137-150.
- Su, W. H., Cheng, M. H., Lee, W. L., Tsou, T. S., Chang, W. H., Chen, C. S., and Wang, P. H. (2010). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for wounds: pain relief or excessive scar formation?. *Mediators of Inflammation*, 2010, 1-8.
- Summerfield, A., Meurens, F., and Ricklin, M. E. (2015). The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Molecular Immunology*, 66(1), 14-21.
- Sun, M. L., Zhao, F., Chen, X. L., Zhang, X. Y., Zhang, Y. Z., Song, X. Y., Sun, C. Y., and Yang, J. (2020). Promotion of wound healing and prevention of frostbite injury in rat skin by exopolysaccharide from the arctic marine bacterium *Polaribacter* sp. SM1127. *Marine Drugs*, 18(1), 48.
- Sutton, S. (2011). Measurement of microbial cells by optical density. *Journal of Validation Technology*, 17(1), 46-49.

- Suzuki, A., Maeda, T., Baba, Y., Shimamura, K., and Kato, Y. (2014). Acidic extracellular pH promotes epithelial mesenchymal transition in Lewis lung carcinoma model. *Cancer Cell International*, 14(1), 1-11.
- Sveen, L. R., Timmerhaus, G., Krasnov, A., Takle, H., Handeland, S., and Ytteborg, E. (2019). Wound healing in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Scientific Reports*, 9(1), 1-16.
- Szóstek-Mioduchowska, A. Z., Baclawska, A., Okuda, K., and Skarzynski, D. J. (2019). Effect of proinflammatory cytokines on endometrial collagen and metalloproteinase expression during the course of equine endometrosis. *Cytokine*, 123, 154767.
- Taherian, M., Mahin, P., Rastegar, H., Faramarzie, M. A., Rostami-Nejad, M., Yazdic, M. H., Rezaei-Tavirani, M., and Yazdi, Z. (2019). An overview on probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18, 31-50.
- Tan, N. S., Michalik, L., Di-Poï, N., Ng, C. Y., Mermoud, N., Roberts, A. B., Dersvergne, B., and Wahli, W. (2004). Essential role of Smad3 in the inhibition of inflammation-induced PPAR β/δ expression. *The EMBO Journal*, 23(21), 4211-4221.
- Tang, J., Liu, H., Gao, C., Mu, L., Yang, S., Rong, M., Zhang, Z., Liu, J., Ding, Q., and Lai, R. (2014). A small peptide with potential ability to promote wound healing. *Plos One*, 9(3), 1-10.
- Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. R., and Rowland, I. (2012). *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18(5), 530-538.
- Tengood, J. E., Ridenour, R., Brodsky, R., Russell, A. J., and Little, S. R. (2011). Sequential delivery of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor for angiogenesis. *Tissue Engineering Part A*, 17(9-10), 1181-1189.
- Thomas, C. M., Hong, T., Pijkeren, J. P. Van, Hemarajata, P., Trinh, D. V., Hu, W., Britton, R. A., Kalkum, M., and Versalovic, J. (2012). Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling , *Plos One*, 7(2), 1-15.
- Thulabandu, V., Chen, D., and Atit, R. (2018). Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 7(2), 1-19.
- Tonnesen, M. G., Feng, X., and Clark, R. A. F. (2000). Angiogenesis in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 5(1), 40-46.
- Trabelsi, I., Ktari, N., Slima, S. B., Triki, M., Bardaa, S., Mnif, H., and Salah, R. B. (2017). Evaluation of dermal wound healing activity and *in vitro* antibacterial and antioxidant activities of a new exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp.Ca6. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 194-201.
- Tracy, L. E., Minasian, R. A., and Caterson, E. J. (2016). Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Advances in Wound Care*, 5(3), 119-136.

- Tsuda, H., Hara, K., and Miyamoto, T. (2008) Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *Journal of Dairy Science*, 91(8), 2960-2966.
- Tukenmez, U., Aktas, B., Aslim, B., and Yavuz, S. (2019). The relationship between the structural characteristics of lactobacilli-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells *in vitro*. *Scientific Reports*, 9(1), 1-14.
- Turner, K. H., Everett, J., Trivedi, U., Rumbaugh, K. P., and Whiteley, M. (2014). Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* acute burn and chronic surgical wound infection. *Plos Genetics*, 10(7), 1-12.
- Veeraperumal, S., Qiu, H., Zeng, S. S., Yao, W. Z., Wang, B. P., Liu, Y., and Cheong, K. L. (2020). Polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis* promote the HaCaT keratinocytes wound healing by polarised and directional cell migration. *Carbohydrate Polymers*, 241(116310), 1-10.
- Veith, A. P., Henderson, K., Spencer, A., Sligar, A. D., and Baker, A. B. (2019). Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 146, 97-125.
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.
- Verrecchia, F. and Mauviel, A. (2007). Transforming growth factor- β and fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*, 13(22), 3056-3062.
- Vivarelli, S., Falzone, L., Basile, M. S., Nicolosi, D., Genovese, C., Libra, M., and Salmeri, M. (2019). Benefits of using probiotics as adjuvants in anticancer therapy. *World Academy of Sciences Journal*, 1(3), 125-135.
- Walter, M. N., Wright, K. T., Fuller, H. R., MacNeil, S., and Johnson, W. E. B. (2010). Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an *in vitro* study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Experimental Cell Research*, 316(7), 1271-1281.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., and Yang, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 125, 16-25.
- Wang, L., Shang, Q., Guo, W., Wu, X., Wu, L., Wu, L., and Chen, T. (2020). Evaluation of the hypoglycemic effect of probiotics via directly consuming glucose in intestines of STZ-induced diabetic mice and glucose water-induced diabetic mice. *Journal of Functional Foods*, 64, 1-9.
- Wang, T., He, R., Zhao, J., Mei, J. C., Shao, M. Z., Pan, Y, Zhang, J., Wu, H. S., Yu, M, Yan, W. C., Liu, F., and Jia, W. P. (2017). Negative pressure wound therapy inhibits inflammation and upregulates activating transcription factor-3 and downregulates nuclear factor- κ B in diabetic patients with foot ulcerations. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 33(4), 1-9.

- Wang, W. Y, Kent III, R. N., Huang, S. A., Jarman, E. H., Shikanov, E. H., Davidson, C. D., Hiraki, H. L., Lin, D., Wall, M. A., Matera, D. L., Shin, J. W., Polacheck, W. J., Shikanov, A., and Baker, B. M. (2021). Direct comparison of angiogenesis in natural and synthetic biomaterials reveals that matrix porosity regulates endothelial cell invasion speed and sprout diameter. *Acta Biomaterialia*, 135, 260-273.
- Wang, X. W., Yu, Y., and Gu, L. (2014). Dehydroabietic acid reverses TNF- α -induced the activation of FOXO1 and suppression of TGF- β 1/Smad signaling in human adult dermal fibroblasts. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(12), 8616-8626.
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., Yibing, W., and Li, W. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(5), 521.
- Wasserbauer, S., Perez-Meza, D., and Chao, R. (2008). Hydrogen peroxide and wound healing: a theoretical and practical review for hair transplant surgeons. *Dermatologic Surgery*, 34(6), 745-750.
- Werner, S., Krieg, T., and Smola, H. (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(5), 998-1008.
- Whitney, J. D. (2005). Overview: acute and chronic wounds. *Nursing Clinics*, 40(2), 191-205.
- Wietecha, M. S., and DiPietro, L. A. (2013). Therapeutic approaches to the regulation of wound angiogenesis. *Advances in Wound Care*, 2(3), 81-86.
- Wilgus, T. A., Roy, S., and McDaniel, J. C. (2013). Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Advances in Wound Care*, 2(7), 379-388.
- Witte, M. B. and Barbul, A. (2002). Role of nitric oxide in wound repair. *The American Journal of Surgery*, 183(4), 406-412.
- Wojtowicz, A. M., Oliveira, S., Carlson, M. W., Zawadzka, A., Rousseau, C. F., and Baksh, D. (2014). The importance of both fibroblasts and keratinocytes in a bilayered living cellular construct used in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 22(2), 246-255.
- Wong, M. L., Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-88.
- Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J., and Wong, J. K. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology*, 25(2), 92-98.
- Wulff, B. C. and Wilgus, T. A. (2013). Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye?. *Experimental Dermatology*, 22(8), 507-510.
- XS, B. N. (2018). Review on general effective & therapeutic diabetic wound management. *Current Research in Diabetes & Obesity Journal*, 8(4), 65-73.
- Xu, S. Q., Qin, Y., Wang, C., Ye, G., Wu, C., Wang, X. M., Pan, D. B., Wang, S., and Jiang, J. Y. (2016). Recombinant human acid fibroblast growth factor accelerates skin wound

- healing in diabetic rats through promoting fibroblast proliferation and angiogenesis. *International Journal of Clinical & Experimental Medicine*, 9(6), 9161-9169.
- Xu, Z., Liang, B., Tian, J., and Wu, J. (2021). Anti-inflammation biomaterial platforms for chronic wound healing. *Biomaterials Science*, 9(12), 4388-4409.
- Xue, M. and Jackson, C. J. (2015). Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Advances in Wound Care*, 4(3), 119-136.
- Yamada, Y., Mashima, H., Sakai, T., Matsushashi, T., Jin, M., and Ohnishi, H. (2013). Functional roles of TGF- β 1 in intestinal epithelial cells through Smad-dependent and non-Smad pathways. *Digestive Diseases and Sciences*, 58(5), 1207-1217.
- Yang, S., Wang, J., Brand, D. D., and Zheng, S. G. (2018). Role of TNF–TNF receptor 2 signal in regulatory T cells and its therapeutic implications. *Frontiers in Immunology*, 9, 1-11.
- Yang, W. T., Ke, C. Y., Wu, W. T., Tseng, Y. H., and Lee, R. P. (2020). Antimicrobial and anti-inflammatory potential of *Angelica dahurica* and *Rheum officinale* extract accelerates wound healing in *Staphylococcus aureus*-infected wounds. *Scientific Reports*, 10(1), 1-10.
- Yeh, C. J., Chen, C. C., Leu, Y. L., Lin, M. W., Chiu, M. M., and Wang, S. H. (2017). The effects of artocarpin on wound healing: *in vitro* and *in vivo* studies. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
- You, S., Shi, X., Yu, D., Zhao, D., An, Q., Wang, D., Zhang, J., Li, M., and Wang, C. (2021). Fermentation of *Panax notoginseng* root extract polysaccharides attenuates oxidative stress and promotes type I procollagen synthesis in human dermal fibroblast cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 1-11.
- Yu, R., Zhang, H., and Guo, B. (2022). Conductive biomaterials as bioactive wound dressing for wound healing and skin tissue engineering. *Nano-Micro Letters*, 14(1), 1-46.
- Yussof, S. J. M., Omar, E., Pai, D. R., and Sood, S. (2012). Cellular events and biomarkers of wound healing. *Indian Journal of Plastic Surgery*, 45(02), 220-228.
- Zapata, A. and Arcos, R. S. (2015). A comparative study of McFarland turbidity standards and the Densimat photometer to determine bacterial cell density. *Current Microbiology*, 70(6), 907-909.
- Zhang, C., He, Y., Chen, Z., Shi, J., Qu, Y., & Zhang, J. (2019). Effect of polysaccharides from *Bletilla striata* on the healing of dermal wounds in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 1-9.
- Zhang, X., Shu, W., Yu, Q., Qu, W., Wang, Y., and Li, R. (2020). Functional biomaterials for treatment of chronic wound. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(516), 1-15.
- Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C., and Xue, M. (2016). Inflammation in chronic wounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 1-14.

- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., and Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2758.
- Zhou, L., Yan, C., Gieling, R. G., Kida, Y., Garner, W., Li, W., and Han, Y. P. (2009). Tumor necrosis factor- α induced expression of matrix metalloproteinase-9 through p21-activated kinase-1. *BMC Immunology*, 10(1), 1-15.
- Zhu, G., Wang, Q., Lu, S., and Niu, Y. (2017). Hydrogen peroxide : A potential wound therapeutic target. *Medical Principles and Practice*, 26(4), 301-308.
- Zi, Z., Chapnick, D. A., and Liu, X. (2012). Dynamics of TGF- β /Smad signaling. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 586(14), 1921-1928.





GAZİ GELECEKTİR..