



**MİKROBİYAL KAYNAKLI β -GLUKAN VE EKZOPOLİSAKKARİT (EPS)
KOMBİNASYONLARININ YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİ
MEKANİZMASININ ORTAYA KONULMASI VE BİYOMALZEME
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Mesut ABANUZOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2024

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.

Mesut ABANUZOĞLU

06/08/2024

MİKROBİYAL KAYNAKLI β -GLUKAN VE EKZOPOLİSAKKARİT (EPS)
KOMBİNASYONLARININ YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİ
MEKANİZMASININ ORTAYA KONULMASI VE BİYOMALZEME OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Mesut ABANUZOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2024

ÖZET

Cilt yaraları hastaların yaşam kalitesinin düşmesine, yüksek tıbbi maliyetlere, hatta amputasyon ve ölümlere yol açan bir sağlık sorunudur. Bu durumun engellenmesi için yara iyileşmesinde çoklu etki mekanizmasına sahip, biyouyumlu, biyoaktif ve biyobozunur biyopolimerlerin keşfedilmesine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada mikrobiyal kaynaklı β -glukan, *Lactopantibacillus plantarum* GD2 ekzopolisakkariti ve bunların kombinasyonlarının yara iyileşmesindeki etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. *In vitro* çalışmalar için fare fibroblast ve makrofaj hücre hatları kullanılmıştır. Biyopolimerlerin biyouyumluluğu, hücre canlılığı esas alınarak MTT analizi ile belirlenmiştir. *In vitro* yara modeli aracılığıyla uygulama gruplarının hücre migrasyonu üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir. Uygulama gruplarının gen ifadesine etkisi qRT PCR aracılığıyla tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda alınan olumlu sonuçların protein ifadesine yansımaları western blot analiziyle test edilmiştir. MTT analizinden elde edilen sonuçlar, EPS ve β -glukan biyopolimerlerinin sitotoksik olmadığını ve biyouyumlu olduğunu göstermiştir. *In vitro* yara modelinde test edilen tüm uygulama gruplarının hücre migrasyonunu indüklemesiyle birlikte en etkili sonuçlar kombinasyon uygulamasında alınmıştır. Fibroblastlarda uygulama gruplarının çeşitli zamanlarda etkili gen ifadeleri olsa da en etkili sonuçlar kombinasyon uygulamasında görülmektedir. Uyarılmış makrofaj hücrelerinde, pro-inflamatuar sitokinler sadece β -glukan uygulamasında baskılanmıştır. Bununla birlikte EPS'nin dahil olduğu gruplarda inflammatuar fenotipte artış görülmektedir. Makrofajlarda çalışılan anti-inflamatuar sitokinlerde tüm uygulama grupları, gen ifade düzeylerini arttırmıştır. Western blotlama çalışmalarında anti-inflamatuar etki açısından özellikle kombinasyonu grubu IL-4 ve IL10 proteinlerinin ifade düzeylerini arttırdığı gözlemlenmiştir. Çalışma sonuçları, iki farklı biyopolimer ve kombinasyonunun cilt yaralarında fibroblastları aktive ederek ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin sentezinin uyarılması ile indüklenen migrasyonunun yara kapanmasında etkili olabileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda, bu biyopolimerler ve kombinasyonlarının yara iyileşmesinde anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar sitokin aracılı inflamasyonun dengelenmesi ile de rejeneratif süreçlere yardımcı olabilir.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : Yara iyileşmesi, β -glukan, ekzopolisakkarit (EPS), biyopolimer
Sayfa Adedi : 97
Danışman : Prof. Dr. Belma ASLIM

INVESTIGATION OF THE EFFECT MECHANISM OF MICROBIALY DERIVED β -
GLUCAN AND EXOPOLYSACCHARIDE (EPS) COMBINATIONS ON WOUND
HEALING AND EVALUATION AS BIOMATERIALS

(M. Sc. Thesis)

Mesut ABANUZÖĞLU

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

August 2024

ABSTRACT

Skin wounds are a health problem that leads to a decrease in patients' quality of life, high medical costs, and even amputation and death. In order to prevent this situation, there is a need to discover biocompatible, bioactive and biodegradable biopolymers with multiple mechanisms of action in wound healing and to develop new treatment strategies in which these biopolymers can be used. This study aimed to reveal the effects of microbial-derived β -glucan, *Lactopantibacillus plantarum* GD2 exopolysaccharide (EPS) and their combinations on wound healing. Mouse fibroblast and mouse macrophage cell lines were used for in vitro studies. Biocompatibility of biopolymers was determined by MTT analysis based on cell viability. The effect of application groups on cell migration was observed through an in vitro wound model. Gene expression results from the application groups were determined by qRT PCR. The reflection of the positive results obtained in these studies on protein expression was tested by western blot analysis. Results from MTT analysis showed that EPS and β -glucan biopolymers were non-cytotoxic and biocompatible. While all application groups tested in the in vitro wound model induced cell migration, the most effective results were obtained in combination application. Although application groups have effective gene expression at various times in fibroblasts, the most effective results are seen in combination application. In stimulated macrophage cells, pro-inflammatory cytokines were suppressed only by β -glucan application. However, there is an increase in the inflammatory phenotype in groups including EPS. All application groups increased gene expression levels of anti-inflammatory cytokines studied in macrophages. In Western blotting studies, it was observed that especially the combination group increased the expression levels of IL-4 and IL10 proteins in terms of anti-inflammatory effect. Study results have shown that two different biopolymers and their combination can be effective in wound closure by activating fibroblasts in skin wounds and stimulating the synthesis of extracellular matrix (ECM) components. At the same time, these biopolymers and their combinations may aid regenerative processes by balancing anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokine-mediated inflammation in wound healing.

Science Code : 20309

Key Words : Wound healing, β -glucan, exopolysaccharite (EPS), biopolymer

Page Number : 97

Supervisor : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü olanağı sağlayan tez danışmanım sayın Belma ASLİM'a en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca bana deneylerde desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Serap NİĞDELİOĞLU DOLANBAY'a ve western blot çalışmaları için yardıma gelen Dr. Seda ŞİRİN'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarında birlikte çalıştığımız tüm ekip arkadaşlarıma, manevi desteğini esirgemeyen Mikrobiyoloji Laboratuvarından Adem YILMAZ'a ve Fransızca Öğretmenliği bölümünde olan beraber tiyatrodaki sahne aldığımız arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım. En önemlisi ise maddi manevi beni her türlü destekleyen aileme en kalbi duygularıyla teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans çalışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından FYL-2022-7969 NO'lu proje ile desteklenmiştir. Tez çalışması boyunca sağladıkları maddi katkılardan dolayı Gazi Üniversitesi BAP Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Yara İyileşmesi	5
2.2. Akut Yara İyileşmesi	6
2.2.1. Yara iyileşmesinde hemostaz fazı	6
2.2.2. Yara iyileşmesinde inflamasyon fazı.....	9
2.2.3. Yara iyileşmesinde proliferasyon fazı	14
2.2.4. Yeniden şekillenme (re-modelling)	17
2.3. Kronik Yaralar	18
2.4. Yara Bakım Maaliyetleri	21
2.5. Yaraya Uygun Terapötik Stratejiler.....	24
2.6. Biyoaktif Maddeler	25
2.6.1. Yara iyileşmesinde biyopolimerler.....	25
2.6.2. Yara iyileşmesinde ekzopolisakkaritler (EPS)	27
2.6.3. Yara iyileşmesinde β -glukanlar	31
3. MATERYAL VE METOD	35

	Sayfa
3.1. Bakteri Kültürü Çalışmaları.....	35
3.1.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizma	35
3.1.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmanın geliştirilmesi ve muhafaza edilmesi.....	35
3.1.3. GD2 suşundan EPS üretimi, saflaştırılması ve liyofilize EPS (L-EPS) eldesi.....	36
3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	37
3.2.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları	37
3.2.2. Hücrelerin geliştirilmesi ve muhafazası	37
3.2.3. Ticari β -glukanın çözdürülmesi.....	38
3.2.4. Hücre çalışmalarında kullanılan uygulama grupları.....	38
3.2.5. MTT analizi ile sitotoksitenin belirlenmesi	39
3.2.6. İn-vitro yara modeli	40
3.3. Gen Ekspresyon Çalışmaları.....	41
3.3.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	41
3.3.2. Genlerin transkripsiyonel analizi.....	43
3.3.3. Protein izolasyonu ve protein miktarının belirlenmesi.....	47
3.3.4. Western blotlama	48
3.4. İstatistiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	51
4.1. <i>Lactopantibacillus plantarum</i> GD2 Suşunun L-EPS Mikarı	51
4.2. Uygulama Gruplarının Sitotoksiste Sonuçları	51
4.3. Uygulama Gruplarının L929 Hücre Hattında İn-Vitro Yara Modeli Kapatma Sonuçları	54
4.4. Uygulama Gruplarının L929 Hücre Hattında Genlerin Gen İfadesi Sonuçları ..	58
4.5. Uygulama Gruplarının RAW264.7 Hücre Hattında Gen İfadesi Sonuçları	60
4.6. Uygulama Gruplarının RAW264.7 Hücre Hattında Protein İfadesinin Sonuçları	63

	Sayfa
5. TARTIŞMA.....	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	97



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Biyopolimer olarak kullanılan biyoaktif maddeler	26
Çizelge 3.1. MRS broth besiyeri ortamı içerikleri	35
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan hücrelerin özellikleri	37
Çizelge 3.3. Hücre çalışmalarında kullanılan uygulama grupları	38
Çizelge 3.4. qRT PCR da well plate kuyucuk başına kullanılan bileşen miktarları.....	43
Çizelge 3.5. L929 hücre hattında çalışılan genlerin primerleri	44
Çizelge 3.4. RAW264.7 hücre hattında çalışılan genlerin primer dizileri	46
Çizelge 3.7. Çalışılan genlerin qRT PCR koşulları.....	47
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılacak primer ve sekonder antikorlar	49

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin fazları.....	5
Şekil 2.2. Yara çeşitleri.....	6
Şekil 2.3. Kan pıhtısı oluşumu.....	7
Şekil 2.4. Akut yara iyileşmesinde bağışıklık hücreleri	9
Şekil 2.5. Yara iyileşmesi sırasında düzenleyici T hücreleri.....	13
Şekil 2.6. Kronik yara iyileşmesinde hücreler ve sitokinlerin ifadesi	19
Şekil 2.7. EPS çeşitleri	28
Şekil 2.8. Çalışılan EPS'nin ana yapısı	31
Şekil 2.9. β -glukan çeşitlerinde yapısal bağlanmalar	31
Şekil 3.1. Fibroblast çalışmalarında kullanılacak genlerin erime eğrisi.....	44
Şekil 3.2. DLK1 (A) ve FGF-2 (B) geninin primerine ait erime eğrisi.....	45
Şekil 3.3. Makrofaj çalışmalarında kullanılacak genlerin erime eğrisi	46
Şekil 4.1. L929 hücre hattında yüzde canlılık	52
Şekil 4.2. RAW264.7 hücre hattında LPS etkisi olmadan yüzde canlılık	53
Şekil 4.3. RAW264.7 hücre hattında LPS etkisinde yüzde canlılık	54
Şekil 4.4. L929 hücre hattında yara kapatmasının analizleri.....	56
Şekil 4.5. L929 hücre hattında yara kapatmasının analizleri.....	58
Şekil 4.6. L929 hücre hattında uygulamaların etkisinde gen ifadeleri	59
Şekil 4.7. RAW264.7 hücre hattında uygulamaların etkisinde pro-inflamatuar (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) gen ifadeleri	61
Şekil 4.8. RAW264.7 hücre hattında uygulamaların etkisinde anti-inflamatuar gen ifadeleri.....	62
Şekil 4.9. Pro-inflamatuar sitokinlerde western blot sonuçları	64
Şekil 4.10. Anti-İnflamatuar sitokinlerde 6 saatlik inkübasyonun western blot sonuçları	65

Şekil**Sayfa**

Şekil 4.11. Anti-İnflamatuvar sitokinlerde 18 saatlik inkübasyonun western blot sonuçları	66
---	----



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. İn-vitro yara modeli kapatma görüntüleri	55
Resim 4.2. İn-vitro yara modelinde yara kapatma görüntüleri	57



SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
β	Beta
α	Alfa
μ	Mikro
*	Deneydeki anlamlı sonuçlar

Kısaltmalar

Açıklamalar

COL1A1	Kollajen-1A1
DAMP	Hasarla ilişkili moleküler paternler
DLK1	Delta benzeri kanonik olmayan notch ligandı-1
ECM	Ekstraselüler matriks
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EPS	Ekzopolisakkarit
FBS	Fetal bovin serum
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FN	Fibronektin
Hetero-EPS	Heteroekzopolisakkaritler
Homo-EPS	Homoekzopolisakkaritler
IL	İnterlökin
L-EPS	Liyofilize EPS
MCP	Monosit kimyasal çekici protein
MMP	Matriks metaloproteazları
NET	Nötrofil hücre dışı tuzakları
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PF4	Trombosit faktörü-4

Kısaltmalar**Açıklamalar****PVDF**

Polivinil florür

ROS

Reaktif oksijen türleri

TGF- β 1Dönüştürücü büyüme faktörü- β 1**TGF- β 1**İnflamatuar fazın başlaması için elzem olan dönüştürücü büyüme faktörü- β 1**THP**

İnsanda monositik lösemi hücresi

TNF

Tümör nekroz faktörü

VEGF

Vasküler endotelyal büyüme faktörü

 α -SMA α -düz kas aktin filamenti

1. GİRİŞ

Deri, insan vücudunda bulunan ve tüm vücudu kaplayan en büyük organdır. En temel işlevlerinden biri, su bakımından zengin iç organların oldukça kuru dış ortama karşı izolasyonunu sağlayarak dehidrasyonu engellemektir (Swann, 2010). Bununla birlikte deri iç doku ve organları, mekanik hasardan, mikrobiyal enfeksiyonlardan, ultraviyole radyasyondan ve çeşitli sıcak/soğuk ortamlardan korur. Bu bağlamda deri her türlü ortamla temas eden bir dış bariyer olduğu için en çok yaralanmaya maruz kalan organdır (Rodrigues. Kosaric, Bonham ve Gurtner, 2019). Herhangi bir etki aracılığıyla bu bariyerin aşılıp doku-organ bütünlüğünün bozulması ve oluşan işlev kaybı ‘yara’ olarak değerlendirilir (Koyutürk ve Soyaslan, 2016). Yaralanma durumlarında güçlü bir yara iyileşmesi kapasitesine sahip olunması ve deri bütünlüğünün korunması, sağlıklı bir sağ kalım için temel unsurlardır (Almadani, Vorstenbosch, Davison ve Murphy, 2021).

Genel bağlamda yara iyileşmesi: hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme (remodeling) olmak üzere karmaşık denetim mekanizmalarına sahip birbirleriyle girintili dört aşamadan meydana gelir (Wang, Huang, Horng, Yeh ve Chen, 2018). Yaralar iyileşme sürecine göre akut ya da kronik olarak sınıflandırılmaktadır. Akut yaralar kendiliğinden iyileşen normal yara iyileşme süreçlerinin sekteye uğramadığı tam iyileşme ile sonuçlanan durumları ifade ederken; kronik yaralar ise yara iyileşme sürecinin herhangi bir basamağında yaranın iyileşme sürecinin devam etmediği ya da sağlıksız devam ettiği durumları ifade eder (Tottoli ve diğerleri, 2020). İyileşmeyen kronik yaralar dünya sağlık sistemlerine bakım maaliyeti olarak ciddi yükler bindirmektedir. Hizmet sektörünün ön planda olduğu gelişmiş ülkelerde ise sadece kronik yaralarla ilgili harcamalar toplam sağlık harcamalarının %3'ünü oluşturduğu tahmin edilmektedir (Olsson ve diğerleri, 2019). Bu durumun bir örneği olarak yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde, iyileşmeyen yaralar her yıl yaklaşık 50 milyar dolar, cerrahi insizyon ve travma yara izlerini yaklaşık 12 milyar dolar ve yanıklar her yıl 7,5 milyar dolar sağlık bakım maliyetine tekabül etmektedir. Diyabetli hastalar, yaşlılar ve orak hücreli gibi genetik bozuklukları olan hastalar uzun süreli doku bozukluğuna yol açan anormal yara iyileşmesine özellikle yatkındır (Rodrigues ve diğerleri, 2019). Artan yaşlı nüfusun, dünya çapında artan diyabet riskiyle birleşmesi, kronik yaraların sağlık bakım maliyetlerine ve vakanın morbiditesine önemli bir katkıda bulunur (Goldberg ve Diegelmann, 2020). Dhivya ve arkadaşları tarafından yayınlanan 2015 tarihli bir makalede yaraları tedavi etmek için 3000'den fazla ürün geliştirilmesine rağmen,

milyonlarca insanın uygun tedavi ve bakıma ihtiyaç duyduğu belirtilmektedir. Bu durum topluma ve bireylere hala ciddi manada yük olmaya devam etmektedir (Dhivya, Padma ve Santhini, 2015). Özellikle aşırı yük taşıyan sağlık sistemlerinde, çok sayıda klinisyen tarafından gerçekleştirilen yara bakımının zaman ve maliyetlerinin üstesinden gelmek için yeni yara örtülerinin geliştirilmesine büyük bir talep vardır (Costa ve diğerleri, 2021). Bu tedavilerdeki zorlukların ve maliyetlerin üstesinden gelebilmek için farklı metodolojiler geliştirilmesi ve yara iyileşmesini olumlu etkileyebilecek farklı etken maddelerin araştırılması gerekmektedir. Yara iyileşmesi devinimsel bir süreç olduğundan, yaranın inflamasyon ve proliferasyon gibi erken evrelerinde etkin yönetimi oldukça önemlidir. Bu yaklaşım iyileşme sürecinin kronikleşmesinin engellenmesi açısından en etkin önleme stratejilerindendir (Sahana ve Rekha, 2018). Bu doğrultuda disiplinler arası yaklaşımlardaki ilerlemeler nedeniyle biyoaktif malzemeler, akıllı yara bakım malzemeleri olarak kullanılabilecek umut verici sonuçlar göstermiştir (Dickinson ve Gerecht, 2016; Hamdan ve diğerleri, 2017). Geleneksel yara örtüleri çoğunlukla ucuz ve üretimi kolay yara örtüleri olmasına rağmen; biyolojik olarak aktif olmaması sebebiyle kullanım alanı çok kısıtlıdır. Yara örtüsü maliyetlerini düşürürken bunun yara iyileşme süreçlerine doğrudan ya da dolaylı şekilde pozitif etkisi olabilecek biyoaktif malzemeler ve etken maddelerle sağlanması gerekmektedir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda pek çok sentetik ve doğal polimer (biyopolimer) kullanılmaktadır. Doğal polimerler ya da biyopolimerler canlı bir organizma tarafından sentezlenen organik moleküllerdir. Biyopolimerlerin yara bakım materyali olarak kullanımı, mükemmel biyoyumluluk, hücre büyümesini destekleme yeteneği, rejeneratif potansiyel ve biyobozunur olmaları gibi özelliklerinden dolayı geniş bir kapsama sahiptir (Sahana ve Rekha, 2018).

Son yıllarda yara iyileşmesinde biyoaktif etken madde arayışında ekzopolisakkaritler (EPS'ler) kayda değer bir seçenek olarak değerlendirilip çalışılmaya başlanmıştır. Mikrobiyal EPS'ler bakteri, maya, alg, mantar vb. tarafından sentezlenen biyopolimerlerdir. EPS'ler yüksek katma değeri olan ve çeşitli amaçlarla kullanılabilen, çözünebilir veya çözünemez hücre dışı polimerik maddelerdir (Dilna ve diğerleri, 2015; Majee, Evlani, ve Biswas, 2017). EPS'lerin doku onarımı/rejenerasyonu ve immün regülatör aktivitelerinin gösterildiği ve biyomalzeme olarak kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Tükenmez ve Aslım, 2018; Hamidi ve diğerleri, 2023). EPS'ler biyoteknolojik olarak ilaç ve biyomalzemede kullanım potansiyeli yüksek doğal polimerlerdir ayrıca biyobozunur ve

ucuz sentezlenebilir olup pek çok farklı kaynaktan üretilmektedir (Laubach, Joseph, Brenza, Gadhamshetty ve Sani, 2021).

Beta(β)-glukanlar ise birçok biyolojik ve immünolojik aktiviteyi düzenleyen immün regülatör efektörler olup makrofajlar, nötrofiller ve antijen sunan hücreler gibi bağışıklık hücrelerini aktive ederler (Geller, Shrestha, ve Yan, 2019; Richer ve diğerleri, 2015; Maity ve diğerleri, 2021). β -glukanların immün regülatör etkisi hücre hatları, hayvan modelleri ve insan denemeleri üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Chaichian ve ark., 2020). Yarada biyomalzeme olarak β -glukan immün düzenleyici etkisi, hücre göçünü uyarıcı özelliği ve yara bölgesindeki ağrıyı azaltıcı etkisinden dolayı inovatif yara örtüsü yaklaşımları için çalışılmaktadır (Muthuramalingam Choi, Hyun, Kim ve Cho, 2019). Tez projesi kapsamında literatürce bu iki farklı polimerin ayrı ayrı yara iyileşme süreçleri üzerinde etkili olduğu bildirilmiş olmasına rağmen, bu polimerlerin birlikte ele alındığı çalışmaya rastlanmamıştır. Özellikle probiyotik kaynaklı biyopolimer EPS'nin yara iyileşmesindeki etki mekanizması üzerine literatürde yapılmış herhangi bir çalışmaya denk gelinmemiştir. Sadece Prof. Dr. Belma ASLİM'in tez danışmanlığında tamamlanan araştırma projesi EPS GD2'nin yara da etki mekanizmasını ele almıştır (Demir 2022). Bu nedenle, tez projesi kapsamında çalışılan mikrobiyal kaynaklı biyopolimerler olan β -glukan ve EPS kombinasyonlarının yara iyileşmesi üzerindeki etki mekanizmaları ve immün regülatör özelliğinin olup olmadığının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Yüksek lisans tez çalışmasındaki amaçlar aşağıda belirtilmiştir.

1. Yara iyileşmesinde muhtemel etken madde olabilecek mikrobiyal kaynaklı β -glukan ve probiyotik kaynaklı EPS biyopolimerlerinin ve bunların kombinasyonunun denenerek yara iyileştirmesi yönünden mukayese edilmesi ve en iyi uygulama grubu ve konsantrasyonun belirlenmesi
2. Çalışılan biyopolimerlerin hücre göçü üzerine etkisinin belirlenerek yara kapatma etkisinin araştırılması.
3. Biyopolimerler ve kombinasyonun ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerinden olan ve yara matriksinin oluşumunda rol alan kollajen tip 1 alfa 1 (*COL1A1*) ve fibronektinin (*FN*) oluşum düzeyleri üzerine etkisinin araştırılması

4. Fibroblastlardan salınan fibroblastların çoğalmasını, kollajen birikimini uyaran ve skarsız yara oluşumu ilişkili olduğu üzerinde durulan fibroblast büyüme faktörü-2 (*FGF-2*), ECM oluşumu ve yara iyileşmesi mekanizması ile ilişkisinin ortaya konulması
5. Hücre göçü, yara kapatma ve ECM matriks proteinlerinin gen ifadesi arasındaki ilişkinin ortaya konulması
6. Biyopolimerler ve kombinasyonun yara iyileşmesinde anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar sitokin aracılı inflamasyonun dengelenmesi yönü ile araştırılması

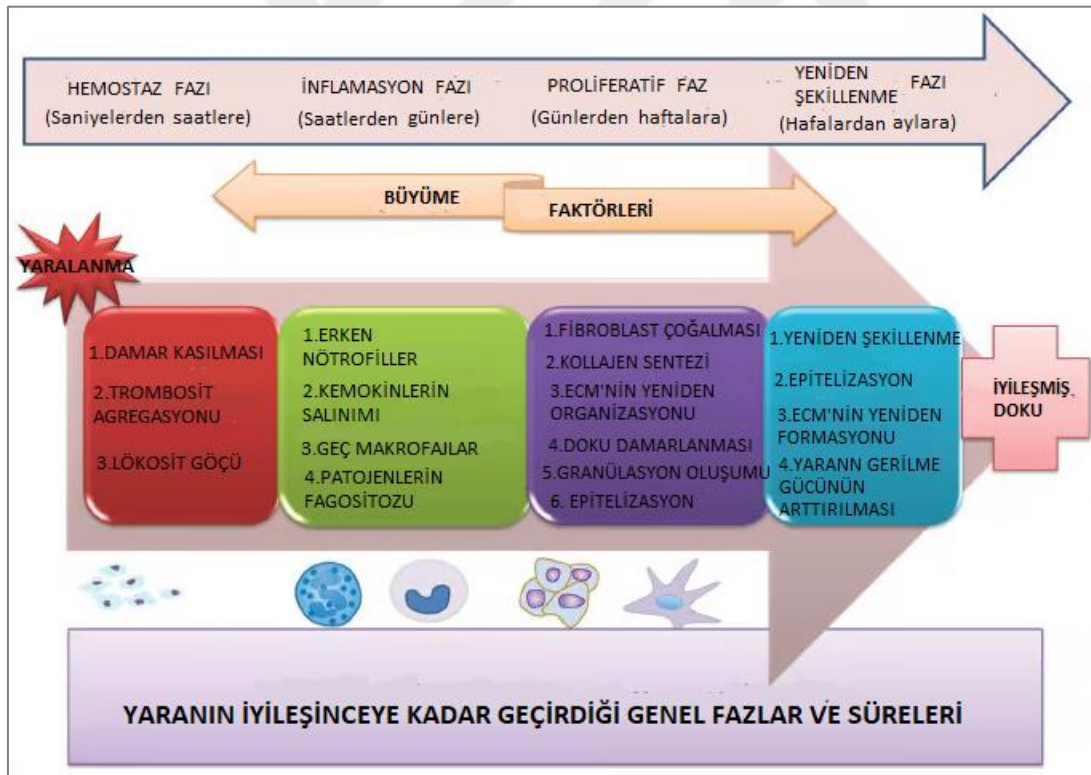
Cilt yaraları hastaların yaşam kalitesinin düşmesine, yüksek tıbbi maliyetlere, hatta amputasyon ve ölümlere yol açan bir sağlık sorunudur. Bu durumun engellenmesi için yara iyileşmesinde çoklu etki mekanizmasına sahip, biyouyumlu, biyoaktif, biyobozunur ve yara iyileşmesinde etki mekanizması ortaya konmuş biyopolimerlerin keşfedilmesine ve bu biyopolimerlerin kullanılabileceği yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Yukarıda verilmiş amaçlar doğrultusunda, literatüre yara iyileşmesini stimüle edecek ve yara iyileşmesini farklı mekanizmalarla etkisi kanıtlanmış β -glukan ve probiyotik kaynaklı bir L-EPSlerden yeni biyoaktif madde elde edilmesi ve bu biyopolimerlerden yara iyileşmesinde etkin olabileceği kombinasyonların geliştirilmesi hedeflenmiştir. Aynı zamanda bu biyopolimerler ve kombinasyonları ile farklı yara tiplerinde kullanılabilecek, biyouyumlu, biyobozunur ve çoklu etki mekanizmasına sahip, yara iyileşmesinde ilaç veya geliştirilecek biyomalzemeler için etken madde elde edilmesi bir diğer hedeftir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Yara İyileşmesi

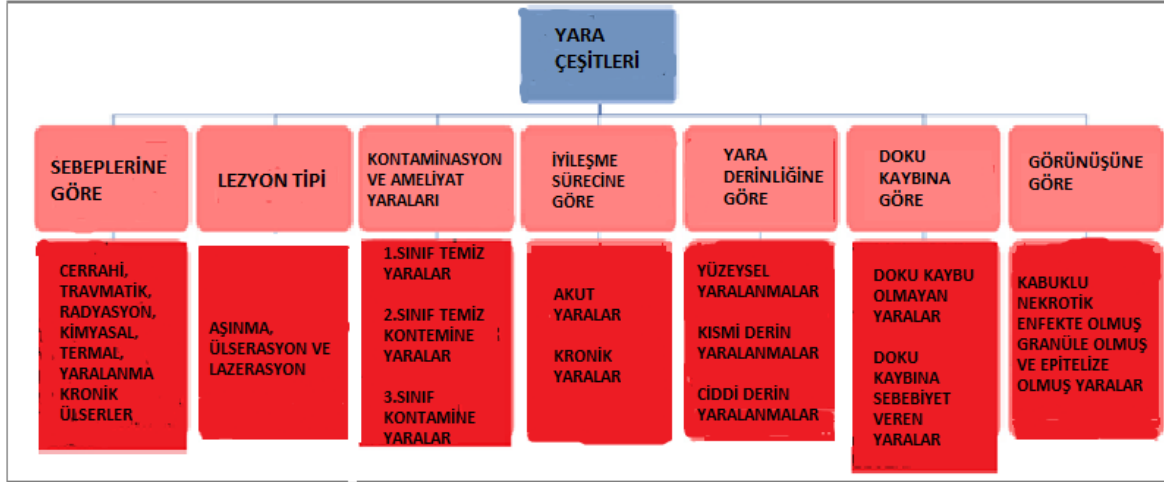
Herhangi bir etki aracılığıyla canlının doku/organ bütünlüğünün ihlal edilmesi ve fonksiyon kaybının oluşması ‘yara’ olarak nitelendirilir (Koyutürk ve Soyaslan,2016; Almadani ve diğerleri, 2021). Yara iyileşmesi hasarlı dokunun tekrar iyileşmesi için uygun bir çevreye ihtiyaç duyan birbiriyle girintili ve çok aşamalı fizyolojik bir süreçtir. Yaralanma sürecinde vücut, zarar gören dokuları onarmak, yenilemek ve cildin bütünlüğünü sağlamak için birbiriyle girintili ve birbirini takip eden iyileşme süreçlerini başlatır. Bu süreçler 4 ana aşamadan meydana gelir bunlar hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve doku yeniden şekillenme (remodeling) aşamalarıdır ve Şekil 2.1’de gösterilmiştir (Niculescu and Grumezescu, 2022).



Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin fazları (Thiruvoth ve diğerleri, 2015)

Bir yara, dış (örneğin fiziksel, mekanik, termal, kimyasal, elektrik) faktörlerin veya altta yatan tıbbi veya fizyolojik bozuklukların (örneğin, diyabet, maligniteler) cilt yapısında ve işlevinde neden olduğu hasar olarak tanımlanabilir (Tudoroiu ve diğerleri, 2021). Kan akışı,

oksijen, ödem, enfeksiyon, yara metabolizması, beslenme, innervasyon, tekrarlayan travma, önceki yaralanma tedavisi ve sistemik faktörleri gibi farklı özellikleri bir yarayı karakterize edebilir (Niculescu ve Grumezescu, 2022).



Şekil 2.2. Yara çeşitleri

Ayrıca, bu özellikler, bir yaranın kökeni, patofizyolojisi ve durumu hakkında bilgi birikimine yardımcı olur, çeşitli kriterlere göre sınıflandırılmasına izin verir (bkz. Şekil 2.2) ve uygun tedavinin değerlendirilmesine izin verir.

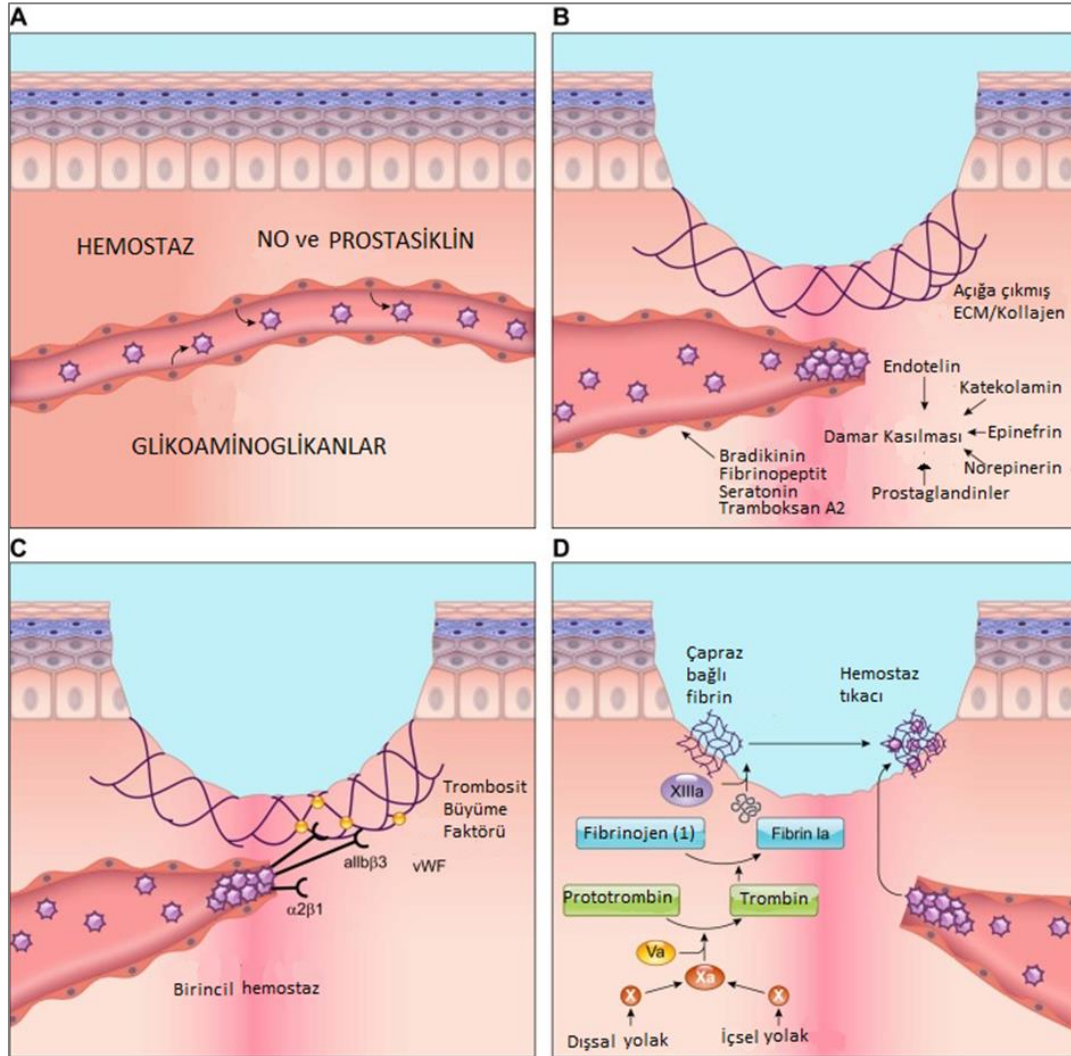
2.2. Akut Yara İyileşmesi

Genel bağlamda yara iyileşmesi, hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme (remodelling) fazları olmak üzere ardışık fakat birbiriyle örtüşen karmaşık biyolojik süreçler yoluyla gerçekleştirilir (Wang ve diğerleri, 2018). Yaralanmaların akut ve kronik olarak sınıflandırılması, yara iyileşmesinin patogenezi ve sonuçlarına dayanmaktadır (Tottoli ve diğerleri, 2020). Akut yaralar bilindiği üzere yara iyileşmesindeki belirtilen aşamaları sağlıklı bir şekilde atlatıp doku bütünlüğü ve işlevinin tekrardan sağlandığı yaralanmalardır.

2.2.1. Yara iyileşmesinde hemostaz fazı

Dokuda çeşitli etkilerle cilt hasarının meydana gelmesinden itibaren, ilk aşamalarda damar yaralanmasından kaynaklanan kan kaybını önlemek için doku hasarını hızlı damar kasılması

ve kan pıhtılaşması takip eder (Wilkinson and Hardman, 2020). Kan pıhtısı oluşumu Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3. Kan pıhtısı oluşumu (Rodrigues ve diğerleri, 2019)

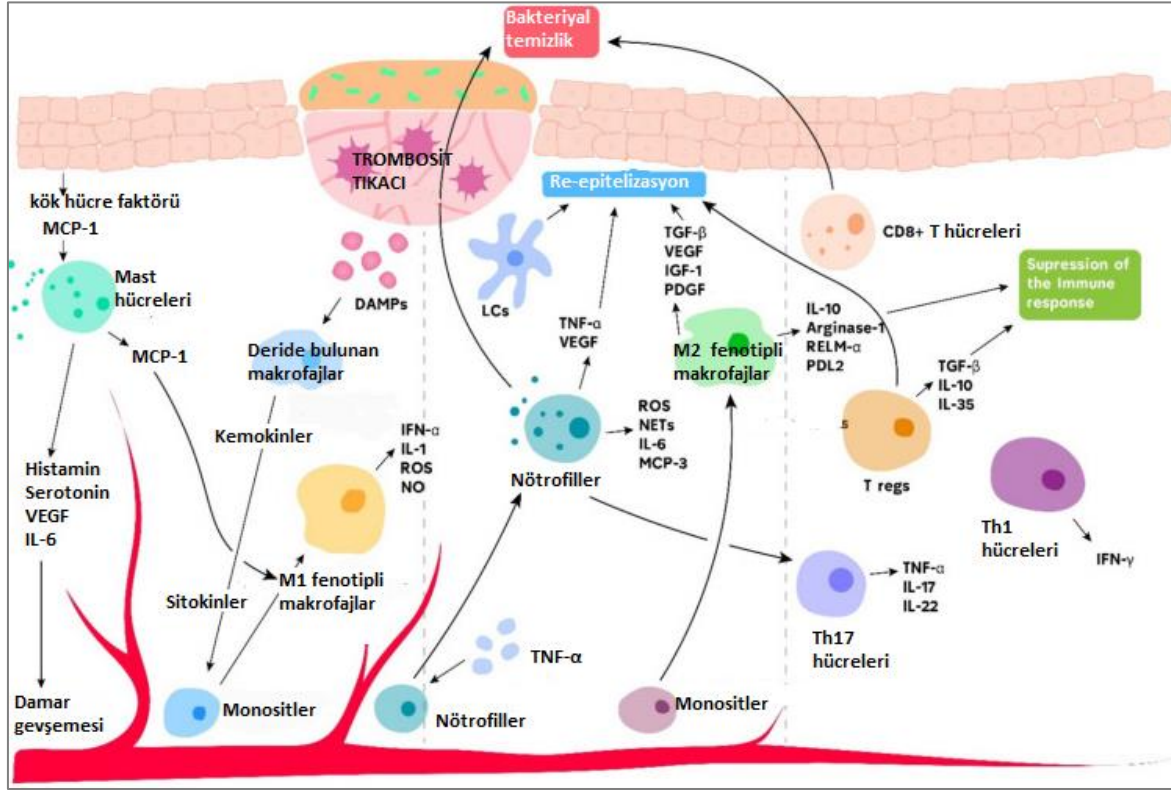
Hemostaz ve pıhtılaşmanın birincil hücresel araçları olan trombositler, ECM ve yerel yerleşik hücrelerden sinyal aldıktan hemen sonra yara iyileşme sürecini başlatır (Maouia ve diğerleri, 2020; Etulain, 2018). Hemostaz 3 aşamada meydana gelir bunlar: damar kasılması, birincil hemostaz ve total hemostazdır. Bu süreçte yer alan kritik matriks bileşeni trombositlerden üretilen fibrinojendir. Hasar görmemiş durumda trombositler Şekil 2.3A'da olduğu gibi zamansız aktivasyondan korunur. Endotel hücrelerinden salınan nitrik oksit (NO) ve prostasiklin gibi anti-trombotik ajanlar, trombositlerin endotelyal duvara bağlanmasını ve trombositlerin birbirine yapışmasını engeller (Rumbaut ve Thiagarajan, 2010). Yaralanma gerçekleştiğinde (bkz. Şekil 2.3B) kanamayı durdurabilmek için verilen

en acil tepki damar kasılmasıdır. Ardından birincil ve ikincil hemostaz eşzamanlı ve birbiriyle girintili 2 yol aracılığıyla gerçekleştirilir (Furie ve Furie, 2008). Birincil hemostaz, Şekil 2.3C’de görüldüğü üzere subendotelyal matriks içindeki kollajenin açığa çıkmasıyla meydana gelen trombosit agregasyonu ve trombosit tıkaçı oluşumunu içerir. İkincil hemostaz, Şekil 2.3D’de görüldüğü üzere çözünür fibrinojenin, çözünmeyen fibrin ağını oluşturan şeritlere dönüştürüldüğü ve trombosit tıkaçıyla fibrin ağının birleştiği aşamadır. Trombosit tıkaçı ve fibrin ağı, içindeki trombositler tarafından salınan büyüme faktörlerini serbest bırakan ve yara iyileşmesi için gerekli hücrelerin göçü için geçici bir iskele sağlayan trombüs oluşturmak üzere birleşir. Bu tıkaç ayrıyeten eritrositleri ağa bağlayarak kanamayı tamamen durdurur (Pool, 1977).

Nötrofiller ve bazofiller yaralanma sinyaline ilk müdahale eden hücrelerdir. Bağışıklık yanıtıyla beraber bu aşamaya girintili bir şekilde inflamasyon süreci de başlatılmış olur. Kan pıhtısı, yaralı bir ortamı bakteri istilasından korur ve aktive olmuş trombositlerden salınan ve yaralı bölgeye bağışıklık hücresi göçünü sağlayan sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin kaynağı olarak hizmet eder (Opneja ve Stavrou, 2019). Trombositler ayrıca salgı granüllerinden de oluşur; bunların arasında trombosit aktivitesi için en önemli olanlar α -granülleridir (Blair ve Flaumenhaft, 2009). Yaralanma ve kan damarı endotelinin yırtılmasının ardından trombojenik subendotelyal matris açığa çıkar (Rodrigues ve diğerleri, 2019). Trombosit yüzeyindeki glikoproteinler, subendotelyal matristeki vWF ve kolajene bağlanarak trombositlerin birbirine ve subendotelyal matrise bağlanmasına sebep olur bu durum trombosit tıkaçını meydana getirir (Rodrigues ve diğerleri, 2019). Tüm bu etkileşimler hep birlikte Şekil-3’te gösterilen “trombosit tıkaçının” oluşmasıyla sonuçlanır. Tıkaç içindeki trombositlerde gerçekleşen α -granüllerinin de-granülasyonu, trombosit faktörü-4 (PF4), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve inflamatuvar fazın başlaması için elzem olan dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) gibi büyüme faktörlerinin salınımını tetikler (Sharda ve Flaumenhaft, 2018; Ren ve diğerleri, 2020; Chicharro-Alcántara ve diğerleri, 2018). En bol bulunan α -granüllü bileşeni olan PF4, nötrofil ve makrofaj alımını, monosit farklılaşmasını ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu kolaylaştırır (Ren ve diğerleri, 2020).

2.2.2. Yara iyileşmesinde inflamasyon fazı

İnflamasyon fazı yarada bağışıklık tepkisinin meydana geldiği ve yaranın çeşitli dış tehditlerden temizlendiği aşamadır. Yara alarm durumundayken bağışıklık hücreleri Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Akut yara iyileşmesinde bağışıklık hücreleri (Raziyeva ve diğerleri, 2021)

İnflamasyonun başlaması, yaranın hemostaz safhasında hasarla ilişkili moleküler paternler (DAMP), hidrojen peroksitler ve yaralı hücrelerden salınan kemokinler nötrofillerin toplanması için moleküler sinyaller sağlar. DAMP molekülleri arasında DNA, peptitler, ECM bileşenleri, ATP ve ürik asit bulunur. Yara bölgesindeki çeşitli hücrelerden salınan kemokinler bölgeye hücrelerin göçü ve inflamasyon sinyali için önemlidir. Kemokinler hücre göçünü kemotaksi yoluyla uyararak olay yerine gerekli hücrelerin getirilmesinde görev alır. Yarada kemokin üretimi zamana ve doza bağlıdır ve bakteri, parçalanmış fibrin veya tümör nekroz faktörü (TNF)-α gibi proinflamatuvar faktörlerin varlığıyla başlatılır (Rodrigues ve diğerleri, 2019). Yaralanmanın hemen sonra mast hücreleri, inflamatuvar sitokinleri, damar genişlemesine sebep olan ajanları, vasküler geçirgenlik faktörlerini ve bağışıklık hücrelerinin yaraya toplanmasını artıran faktörleri serbest bırakır (Oskeritzian,

2012). DAMP'ler yara bölgesinde aktifleştirdiği uyarı sinyaliyle birlikte: deride ikame eden makrofajları, dolaşım sisteminden monositleri, nötrofilleri ve dentritik hücreleri aktif hale getirir (Chen ve DiPietro, 2017). Hemostaz tıkaçındaki trombositler degranülasyon sırasında, interlökin (IL)-1 β , IL-6 ve TNF-a gibi pro-inflamatuar faktörleri serbest bırakır bu faktörler inflamatuvar yanıtı güçlendirir (Ellis, Lin ve Tartar, 2018). İnflamasyon aşaması, yara bölgesinde nötrofillerin ve pro-inflamatuar makrofajların varlığı ile karakterize edilir (Şekil-4). Bu aşamadayken yara bölgesindeki hücrelerin ana görevi yarayı enfeksiyonlardan ve hücre kalıntılarından arındırmaktır (Raziyeva ve diğerleri, 2021).

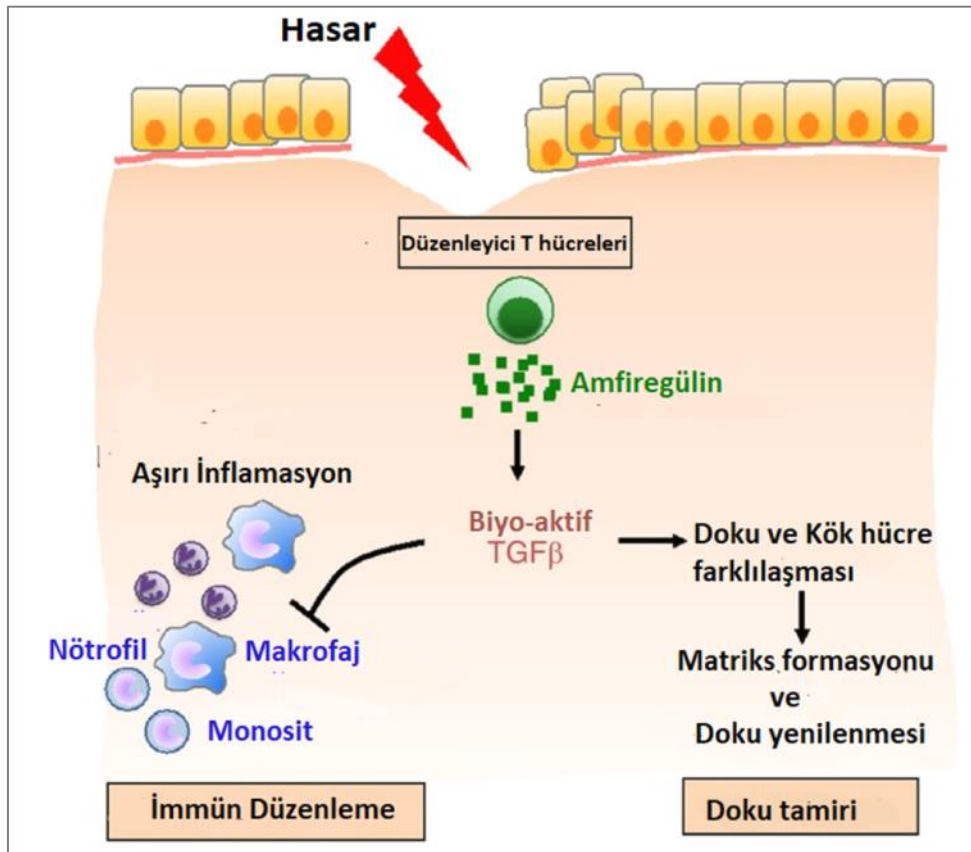
İnflamasyonda nötrofiller normal ciltte görülmez. Kemik iliğinde promiyelositlerden üretilirler ve yaralanma bölgelerinden salınan DAMP'ler, hidrojen peroksit, lipid aracıları ve kemokinler dahil olmak üzere kemotaksi sinyallerine yanıt olarak kemik iliğinden yaraya ilk müdahaleciler olarak gelirler (Su ve Richmond, 2015). Aktive edilmiş nötrofiller, daha fazla nötrofil göçünü uyuracak faktörleri serbest bırakır. Nötrofiller, toksik granüller salarak, oksidatif patlama üreterek, fagositozu başlatarak ve nötrofil hücre dışı tuzakları (NET'ler) üreterek enfeksiyon tehditlerini yok eder (Jorch ve Kubes, 2017). Nötrofiller fagositoz yoluyla bakterileri ve hücre kalıntılarını yutabilir ve yok edebilir. Nötrofiller, makrofajlarla aynı fagositoz aşamalarını gösterirler ancak makrofajlardan farklı, belirli patojenlerin tercihen tanınmasına izin veren fagositik reseptörlerin bir kombinasyonunu içerirler (Levin ve diğerleri, 2016). Nötrofiller inflamatuvar yanıtın ayrılmaz bir parçası olmasına ve iyileşmenin erken aşamalarında inflamasyonu güçlendiren sinyaller salgılayabilmesine rağmen, son kanıtlar bu hücrelerin aynı zamanda iyileşmenin inflamatuvar fazını kapatmak için bir sinyal olarak da hareket ettiğini göstermektedir (Nathan, 2006). Nötrofillerin temizlenmesi apoptoz ve ardından makrofajlar tarafından yutulması ile başlar (Bratton ve Henson, 2011). Tüm nötrofiller makrofajlar tarafından yok edilmezler. Bir nötrofil alt grubunun, doku içinde tersine göç yoluyla yara bölgesini terk ettiği ve damar sistemine yeniden girdiği gösterilmiştir (de Oliveira, Rosowski ve Huttenlocher, 2016). Nötrofillerin zamanında yara dokusundan kaldırılması kritik öneme sahiptir çünkü nötrofillerin temizlenmesi inflamasyonun çözülmesi için sinyal görevi görür. Nötrofil kalıcılığı, uzun süreli bir inflamatuvar duruma ve kronik yara oluşumuna neden olur (Chen ve Rogers, 2007).

Krzyszczyk ve arkadaşlarına göre, makrofajların yara iyileşmesindeki rolüne göre üç tipe ayırdılar: inflamasyon öncesi makrofajlar (pro-inflamatuar), yara iyileşmesini ve doku yenilenmesini başlatan makrofajlar (pro-wound healing) ve immün cevabın sonlanması

sinyalini veren (pro-resolving) makrofajlar (Krzyszczuk ve diğerleri, 2018). Makrofajlar, yolk kesesinde gelişen ve derminin kalıcı sakinlerinden olan yerleşik makrofajlar ve kemik iliği kaynaklı olup kan dolaşımındaki monositlerden farklılaşan makrofajlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Krzyszczuk ve diğerleri, 2018; Boniakowski ve diğerleri, 2017). Yara oluşumundan itibaren, ilk 24-48. saatler içinde yaralanma bölgesinde makrofajların göçü ve birikmesi gerçekleşir (He ve Marneros, 2013). Genç farelerin yaralarının 14. günde yeniden epitelizasyonu ve yara kapanma süreci tamamlanırken, makrofajların sayısı kabaca 3. günde zirve yaparken 5. günde azalır ve 10. günde taban değerleri görür. Makrofaj sayısındaki artış, hem yerel dokuda yerleşik makrofajların artması hem de kemik iliğinden monosit alımı yoluyla onlardan türetilen makrofajlar yoluyla gerçekleşebilir (Yanez, Lacher, Vidyarthi, ve Colegio, 2017; Park ve Barbul, 2004). Dokuda yerleşik makrofajların embriyonik gelişimden itibaren dokuda kalması ve yaralanma sırasında sayılarının artması beklenebilir olaylardır ancak bunun kesin olarak gösterilmesi gerekmektedir. Literatürde çoğu çalışma yaralı dokuda makrofajlara farklılaşan monositlere odaklanmaktadır (Rodrigues ve diğerleri, 2019). Monositler, trombosit ve mast hücresi degranülasyonuna yanıt olarak toplanır. Yara içindeki makrofajlar ayrıyeten monosit kimyasal çekici protein (MCP)-1 gibi güçlü kemotaksi ajanları üreterek daha fazla monosit yara bölgesine toplayabilir ve inflamatuvar yanıtı şiddetlendirebilir (DiPietro, Polverini, Rahbe, ve Kovacs, 1995). Makrofajlar normal yara iyileşmesi ve doku yenilenmesi için kritik öneme sahiptir. Bu duruma ilişkin yapılmış çalışmalarda makrofajdan yoksun yara dokusu fare deneylerinde gecikmiş yara kapanması göstermektedir (Goren ve diğerleri, 2009; Mirza, DiPietro ve Koh, 2009). Makrofajların azaldığı yaralar, telafi edici bir bağışıklık tepkisi olarak nötrofil akışı ve anjiyogenezde, granülasyon dokusunda, kollajen birikiminde ve büyüme faktörü salınımında azalmalar gösterir (Lucas ve diğerleri, 2010; Zhu, Ding, Ma, Iwashina ve Tredget, 2016). Tüm bunların aksine, yaradaki monosit veya makrofaj sayısının arttırılması hem normal hem de diyabetik farelerde yara iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırabilir (Hu ve diğerleri, 2017). Yara iyileşmesinin ilkin evrelerinde makrofajlar mikrobiyal öldürücü ve pro-inflamatuvar fenotipe sahiptirler ve şekil-4'te gösterildiği gibi TNF- α , IL-6 ve IL-1 β sitokinlerini üretirler (Englander, 1979). Bu makrofajlara genel olarak M1 fenotipine sahip makrofaj ya da proinflamatuvar makrofaj adı verilir. Pro-inflamatuvar makrofajlar, patojenleri tanır ve fagozom hücre içi organellere yutar (Slauch, 2011). M1 fenotipe sahip proinflamatuvar makrofajlar aynı zamanda matris metaloproteazları (MMP) da sentezler, bu da makrofajların ECM'yi ve trombüsü sindirerek yara bölgesine göçlerine yardımcı olmaktadır. Sindirilen ECM parçaları, immün sistemi uyarıcı DAMP'ler olarak işlev görür ve yaranın inflamatuvar

tepkisini şiddetlendirir (Sorokin, 2010). Makrofajlar bakteri öldürücü etkisinin yanı sıra inflamatuvar yanıtın çözülmesi için ortamda bulunan nötrofillerin fagositozunun sağlanması için kritik öneme sahiptir. Nötrofillerin yara bölgesinden öyle ya da böyle uzaklaştırılmaması, inflamatuvar yanıtın takılı kalmasına ve kronik yara oluşumuna sebep olabilir (Bratton ve Henson, 2011). Ayrıca diyabetik koşullarda, notch sinyallemedeki eksikliğinin, TNF α , IL6 ve iNOS'un yüksek gen ifadesini indüklediği ve inflamasyonu arttırdığı da rapor edilmiştir (Kimball ve diğerleri, 2017). Ayrıca notch yolağının majör proteinlerinden olan delta benzeri kanonik olmayan notch ligandı-1 (DLK1) bölünebilir tek geçişli bir transmembran proteindir ve Notch/Delta/Serrate ailesinin bir üyesidir. Cilt gelişimi sırasında, notch sinyali, epidermisin doğru tabakalaşmasını sağlamak için epidermal farklılaşmayı düzenler. Yara iyileşmesinde kollajen birikimi, inflamasyonda makrofaj hücreleri üzerindeki etkileriyle beraber anjiyogeneze de rol alır (Bielefeld, Amini-Nik ve Alman, 2013). Makrofajlar nötrofilleri fagosit ederken, nötrofillerden salgılanan mediatörler aracılığıyla düzenlenen bir süreçle makrofaj fenotipleri M1'den M2'ye değişir (Wilgus, Roy ve McDaniel, 2013). İnflamasyonun çözülmesiyle oluşan bu değişim, proinflamatuvar M1 makrofaj fenotipini anti-inflamatuvar hücre fenotipine sahip aktive edilmiş makrofajlara ya da diğer bir isimle M2 makrofajlara dönüştürür (Raziyeva ve diğerleri, 2021; Galli, Borregaard ve Wynn, 2011). Anti-inflamatuvar M2 makrofajları anjiyogeneze katkıda bulunur ve artan M2 makrofaj sayısı yüksek mikro damar yoğunluğuyla doğrudan ilişkilidir (Rodrigues ve diğerleri, 2019). Bu hücreler aynı zamanda yara granülasyon dokusunda kan damarlarının oluşumu için önemli bir faktör olan VEGF büyüme faktörünü salgırlar (Chicharro-Alcántara ve diğerleri, 2018). Proliferatif safhada makrofajlar fibroblastlara sinyaller vererek onların miyofibroblastlara farklılaşmasına yardımcı olarak, yarada kolajen ve α -düz kas aktin (α -SMA) proteini birikimine yardımcı olur. Yeniden epitelizasyon meydana geldiğinde ve yeniden şekillenme aşamasında, yaradaki makrofajlar yaranın kapanması için artık gerekli olmayan aşırı hücreleri fagosit eder ve fazlalık ECM'yi parçalayacak proteazları serbest bırakır (Lech ve Anders, 2013). Normal onarım için erken safhalarda proinflamatuvar makrofajlar gerekli olsa da proinflamatuvar makrofajların hem artan hem de azalan sayısı hipertrofik skarlara neden olabilir (Butzelaar ve diğerleri, 2016). Makrofajlar ve fibroblastlar arasındaki etkileşim, yaranın iz bırakmadan iyileşip iyileşmediğinin belirlenmesinde de kritik öneme sahiptir. Örneğin, fare fibroblastlarında CD47 "beni yeme" sinyalinin artan ekspresyonu, fibroblastların makrofajlar tarafından fagosit edilmesini önleyerek aşırı matris birikmesine yol açar (Wernig ve arkadaşları, 2017). Diyabetik yara iyileşme sürecindeki bozulmada makrofaj

fonksiyon bozukluğu da belirgindir. Diyabetik yaralarda hem monosit toplanması hem de makrofaj aktivasyonu için gerekli olan kemokinlerin ekspresyonunda geçici bir gecikme vardır (Wetzler, Kämpfer, Stallmeyer, Pfeilschifter ve Frank, 2000). Bu durum makrofajların yara bölgesine geç müdahale etmesine sebep olur. Makrofajların yara bölgesine gecikmiş müdahalesi, nötrofillerin, ECM'nin ve yara kalıntılarının gecikmiş fagositozuna ve proliferasyon fazının gecikmiş başlangıcına yol açar (Khanna ve diğerleri, 2010). Böylece yara iyileşmesinin çok ileri safhalarında bile makrofajların ve apoptotik hücrelerin baskın olduğu kronik bir inflamasyon oluşabilir (Wetzler ve diğerleri, 2000).



Şekil 2.5. Yara iyileşmesi sırasında düzenleyici T hücreleri. Düzenleyici T hücreleri yaranın olduğu gölgede hızla birikir ve oluşabilecek aşırı inflamasyon tepkilerini kontrol altında tutar. Bu süreçte, yaralanma bölgesindeki düzenleyici T hücreleri, epidermal büyüme faktörü (EGF), TGF- β 1 ve Amfiregulin gibi büyüme faktörlerini serbest bırakır. Bu büyüme faktörleri rejeneratif süreçlerdeki hücrelerin farklılaşmasında görev alır (Zaiss, Minutti ve Knipper, 2019)

Yara iyileşmesinde T hücreleri timüs bezinde olgunlaşır ve burada çeşitli gen regülasyonlarıyla çeşitli T hücresi reseptörlerine sahip olurlar (Krangel, 2003). T hücreleri ortak uyarıcı antijen eşliğinde yeterince uyarıldıktan sonra aktive olur, çoğalmaya başlarlar

ve efektör hücreler olarak patojenlerin yaradan temizlenmesine katkıda bulunurlar. Bağışıklık sistemindeki ana efektör hücreler olan T lenfositleri, yarada çeşitli hücrelerin fonksiyonunu düzenlemek ve inflamasyona aracılık etmek için çeşitli sitokinler üretirler (Williams ve Bevan, 2007). T hücrelerinin bir başka çeşidi olan düzenleyici T hücreleri yara iyileşmesi sırasında pro-inflamatuvar yanıtın baskılanmasına yardımcı olmaktadır. Düzenleyici T hücreleri inflamasyon baskılayıcı işlevlerine aracılık etmek için çeşitli bölgesel mekanizmalar kullanırlar (Josefowicz, Lu ve Rudensky, 2012). Bu mekanizmalar arasında TGF- β 1'in bölgesel aktivasyonu ve immün baskılayıcı sitokin IL-10'un salgılanması yer alır (Zaiss ve diğerleri, 2019). Yaralanma esnasında düzenleyici T hücrelerinin fonksiyonu Şekil 2.5'te verilmiştir.

2.2.3. Yara iyileşmesinde proliferasyon fazı

Granülasyon dokusunun oluşumu ve yeniden damarlanma: Yara iyileşmesinin proliferatif fazında granülasyon dokusu oluşumunu takiben, yeniden epitelizasyon, yeniden damarlanma ve immün düzenleme gibi diğer iyileşme süreçleri de eş zamanlı olarak devam eder. Granülasyon dokusu esasen yeni ECM sentezleyen ve yaranın kasılmasına yardımcı olan aktifleştirilmiş miyofibroblastlardan ve onları besleyen yeni oluşmuş damarlardan meydana gelir. Yeni sentezlenen ECM, yeni oluşacak damarlar, inflamasyon hücreleri ve rejeneratif hücreler için bir iskele görevi görür. Yaranın ilerleyen safhalarında granülasyon dokusu yerini normal bağ dokuya bırakır (Gurtner, Werner, Barrandon, ve Longaker, 2008). Etkili yara iyileşmesi için neovaskülarizasyon veya yeni kan damarı oluşumu kritik öneme sahiptir. Besinlerin sağlanması ve oksijen homeostazisinin sürdürülmesi, hücresel proliferasyonun ve doku yenilenmesinin gerçekleşmesine olanak sağlamak için gereklidir (Gurtner ve diğerleri, 2008). Anjiyogenez, kan damarlarının iç yüzeyini kaplayan lokal mikrovasküler endotel hücrelerinin aktivasyonunu içerir. Hipoksik yara ortamının varlığında endotel hücreler, VEGF ve PDGF gibi hipoksiye duyarlı büyüme faktörlerine yanıt verir (Rodrigues ve diğerleri, 2019). Aktive edilmiş endotelial hücreler granülasyon dokusunda ECM'yi parçalar, çoğalır, göç eder, yeni hücre-hücre bağlantıları oluşturur ve yeni kılcal damarlar oluşturmak üzere dallanır (Eilken ve Adams, 2010). Anjiyogenez, yara dokusunun daha fazla beslenmesine ve oksijen homeostazisinin korunmasına izin verir, bu da hücresel proliferasyonu ve doku yenilenmesini artırır (Gurtner ve diğerleri, 2008).

Endotel hücreleri ve yeniden damar oluşumu: Mikrovasküler endotelial hücreler kan damarlarının iç yüzeyini kaplayan ve yeni damar oluşumunda rol alan birincil hücrelerdir. Endotelial hücrelerin aktivasyonu, çeşitli büyüme faktörlerini, endotelial hücre göçüne izin veren proteolitik enzimlerin üretimini, hipoksiye hücre içi endotelial hücre yanıtını ve bitişik perivasküler hücrelerle endotelial hücrelerin etkileşimlerini gerektirir (Rodrigues ve diğerleri, 2019). Endotel hücreleri filizlenme yoluyla anjiyogenezi başlatır; burada VEGF, FGF, PDGF-B, TGF- β ve anjiyopoietinler gibi pro-anjiyogenik sinyallere yanıt olarak çoğalırlar ve göç ederler (Tonnesen, Feng ve Clark, 2000). Bununla birlikte, endotelial hücrelerde heterojenlik mevcuttur ve anjiyogenez sırasında bu hücreler ya öncü uç hücrelerin ya da takip eden sap hücrelerinin rolünü üstlenirler. Uç hücreler filopodalarını pro-anjiyogenik büyüme faktörlerine doğru genişletir ve damar büyümesinin sıkı bir şekilde kontrol edilmesini ve organize edilmesini sağlayan pozitif ve negatif yönlendirme sinyallerine yanıt verir (Gerhardt ve diğerleri, 2003). Sap hücreleri ise uç hücreleri takip ederek mevcut damar sisteminin bütünlüğünü korur. Endotel hücrelerin uç hücre mi yoksa sap hücresi mi olacağı kararı, büyük ölçüde hücre kaderini belirleyen efektörler aracılığıyla notch yolağı tarafından düzenlenir (Hellström ve diğerleri, 2007). Notch sinyallemesinin aktivasyonu, deri altı adipöz stromal hücreleri, makrofajlar ve yara mikro çevresinde çoğalan keratinositler tarafından üretilen VEGF tarafından düzenlenir (Gerhardt ve diğerleri, 2003).

Yara iyileşmesinde fibroblastlar, ECM'yi biriktirdikleri ve yeniden şekillendirdikleri her organ sisteminin bağ dokusunda her yerde bulunur. Yara iyileşmesinin ana özelliklerinden biri, yaranın yeniden epitelize edilmesi gereken yüzey alanını azaltan yara kontraksiyonudur. Bu işlem sırasında kollajen fibriller, dokunun mekanik mukavemetini arttırmak için yara kenarlarına dik olarak düzenlenir (Schultz, Davidson, Kirsner, Bornstein ve Herman, 2011). Yara mikro ortamının sertliğindeki değişiklik, yaranın merkezine doğru göç eden fibroblastları miyofibroblastlara dönüştürür. Miyofibroblastlar, ECM biriktiren ve kontraktıl düz kas özellikleri sergileyen geçici bir hücre tipidir (Hinz, 2010; Tomasek, Gabbiani, Hinz Chaponnier ve Brown, 2002). Miyofibroblastlar ayrıca integrinleri yoluyla polimerize fibronektin ve kollajen fibrillerine bağlanır ve aktin açısından zengin hücre iskeleti aracılığıyla fibrilleri yara kenarına dik olarak çekerek yara kontraksiyonunun oluşmasına izin verir (Tomasek ve diğerleri, 2002). Miyofibroblastlar yarada kollajen birikiminin önemli öncül hücreleridir ve tip I ve III kollajenler dermisin ana yapısal elemanlarıdır (Ricard-Blum, 2011). ECM elemanlarından olan ve fibroblastlar tarafından sentezlenen fibronektin yara da elastisiteyi sağlar. Fibronektinler, hücreler tarafından 40 farklı büyüme faktörünü ve sitokini

yukarıya doğru bağlayabilen viskoelastik fibriller halinde birleştirilir. Bu fibriller yara iyileşmesi sırasında geçici bir ECM'nin oluşturulmasında önemli bir rol oynar (Dalton ve Lemmon, 2021). Fibronektinler ECM'nin kohezyon rolünün de ötesinde, yaraların kasılması, keratinositlerin ve fibroblastların göçünü uyarır (Maquart, 2015). Fibroblastlarda TGF β 1 sinyalleme skarlaşma ve fibroz ile ilişkilidir. Bu durum fibroblastların miyofibroblast farklılaşmasını, hücre dışı matriks birikimini, yara kontraksiyonunu ve skar oluşumunu teşvik ederler (Penn, Grobbelaar ve Rolfe, 2021). TNF- α dahil bazı inflamatuvar araçlar farklılaşmayı engelleyebilir; bu durum hastalıklı durumlardaki uzun süreli inflamasyonun miyofibroblast farklılaşmasını erteleyebileceğini ve yara iyileşme sürecinde bir gecikmeye sebep olabileceği düşündürmektedir (Goldberg, Han, Yan, Shaw ve Garner, 2007). Ayrıca, düşük TGF β 1 konsantrasyonları, hipertrofik skarlaşma ve keloid oluşumu gibi fibroproliferatif bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (Penn ve diğerleri, 2021). Ayrıca fibroblastlardan salınan FGF, yeniden epitelizeasyona, anjiyogeneze ve granülasyon dokusu oluşumuna katkıda bulunur (Xie ve diğerleri, 2008). Bu duruma ek olarak, yara iyileşmesindeki doğrudan rollerinin yanı sıra dolaylı olarak da etki ederek TGF- α salınımını uyararak epitelizeasyonu destekler (Niu ve diğerleri, 2007). FGF'ler fibroblastların çoğalmasını, kollajen birikimini uyarır ve granülasyon dokusunun oluşumunu hızlandırır (Enoch, Grey ve Harding, 2006). Hayvan modellerinde yapılan araştırma çalışmaları, diyabetik fare modelinde yara iyileşmesinin hızlandığını gösteren olumlu sonuçlar gözlemlemiştir (Tsuboi ve Rifkin, 1990). Ayrıca, FGF'nin hipertrofik skar tedavisinde olumlu etki yaparak skar oluşumunu azalttığı öne sürülmüştür (Shi ve diğerleri, 2013). Fibroblastlar tarafından sentezlenen bir başka efektör ise Delta benzeri kanonik olmayan notch ligandı-1 (DLK1) proteindir. Bu protein bölünebilir tek geçişli bir transmembran proteindir ve Notch/Delta/Serrate ailesinin bir üyesidir. Cilt gelişimi sırasında, notch sinyalleme aracılığıyla epiderminin doğru tabakalaşmasını sağlamak için epidermal farklılaşmayı düzenler. Yara iyileşmesinde kolajen birikimi, inflamasyonda makrofaj hücreleri üzerindeki etkileriyle beraber anjiyogeneze de rol alır (Bielefeld ve diğerleri, 2013). Miyofibroblastlar, doku bütünlüğü yeterince sağlandıktan sonra sonuçta apoptoz yoluyla yara bölgesinden temizlenir (Desmoulière, Redard, Darby ve Gabbiani, 1995).

Deri tabakasını epidermis mekanik hasardan, mikroorganizmalardan, ultraviyole radyasyondan, su kaybından ve aşırı sıcaklıktan korur. Desmozom adı verilen hücre-hücre bağlantılarıyla komşu keratinositlere bağlanan keratinositler içeren çok katmanlı bir epitel den oluşur. Epidermiste keratinositlerin yanı sıra yerleşik bağışıklık hücreleri, kıl

folikülleri, yağ bezleri ve ter bezleri de bulunur. Epidermis yaralanmaya oldukça duyarlı olduğundan, Hücre kaybının telafisi açısından yerleşik kök hücreler, deri homeostazisini ve onarımını korumak için çok önemlidir (Rodrigues ve diğerleri, 2019). Epidermal uzantılar derinin önemli bir bölümünü oluşturur, dış strese maruz kalır ve cilt hasarına yanıt verir. ECM'den, büyüme faktörlerinden ve çevredeki hücrelerden gelen sinyalleri dışsal sinyaller, kök hücre kaderinin belirlenmesinde önemlidir. Yaralanmanın ardından yara kenarındaki keratinositler birbirlerine ve bazal laminaya olan yapışmalarını gevşeterek defekti kapatır ve göç eden epitel dilini oluşturur (Hobbs Silva-Vargas, Groves ve Watt, 2004). Yara iyileşmesi süresince fibronektin reseptörlerinin miktarı artar (Watt, 2002). Göç eden ve çoğalan keratinositler, TGF- α ve FGF-2 gibi büyüme faktörlerine duyarlıdır (Freedberg, Tomic-Canic, Komine ve Blumenberg, 2001; Werner ve diğerleri, 1994). Bu faktörler göç için önemli olan K6, K16 ve K17 keratinlerinin gen ifadelerini yukarı yönde regüle eder (Pastar ve diğerleri, 2014). Yarada bulunan sitokinler IL-1, IL-6 ve TNF- α keratinosit hareketliliğini artırır. TNF- α 'nın hücre yapışmalarının kaybını ve apikal-bazal polarite kaybını teşvik etmenin yanı sıra, hücrelerde epitelyalden mezenkimal geçişe neden olduğu ve eğer düzenlenmezse fibrotik bir duruma yol açabileceği gösterilmiştir (Yan ve diğerleri, 2010). Göç eden keratinositlerin ayrıca yara kenarlarında MMP'leri bol miktarda eksprese ettiği ve bu hücrelerin fibrin tıkaçı boyunca ve granülasyon dokusu üzerinden göç etmesine izin verdiği bulunmuştur (Krampert ve diğerleri, 2004; Salonurmi ve diğerleri, 2004). Erken proliferatif aşamada, keratinositler tarafından üretilen IL-1 ve TNF- α , fibroblastları keratinosit proliferasyonu ve migrasyonu için önemli faktörler üretmesi için uyarır (Barrientos, Stojadinovic, Golinko, Brem ve Tomic-Canic, 2008; Werner ve diğerleri, 1994). Anjiyogenez sırasında keratinositlerde üretilen VEGF, endotel hücreleri içindeki damar geçirgenliğini artırır ve yeni damar oluşumu için kritik öneme sahiptir (Brown ve diğerleri, 1992). Onarımın sonraki aşamalarında, aktive edilmiş fibroblastlar tarafından üretilen TGF- β 'nın, K5 ve K14 gibi bazal hücreye özgü belirteçleri indükleyip çoğalmayı azaltarak aktive edilmiş keratinositleri bazal hücre fenotipine geri döndürmek için gerekli olduğu bulunmuştur. (Pastar ve diğerleri, 2014).

2.2.4. Yeniden şekillenme (re-modelling)

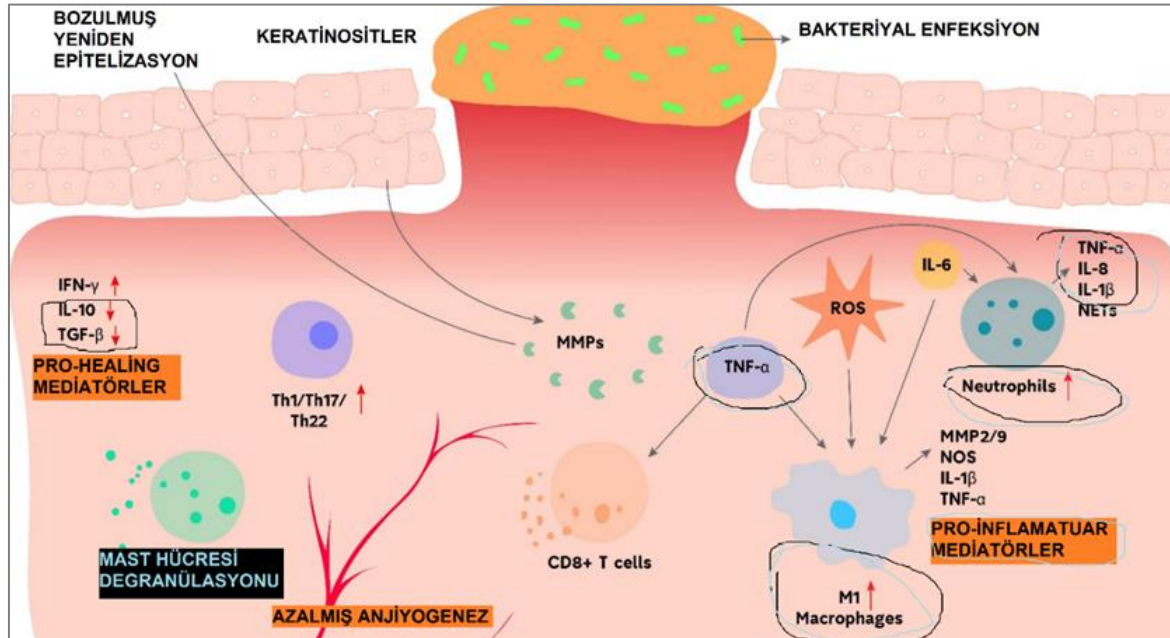
Akut ve kronik yaraların kapatılması, yara iyileşmesinin son noktası olarak kabul edilir, ancak yaralar birkaç ay hatta yıllarca yeniden şekillenmeye maruz kalmaya devam edebilir. Yara iyileşmesinin bu son aşaması sonuçta yara izi oluşup oluşmayacağını ya da yaranın

kronik olup olmayacağını belirler. Yeniden yapılanma aşaması, yeni damar yapısının gerilemesi, ECM birikimi ve granülasyon dokusundan skar dokusunun yeniden oluşturulmasından oluşur (Rodrigues ve diğerleri, 2019). Granülasyon dokusu büyük oranda kollajen III'ten oluşur ve yaranın yeniden şekillenmesi ilerledikçe bunun yerini kısmen daha güçlü kollajen I alır. Bu süreç, eş zamanlı kolajen I sentezi ve kolajen III lizizinin bir sonucudur ve bunu ECM'nin yeniden düzenlenmesi takip eder (Gurtner ve diğerleri, 2008). Yeniden epitelizeasyon meydana geldiğinde, granülasyon dokusu içindeki miyofibroblastlar, MMP'leri ve bunların ilgili inhibitörleri sentezlemeye devam eder (Caley ve diğerleri, 2015; Visse ve Nagase, 2003). MMP'ler ECM'nin belirli elemanlarını hedefleyerek ECM'yi yıkıma uğratar ve bu süreçte ECM sentezi oldukça yavaşlar. Böylece granülasyon dokusunda bulunan kollajen III giderek azalır ve yerini kollajen I alır (Darby, Laverdet, Bonté ve Desmoulière, 2014). ECM modifikasyonunun ardından MMP inhibitörleri bu enzimlerin aktivitesini bloke etmeye başlar ve daha fazla ECM bozulmasını durdurur. MMP inhibitörleri ve MMP ekspresyonu arasındaki dengesizlik, anormal ECM modifikasyonuna ve hatta kronik yaralara yol açabilir (Gill, Pape, Khokha, Watson ve Leco, 2003; Telgenhoff ve Shroot, 2005). Yara iyileşme sürecini tamamladığında miyofibroblastlar apoptoza uğrar (Hinz ve Gabbiani, 2003). Granülasyon dokusu içindeki hücreler, yaranın yeniden şekillenmesinin ardından apoptoza uğramadığında hipertrofik skarlar oluşma eğilimi gösterir (Desmoulière ve diğerleri, 1995). Makrofajlar yeniden şekillenme aşamasında, fibrolitik bir fenotip aldıkları, aşırı ECM'yi parçaladıkları, ECM kalıntıları ve apoptotik hücreleri yuttukları için oldukça önemlidir. Bunun bir örneği makrofajlar ve fibroblastlar arasındaki etkileşimdir. Eğer miyofibroblastlar CD47 “beni yeme” sinyalini aşırı eksprese ederse, bu onların fagosite edilmesini ve makrofajlar tarafından elimine edilmesini engeller. Bu durumda yara iyileşmesi hiper trofik skar oluşumuyla sonuçlanabilir (Wernig ve diğerleri, 2017). Anjiyogenez sırasında oluşan kan damarları sızıntılıdır, sıkı hücre-hücre temaslarından yoksundur ve granülasyon dokusuna doğru dallanır. Yeniden yapılanma sırasında yeni damarlar, homeostaziye sürdürebilen stabil kan damarları oluşturmak ve hareketsiz endotel hücreleri oluşturmak için budanmaya tabi tutulur. Yeniden epitelizeasyon aynı zamanda damar budamasında da rol oynayabilir (Rodrigues ve diğerleri, 2019).

2.3. Kronik Yaralar

Normal yara iyileşmesi hemostasis, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme aşamaları olmak üzere birbirini takip eden ve aynı zamanda da örtüşen aşamalardan oluşur

(Lindley, Stojadinovic Pastar, ve Tomic-Canic, 2016). Bununla birlikte, yaralar bu süreçlerden organize bir şekilde geçemediğinde, cilt dokusunun iyileşmesi gecikir bu durum sonunda kronik yaralara neden olur. İyileşmeyen yaraların ortak özellikleri eksüdasyon, tekrarlayan enfeksiyon, doku nekrozu, kusurlu yeniden-epitelizasyon, az miktarda anjiyogenez ve aşırı ROS üretimidir (Larouche, Sheoran, Maruyama ve Martino, 2018; Huang, Gou, Da, Zhang ve Xie, 2020). Genel bağlamda kronik yaralar, diyabetik ayak ülserleri, vasküler ülserler ve basınç ülserleri olmak üzere üç ana kategoriye ayrılabilir (Piipponen, Li, ve Landén, 2020). Genellikle bu durumlar diyabet, damar hastalıkları ve obezite gibi patolojik durumlardan mustarip yaşlı kişilerde görülürler. Diyabetik ülserler, TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin aşırı ekspresyonunun ve IL-10 ve TGF- β dahil olmak üzere iyileştirici araçların üretiminin azalmasının neden olduğu için yarada yüksek derecede pro-inflamatuvar bir profile sebebiyet verir. Bu durum, M1 fenotipine doğru makrofaj polarizasyonuna sebebiyet vererek, CD8+ T hücrelerinin aktivasyonu ve degranülasyonuna yol açarak doku nekrozu ile sonuçlanır (Seraphim ve diğerleri, 2020). Kronik yara iyileşmesi Şekil 2.6'da görüldüğü üzere, inflamasyonun geç evresinde makrofajlar, nötrofiller ve monositler gibi miyeloid hücre popülasyonlarının uzun süreli varlığı ile karakterize edilir. Aksine, süreç boyunca LC'lerin, dermal dentritik hücrelerin ve eozinofillerin yüzdesi azalır



Şekil 2.6. Kronik yara iyileşmesinde hücreler ve sitokinlerin ifadesi (Raziyeva ve diğerleri, 2021)

Kronik yara iyileşmesinde nötrofiller: Düzenli yara iyileşmesinde nötrofiller inflamatuvar yanıtı düzenleyebilir. Nötrofiller fonksiyonlarını tamamladıktan sonra apoptotik bir hücre ölümü yolunu başlatır ve bunu makrofajlar tarafından fagositoz edilmeleri takip eder (Ellis ve diğerleri, 2018). Ancak süreç herhangi bir noktada bozulursa yara ortamında uzun süre nötrofil varlığına yol açabilir. Nötrofil apoptozunun azalması ve ECM'yi bozduğu bilinen elastaz ve MMP'ler gibi nötrofilden türetilmiş proteazların seviyesinin artması kronik kutanöz yaralara sebep olabilmektedir (Ellis ve diğerleri, 2018).

Kronik yara iyileşmesinde makrofajlar: Makrofajlar iyileşme sırasında çok önemlidir, ancak yaralı ortamda uzun süre bulunmaları veya onarım sırasındaki düzensizlikler, yara iyileşmesinin bozulmasına ve fibrozise neden olur (Zomer, Jeremias, Ratner ve Trentin, 2020). Makrofajların pro-inflamatuvar M1 fenotipinden pro-iyileşen onarıcı M2 fenotipine doğru polarize olma başarısızlığı, zayıf iyileşen yaralarla güçlü bir şekilde ilişkilidir (Wilkinson ve Hardman, 2020). Bu başarısızlık, yara mikro çevresindeki proinflamatuvar sitokinlerin aşırı ekspresyonundan ve apoptotik nötrofillerin makrofajlar tarafından yeterince temizlenememesinden kaynaklanmaktadır (Kohno ve diğerleri, 2021). IL-1 β , yara makrofajlarındaki inflamatuvar aktivitenin yukarı yönde düzenleyicisidir ve bu, onların anti-inflamatuvar bir fenotipe doğru polarizasyonunu önler (Raziyeva ve diğerleri, 2021). Bununla birlikte, pro-inflamatuvar fenotipten anti-inflamatuvar fenotipe güçlü bir geçiş aynı zamanda M1-M2 dengesini de zayıflatır. Yara iyileşmesi sırasında M2 makrofajlarının aşırı aktivitesi, hipertrofik skar oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (DiPietro, Wilgus ve Koh, 2021). M2 makrofajları, MMP-10 ve TGF- β 1'i salgılayanın yanı sıra ECM proteinlerinin sentezini artırarak skar oluşumuna katkıda bulunur (Feng ve diğerleri, 2019). Genel bağlamda M1-M2 polarizasyonunun düzenlenmesi uygun yara iyileşmesi için çok önemlidir. Bu dengedeki herhangi bir değişiklik yaraların iyileşmemesi veya doku fibrozunun artması gibi sonuçlara yol açar (Raziyeva ve diğerleri, 2021).

Kronik yaraların iyileşmesi akışının düzeltilmesinde en büyük engellerden biri, pro-inflamatuvar mediatörlerin aşırı salgılanması sonucu yaranın inflamasyon safhasında sıkışıp kalmasıdır. Bu durum yara iyileşmesiyle ilgili klinikte hala çözülmeyi bekleyen sorunlar arasındadır. Bunun önemli nedenlerinden biri de yaranın bakteri ile enfekte olması ile yara ortamında bakteriyel (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *Candida albicans*) biyofilm oluşmasıdır (Versey ve diğerleri, 2021; Raziyeva ve diğerleri, 2021). Biyofilmler nötrofilleri ve proinflamatuvar makrofajları aktive ederek konakçı bağışıklık sistemi ile

etkileşime girer böylece çeşitli MMP'lerin yanı sıra, TNF- α ve IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin birikmesine sebep olur (Wu, Cheng ve Cheng, 2019). Kronik yaralardaki düzensiz bağışıklık ortamı, bakterilerin üremesine ortam hazırlayarak biyofilmin büyümesine yol açar. Bu durum yara iyileşmesini içinden çıkılamaz bir sürekli inflamasyon döngüsünde sıkıştırır (Raziyeva ve diğerleri, 2021). Dahası, gelişen biyofilmle beraber antimikrobiyal ajanların biyofilme penetrasyonunun azalması, çoklu mikrobiyal türlerin varlığı, biyofilmdeki bakteriler tarafından hızlı antibiyotik direncinin geliştirilmesi gibi birçok zorluk nedeniyle biyofilmlerin terapötik olarak giderilmesi oldukça zordur (Omar, Wright, Schultz, Burrell ve Nadworny, 2017). Hücresel perspektifle yarayı kronikleşmeye götüren mekanizmalara akut yara iyileşmesi kısmında değinilmiştir. Bahsi geçen durumlardan ötürü kronik yaraların iyileşmesini modüle etmek için yaranın karakterizasyonuna göre çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejiler genel başlıklar olarak biyoaktif maddeler, biyomalzemeler ve hücre bazlı stratejiler olarak sınıflandırılabilirler (Kathawala ve diğerleri, 2019). Yara iyileşmesindeki aşamaları doğrudan ya da dolaylı yoldan uyaran biyoaktif maddeler, klinik öncesi çalışmalarda olumlu sonuçlar göstermiştir. Biyomalzemeler ise yara iyileşmesi için fiziksel ve çevresel bir bariyer sağlamak için tek başlarına kullanılabilir. Buna ek olarak biyoaktif maddelerin biyomalzemelerle kombinasyonları, etken maddenin kontrollü salınımı teşvik edecek ve yarılanma ömürlerini artıracaktır. Yara iyileşmesi için başka bir terapötik strateji, kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücreler, adipöz kaynaklı hücreler, epidermal hücreler ve buna benzer hücre bazlı stratejilerdir (Raziyeva ve diğerleri, 2021). Hücre bazlı stratejiler kapsamında yapılmış pek çok çalışmada, bu stratejilerin yara bölgesinde anjiyogenezi ve yeniden epitelizasyonu destekleyerek yara iyileşmesini güçlendirdiği gözlemlenmiştir. Yukarıda bahsi geçen tüm bu stratejiler yara iyileşmesinde immün modülatör amaçlar doğrultusunda kronik yaralara karşı kullanılabilir (Raziyeva ve diğerleri, 2021).

2.4. Yara Bakım Maaliyetleri

Deri yaralanmalarının dünya genelinde sağlık sistemleri ve ekonomi üzerine getirdiği muazzam bir yük vardır (Raziyeva ve diğerleri, 2021). Geçtiğimiz yıllarda dünya çapında deri yaralanmaları ile ilgili yaklaşık bir milyar insanın akut ve kronik yaralardan mustarip olduğu bildirilmiştir (Garraud ve diğerleri, 2017). Akut yaralanmalar klinikte tedavi imkânı olarak kolay olmakla birlikte kronik yaralara geldiğimizde durum hem hastalar için hem de sağlık sistemleri için daha vahimdir. Hizmet sektörünün ön planda olduğu gelişmiş ülkelerde

ise sadece kronik yaralarla ilgili harcamalar toplam sağlık harcamalarının %3'ünü oluşturduğu tahmin edilmektedir (Olsson ve diğerleri, 2019). Bu durumun bir örneği olarak yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde, iyileşmeyen yaralar için her yıl yaklaşık 50 milyar dolar, cerrahi insizyon ve travma yaraları için yaklaşık 12 milyar dolar ve yanık yaraları için her yıl 7,5 milyar dolar sağlık bakım maliyetine tekabül ediyor (Rodrigues ve diğerleri, 2019). Diyabetli hastalar, yaşlılar ve orak hücreli gibi genetik bozuklukları olan hastalar uzun süreli doku bozukluğuna yol açan anormal yara iyileşmesine özellikle yatkındır (Rodrigues ve diğerleri, 2019). Uzun süreli açık yarası olan kişilerin büyük çoğunluğunda başka önemli sağlık sorunları da vardır. Kronik hastalıkların bir arada bulunmasına komorbidite denir. Kronik yaralar sıklıkla eşlik eden hastalıklar nedeniyle karmaşık hale gelir ve kronik yaraların başlı başına bir hastalık olarak izlenmesini zorlaştırır (Sen, 2020). Artan yaşlı nüfusunun, dünya çapında artan diyabet riskiyle birleşmesi, kronik yaraların sağlık bakım maliyetlerine ve morbiditesine önemli bir katkıda bulunur (Goldberg ve Diegelmann, 2020). DSÖ'nün 2010 istatistiklerine (WHO, 2010) göre, 58 milyon insan ölümcül yaralanmalardan etkilenmektedir ve bunların arasında her yıl 5 milyon kişi hayatını kaybetmektedir (Sahana ve Rekha, 2018). Yaraları tedavi etmek için 3000'den fazla ürün geliştirilmiş olmasına rağmen klinik ve ekonomik anlamda yeterli değildir. Milyonlarca insan yaşadıkları yaralanmalarla ilgili uygun tedavi ve bakıma ihtiyaç duyuyor olduğu için bu durum topluma ve bireylere hala ciddi manada yük olmaya devam etmektedir (Dhivya ve diğerleri, 2015).

Basınç ülserleri: Amerika'da hastaneden alınan aşamalı basınç ülseri maliyetini tahmin etmek için Markov simülasyonunu kullanan yakın tarihli bir çalışmaya göre, basınç ülseri yıllık maliyeti 26,8 milyar dolardan fazladır (Padula ve Delarmente, 2019). Bireysel hasta bakımının maliyeti 20.900 \$ ile 151.700 \$ arasında değişmektedir. Hastane masraflarının dışında yemek, ulaşım ve bakım için ek ücret yılda yaklaşık 43.180\$'dır. Bu bağlamda basınç ülseri bakım ürünlerine yönelik küresel pazarın 2026 yılına kadar 11,23 milyar dolara ulaşması beklenmektedir (Sen, 2020).

Diyabet: 2018 yılı itibarıyla 34,2 milyon Amerikalı (ABD nüfusunun %10,5'i) diyabetle yaşamaktadır. Seksen sekiz milyon kişide prediyabet olup tedavi edilmezse genellikle 5 yıl içinde tip 2 diyabete yol açmaktadır. Diyabet görülme sıklığının yaşla birlikte arttığı tespit edilmiştir (İnternet.2). 18-44 yaş arası yetişkinlerin yaklaşık %4,2'si, 45-64 yaş arası yetişkinlerin %17,5'i ve 65 yaş ve üzeri yetişkinlerin %26,8'i diyabet hastasıdır (İnternet.2).

Diyabet tedavisi için yapılan sağlık harcamalarının 2019 yılında 760 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (Sen, 2020).

Ayak ülserleri: Ayakta oluşan açık yaraya ayak ülseri denir. Bu yaralar yalnızca derinin yüzeyinde sığ olabilmekle birlikte; derin ülserler derinin, kasların, tendonların ve kemiklerin tam kalınlığını içerebilir (Dixon ve Edmonds, 2021). Ayak ülserleri diyabetli kişilerde ve kan dolaşımı bozuk kişilerde yaygındır (İnternet.3). Yaygın olarak mevcut olan ileri sağlık hizmetleri ve farmakoterapi tekniklerine rağmen, ayak ülseri prevalansı son yirmi yılda değişmedi (Baba, Davis, Norman ve Davis, 2015). Bu hastalığı yaşayan insanların %14 ila %24'ü amputasyon ve uzuv kayıplarından muhariptir (Sen, 2020). Yıllık olarak, dünya genelinde ayak ülseri görülme sıklığı 9,1 ila 26,1 milyon arasındadır. Ayak ülseri, Avrupa'ya (%5,1) kıyasla Kuzey Amerika'da (%13) daha yaygındır ve dünya ortalaması %6,4'tür. Erkekler kadınlara göre genel olarak ayak ülserine daha yatkındır (%3,5). Tip2 diyabet hastalarında tip1'e göre daha fazla ayak ülseri geliştirme olasılığı vardır (Zhang ve diğerleri, 2017; Schreml ve Berneburg, 2017). Global diyabetik ayak ülseri pazarı, 2019 ile 2026 arasında %6,8'lik bir yıllık bileşik büyüme oranıyla 2026 sonuna kadar 11 milyar dolara ulaşabilir. Bölgesel olarak Amerika Birleşik Devletleri, ayak ülserlerinin sürekli artan yaygınlığı, yüksek sağlık bakım maliyetleri (ürün maliyetleri dahil) ve yeni tanıtılan teknolojiler nedeniyle 2019'da tahmini 2,79 milyar dolarlık gelirle küresel pazara hâkim olmuştur (Sen, 2021).

Venöz ülserler: kronik venöz yetmezliğinden kaynaklanır ve alt ekstremitelerde daha sık görülür. Birleşik Krallık'ta yaşayan her 500 kişiden 1'inde sağlık bakım maliyetlerinde tahmini 400-600 milyon £'a mal olan venöz ülseri bulunduğunu tespit edilmiştir (İnternet.4). Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 500.000-600.000 kişi venöz bacak ülserinden musdarip ve bu da sağlık hizmetlerine yaklaşık 1 milyar dolarlık bir yük getirmektedir (İnternet.5). Birleşik Krallık'ta bu yük 400-600 milyon £ tutarındadır. Venöz ülserlerde küresel tedavi pazarının 2019'dan 2026'ya kadar %6,4'lük bir Bileşik Büyüme Oranı ile 2026'da 4,8 milyar dolara ulaşması beklenmektedir. Venöz ülser gelişimine katkıda bulunan bazı faktörler arasında yaş, göreceli hareketlilik, obezite ve derin ven trombozu gibi altta yatan diğer sebepler yer alır. Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da 65 yaş üstü kişiler venöz ülser durumuna karşı savunmasızdır (Xie, Ye, Rerkasem ve Mani, 2018).

2.5. Yaraya Uygun Terapötik Stratejiler

Geleneksel yara yönetimi uygulamaları, çeşitli cerrahi prosedürleri, cerrahi olmayan tedavileri ve cilt yaralarının onarımı için farmakolojik ajan bazlı tedavi yöntemlerini içerir (Gushiken, Beserra, Bastos, Jackson ve Pellizzon, 2021). Yara iyileşmesine yönelik cerrahi tedavi prosedürleri yara debrimanı, deri greftlerini ve deri fleplerini içerirken, cerrahi olmayan tedaviler topikal formülasyonları, yara örtülerini ve deri yapısını kopyalayan maddeleri içerir. Önce yara hacmi değerlendirmesi ve yaraların temizlenmesinin ardından debriman süreci başlar. (Bellingeri ve diğerleri, 2016). Cansızlaşmış dokunun cerrahi debrimanı, ECM'nin yeniden şekillenmesini hızlandırmak ve yara iyileşmesindeki bozulmayı önlemek için yara yatağını hazırlar (Lumbers, 2018). Bu nedenle cerrahi debriman, etkinliği nedeniyle yara tedavisinde altın standart olmaya devam etmektedir. Bu cerrahi işlem hızlı ve etkilidir ve anestezi altında yapılır; ancak genel anestezinin risklerinin artması ve çevre dokuların zarar görmesi bu sürece eşlik eden risklerdir (Kolimi, Narala, Nyavanandi, Youssef, ve Dudhipala, 2022). Deri greftleri büyük doku kaybı olan yaralarda ve kronik yaralarda kullanılır ve yaralar için en yaygın cerrahi alternatif tedaviyi temsil eder. Deri greftleri kalınlıklarına göre kısmi kalınlıkta deri greftleri ve tam kalınlıkta deri greftleri olarak sınıflandırılır. Kısmi kalınlıkta deri greftleri, yalnızca epidermal hasara sahip küçük yaraların kapatılmasında cerrahi standart olarak kabul edilmektedir (Kolimi ve diğerleri, 2022). Yaralara yönelik geleneksel cerrahi olmayan tedaviler arasında farklı türde yara örtüleri, topikal formülasyonlar, yapı iskelesi/hidrojel bazlı deri greftleri ve deri ikameleri yer alır. Bu cerrahi olmayan tedaviler yara yatağını temizler, nemi doğru bir şekilde dengeler, enfeksiyon ve iltihabı yönetir ve yeniden epitelizasyon ve kasılmayı kontrol eder (Kolimi ve diğerleri, 2022). Topikal formülasyon yolu, ilacın cilde uygulanmasının en yaygın yoludur ve jelleri, emülsiyonları, macunları, kremleri, köpükleri, losyonları ve spreyleri vb. içerir. Diğer cerrahi olmayan tedaviler, yara iyileşmesini geliştirmek için yara örtülerini içerir. Hasar görmüş cildi kaplamak için yara örtülerinin kullanılmasının faydaları arasında, yaradaki nemli ortamın korunması, aşırı hücre dışı sıvının emilmesi, enfeksiyona karşı bir bariyer oluşturulması, uygun sıcaklığın korunması, ağrının hafifletilmesi ve sağlık bakım maliyetlerinin azaltılması yer alır (Niculescu ve Grumezescu, 2022). Yara örtüleri genellikle doğal ve sentetik biyomalzemelerden elde edilir ve aynı zamanda büyüme faktörlerini, ilaçları ve diğer biyoaktif molekülleri de içerebilir. İpek fibroin, aljinat, hyaluronik asit ve diğer doğal biyomalzemelerden türetilen yara pansumanları, cildin ECM ortamını taklit eder ve yara iyileşme sürecini hızlandırır (Kolimi ve diğerleri, 2022). Ayrıca doğal, sentetik,

organik veya inorganik biyomoleküllerden elde edilen kompozit yara örtüleri çok çeşitli yaraların tedavisinde kullanılmaktadır. Yara iyileşmesine yönelik diğer en yaygın geliştirilmiş geleneksel yaklaşımlar arasında biyomühendislik ürünü deri ikameleri yer alır. Doku mühendisliğiyle üretilmiş cilt ikameleri, normal cildi taklit eden ve yara alanı etrafında koruyucu yarı geçirgen bir bariyer sağlayarak gelişmiş cilt yenilenmesi sağlayan biyomalzemeler, hücreler ve büyüme faktörleri olmak üzere üç bileşenden oluşur (Kolimi ve diğerleri, 2022). Günümüzde farklı yara türlerinin moleküler ve hücresel mekanizmalarındaki farklılıklar nedeniyle yaranın tamamen iyileşmesi için tek bir tedavi yaklaşımı yeterli değildir. Biyomedikal alandaki farklı yara türleri ve teknolojik gelişmeler göz önüne alındığında, etkili yara iyileşmesi için oldukça geniş bir yelpazede olan yara bakımı seçenekleri ortaya çıkmıştır.

2.6. Biyoaktif Maddeler

Yara iyileşmesi dinamik bir süreç olduğundan, yaranın erken evrelerinde süreçlerin doğru yönetimi ve yaranın kronik durumlara ilerlemesinin önlenmesi, istenmeyen durumlara karşı mümkün olan en iyi önleme stratejileridir (Sahana ve Rekha, 2018). Biyoaktif maddeler, yaygın olarak kullanılan, çok farklı kökenleri olan doğal polimerlerdir. Doğal polimerler ya da biyopolimerler olarak nitelendirdiğimiz biyoaktif maddeler canlı bir organizma tarafından sentezlenen organik moleküllerdir.

2.6.1. Yara iyileşmesinde biyopolimerler

Yapısal olarak biyopolimerler: peptitler, polisakkaritler, polifenoller veya polyesterler vb. oluşturmak için kovalent bağlarla tutulan amino asitlerin, monosakkaritlerin, nükleotitlerin veya esterlerin tekrar eden birimleri tarafından oluşturulur. Biyopolimerler bitki, hayvan, mantar, bakteri ve alg gibi çeşitli kaynaklardan üretilir. Biyopolimerler, yapılarına göre çeşitli yara stratejilerinde çeşitli amaçlarda kullanılmaktadırlar (Sezer ve Cevher, 2011; Nwodo Green ve Okoh, 2012; Laurienzo, 2010; Smith ve diğerleri, 2016). Yara iyileşmesinde biyopolimer olarak kullanılan biyoaktif maddeler Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Biyopolimer olarak kullanılan biyoaktif maddeler (Sahana ve Rekha, 2018)

Biyopolimerler	Monomer ve Bağlantıları	Kaynaklar	Biyolojik Rol
Kollajen	Amit bağıyla bağlanan amino asitler	Sığır, domuz vb.	Fibroblast proliferasyonunu indükler, fibroblastlar tarafından ECM bileşenlerinin salgılanmasını indükler, makrofajlar için kemotaktiktir
Selüloz	β -1,4-glikozidik bağlantıyla bağlanan β -D-glikoz	Bitki hücre duvarı ve bakteriler	Nemin tutulması, sızıntıların emilmesi
Aljinik asit	α -1, 4 glikosidik bağlarla bağlanan β -D-Mannuronik asit ve α -L-guluronik asit	Kahverengi algler	Uyarılmış monositler, fibroblast çoğalmasını ve göçünü indükler
Hiyalünorik asit	β -1,4 ve β -1,3 glikozit bağlarla bağlanan D-glukuronik asit ve N-asetil-D-glikozamin	Hayvan kökenli	Fibroblastların ve keratinositlerin çoğalmasını ve göçünü uyarır, anti-inflamatuardır
Kitosan	β -1, 4 glikozit bağla bağlanan N-asetil glukozamin	Yengeçlerin, yumuşakçaların, böceklerin, mantar hücre duvarının dış iskeleti	Fibroblast ve keratinositlerin göçünü ve çoğalmasını indükler

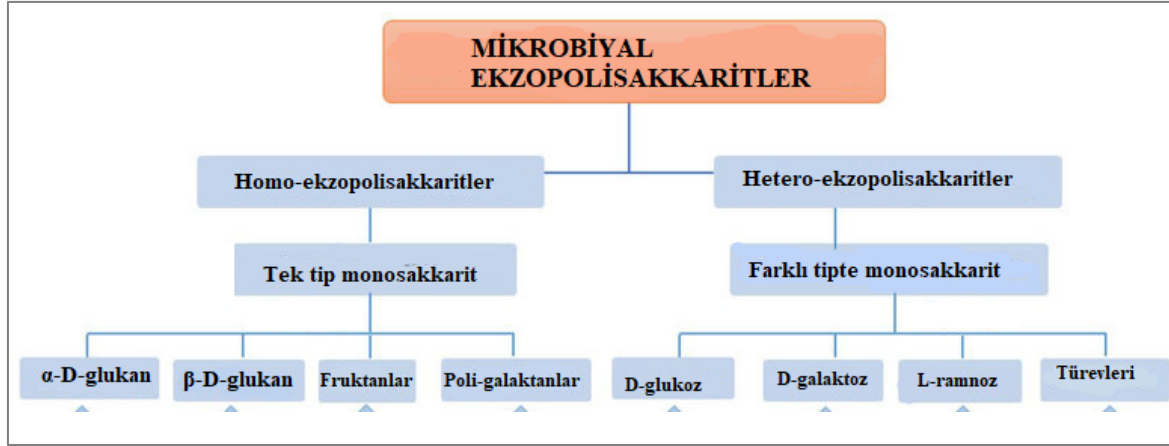
Disiplinler arası yaklaşımlardaki ilerlemeler nedeniyle, biyoaktif maddeler akıllı yara bakım malzemesi olarak kullanılabilecek umut verici sonuçlar göstermiştir (Dickinson ve Gerecht, 2016; Hamdan ve diğerleri, 2017). Biyoaktif maddeler, hücrelerle doğrudan etkileşim yoluyla veya ECM'nin aracılık ettiği iyileşmenin inflamatuvar, proliferatif veya yeniden modelleme aşamalarını hedefleyebilir (Sahana ve diğerleri, 2018). Hücrel sinyalleri modüle ederek fibroblastlar, keratinositler, makrofajlar ve endotel hücreleri gibi iyileşme sürecinin kilit hücrelerinin büyümesini, farklılaşmasını ve işleyişini indüklerler (Eming, Krieg ve Davidson, 2007; Stramer ve diğerleri, 2007).

Bitki kaynaklı doğal özler, terpenler ve fenoller içeren sekonder metabolitler biyoaktif moleküllerin zengin bir kaynağıdır. Bu moleküller antioksidan, anti-inflamatuar ve antibakteriyel aktiviteleri sayesinde yara iyileşmesini kolaylaştırabilir (Romo-Rico, Krishna, Bazaka, Golledge ve Jacob, 2022). Bitkiler alemi, keratinosit biyolojisini değiştirme potansiyeli de dahil olmak üzere çok sayıda özelliğe sahip zengin bir ikincil metabolit kaynağıdır. Keratinositler, çeşitli kimyasal, fiziksel ve biyolojik uyaranlara karşı koruyucu rol oynayan, reaktif oksijen temizleme, iltihaplanma ve yara iyileşme süreçlerine katılan önemli epitel hücreleridir (Merecz-Sitarek Sadowska ve diğerleri, 2021).

Başka bir biyoaktif madde kaynağı ise mikrobiyal organizmalardır. Mikrobiyal kaynaklı EPS'ler ve β -glukanlar yaranın çeşitli aşamalarında etkili olabileceği düşünülen güncel çalışmalarda faydası gösterilmeye başlanmış doğal polimerlerdir (Laubach ve diğerleri, 2021; Li, Tian, Fan, Tong, Ao ve Wang, 2019; Chaichian ve diğerleri, 2020). Bugüne kadar kollajen, yara iyileşmesi için en çok kullanılan biyopolimer biyomalzemelerdir, çünkü piyasada bulunan çok sayıda yapı iskelesi bu malzemeye dayanmaktadır. Bununla birlikte, son araştırmalar diğer çeşitli biyomalzemelere de odaklanmaya başlamıştır. Bunlardan biri olan bakteriyel selüloz (BC), yenilikçi yapı iskeleleri geliştirme konusunda bilimsel ilgiyi çekmiştir. Cherng ve arkadaşları bakteriyel selüloz tabanlı yapı iskelelerinin epitelyal rejenerasyon ve yara iyileşmesi potansiyelini in-vitro ve in-vivo değerlendirmiş ve oldukça etkili sonuçlar almıştır. (Cherng ve diğerleri, 2021).

2.6.2. Yara iyileşmesinde ekzopolisakkaritler (EPS)

Mikrobiyal EPS'ler, bakteri, maya, alg ve mantarlar tarafından sentezlenen, katma değeri olan ve çeşitli amaçlarla kullanılabilen, hücre dışı polimerik maddelerdir (Majee ve diğerleri, 2017). Mikrobiyal EPS'ler yüksek oranda yapı farklılığı gösteren ve farklı kriterlere göre sınıflandırılan doğal polimerlerdir. Bileşimlerine ve biyosentez mekanizmalarına göre EPS homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak iki sınıfa ayrılır. Heteropolisakkaritler, birden fazla şeker türünden oluşur ve farklı tipteki glikoziltransferaz enzimlerinin aktivitesiyle sentezlenir (De Vuyst ve Degeest, 1999). Homopolisakkaritler genellikle sukraz enziminin etkisiyle tek şeker (sakaroz) substratından sentezlenir (Van Hijum, Kralj, Ozimek, Dijkhuizen ve van Geel-Schutten, 2006). Homoekzopolisakkaritler (Homo-EPS) monomer ve bağ yapılarına göre α -D glukanlar, β -D glukanlar, Fruktanlar, Poligalaktanlar olmak üzere dört ana grupta sınıflandırılır (Prasad ve Purohit, 2023). Buna karşılık, heteroekzopolisakkaritler (Hetero-EPS) d-Glukoz, L-ramnoz, galaktoz ve çeşitli ekzopolisakkarit türevlerini içerebilen farklı monomerlerden oluşur ve aynı zamanda yüklü ve nötr şeker karışımı olarak da adlandırılır. Bu hetero-EPS aynı zamanda fosfatlar, glukoziller asetiller, proteinler, glikolipitler gibi şeker olmayan birimlerde dahil olmak üzere organik ve inorganik bileşenleri de içerebilir. (Prasad ve Purohit, 2023). EPS'lerin genel sınıflandırılması şekil 2.7'de verilmiştir



Şekil 2.7. EPS çeşitleri

EPS'nin benzersiz özellikleri, onu çeşitli gıda uygulamalarının merkezine koymuştur. Dahası, polisakkaritler genellikle güvenli ve toksik olmayan biyopolimerler olarak kabul edilir. Bu sebepten dolayı son yıllarda ilaç salınım özelliğine sahip ilaç taşıyıcı sistemlerde (drug-delivery) ve üç boyutlu doku/organ çalışmalarında yoğun bir şekilde çalışılmaktadır (Laubach ve diğerleri, 2021; Li ve diğerleri, 2019). Polisakkaritleri içeren ilaç dağıtımıyla ilgili araştırmalar, sürekli olarak minimum ila sıfır sitotoksiteyi ve test edildiğinde yeterli ilaç salınımını ve yetkin bir salınım profilini göstermiştir. Sentetik muadillerine kıyasla biyopolimerler, kullanımları açısından pek çok avantaj sunar. İlaç dağıtımında artan popülerlikleri göz önüne alındığında, muhtemelen en önemli avantajları biyopolimerlerin toksik olmadığı ve biyoyumlu olduğudur (Laubach ve diğerleri, 2021). Bununla birlikte EPS'ler immün modüle edici ajanlar olarak kullanılabilmesiyle beraber çok çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı antibakteriyel özellikler sergilediği çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (He ve diğerleri, 2019). Çeşitli mikrobiyal EPS'lerin, fagositoz yoluyla patojenleri doğrudan öldürebilen ve sitotoksik kimyasallar salarak bağışıklık sistemini dolaylı olarak koruyabilen makrofajları uyardığı gösterilmiştir (He ve diğerleri, 2019; Hamidi ve diğerleri, 2023). Polisakkaritlerdeki mannoz, glikoz, galaktoz ve/veya arabinoz kalıntılarının immün modülatör etkiye katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Tian ve diğerleri, 2021; Figueiredo, Bittencourt, Lopes, Sassaki, ve Barreto-Bergter, 2012). Hücrelerde bulunan mannoz reseptörleri, ağırlıklı olarak makrofajlar, olgunlaşmamış dendritik hücreler ve endotelial hücreler üzerinde eksprese edilen bir reseptördür (van der Zande, Nitsche. Schlautmann, Guigas ve Burgdorf, 2021). Bu reseptörler glikosile edilmiş ligandları ve patojenleri seçici olarak bağlayan ve hücre içine alınımını sağlayan bir model tanıma reseptörü olarak görev yapar ve bu nedenle çeşitli

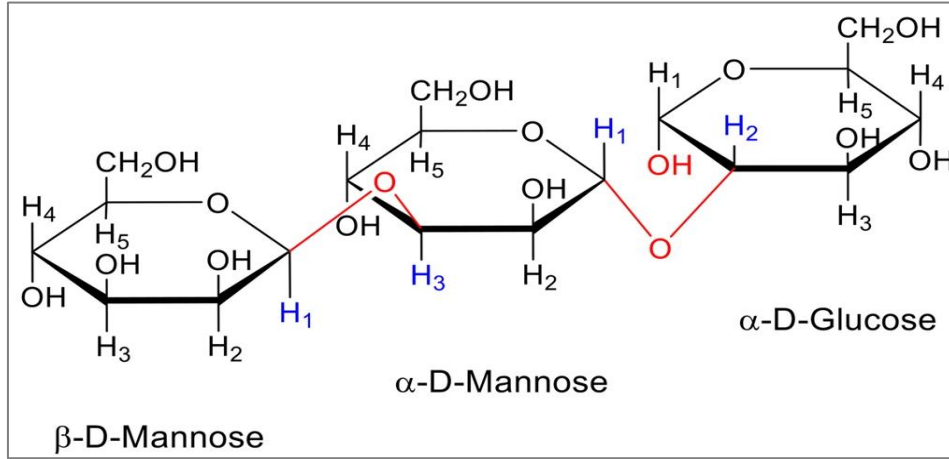
terapötik etkiler için bir hedef olarak önemli bir role sahiptir. IL-4, IL 10 ve IL-13 kaynaklı sinyallemeyle ilgili olarak mannoz reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri artış göstermiştir (Paurević, Šrajer Gajdošik ve Ribić, 2024).

Mikrobiyal EPS'ler, immün modülatör ajanlar olarak görev yapsalar da doğuştan gelen ve sonradan kazanılan bağışıklığın eylemlerini düzenleyebilirler (Salimi ve Farrokh, 2023). İmmün modüle edici etki kapsamında EPS'ler dentritik hücreler ve makrofajlarla etkileşime girerler ayrıyeten T/B lenfositlerin ve doğal katil hücrelerin proliferasyonunu tetiklerler. Tüm bunların yanı sıra antikor üretimini, hücre tümör öldürücü aktivitesini ve mononükleer hücre fagositik kapasitesini artırır ve pro-inflamatuvar (IL-6, IL-12, TNF- α ve NO) ve anti-inflamatuvar (IL-4 ve IL-10) sitokinlerin üretimini etkiler (Li ve Shah, 2016; Salimi ve Farrokh, 2023). Verilen bilgilen ışığında, özellikle son yıllarda yara iyileşmesindeki etken madde arayışında EPS'ler kayda değer bir seçenek olarak değerlendirilip çalışılmaya başlanmıştır. Yine de EPS'lerin bu bağlamda yara iyileşmesi üzerindeki etkisine ve biyomalzeme potansiyeline değinen sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalardan birinde araştırmacılar *Nostoc* sp'nin 2 suşunun (PCC7936 ve PCC7413) EPS'lerinin biyokimyasal karakterizasyonunu yapmışlar ve yara iyileşmesindeki potansiyelini değerlendirmişlerdir. Yazarlar *Nostoc*'un belirtilen 2 suşunda üretilen EPS'lerin hidrojelleriyle, fibroblast göçünün ve rejenerasyon sürecinin ilerlemesinin kolaylaşmasını sağlamakta önemli bir rolü olduğunu göstermişlerdir (Alvarez ve diğerleri, 2021). Yine başka bir çalışmada denizden izole edilen *Pantoea* sp. YU16-S3 suşunun EPS'lerinin yara iyileşmesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Yazarlar EPS-S3'ün, fibroblastların çoğalmasını ve göçünü desteklediğini, Wistar sıçanlarında eksizyon yarasının yeniden epitelizeasyonunu indüklediğini ve EGF, Wnt/ β -katenin yolunu teşvik ederek iyileşmeyi kolaylaştırdığını göstermişlerdir (Sahana ve Rekha, 2020). Literatürde yapılmış başka bir çalışmada bir araştırma grubu cilt yaralarının iyileşmesi için *Papiliotrema terrestris* PT22AV mayasından elde edilen EPS'yi çalışmıştır (Hamidi ve diğerleri, 2023). Alınan sonuçlar doğrultusunda bu EPS antioksidan ve antibakteriyel aktivitelere sahip olduğu, biyoyumlu ve hemouyumlu (kana uyumlu) olduğu gösterilmiştir. Ayrıyeten yapılan in vivo yara modeli çalışmalarında doza bağlı olarak yara iyileştirme etkisi sergilemiştir (Hamidi ve diğerleri, 2023). Probiyotik potansiyeli olan, faydalı bakteriler olarak nitelendirilen ve aynı zamanda EPS üreticileri olan *Lactobacillus* cinsi bakteriler gıda sanayisinde büyük öneme sahip olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Genelde bu bakteri ile yapılan çalışmaların ana odak noktası probiyotikler, prebiyotikler, para-probiyotikler ve post-biyotikler, fonksiyonel ve nutrasötik gıda

ürünleridir. *Lactobacillus* EPS'lerinin gıda ve sağlık açısından faydalı yönlerini gösteren birçok çalışma olmasına rağmen, yara iyileşmesi üzerine yapılmış çok sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalardan birinde *Lactobacillus* sp. Ca6 suşu tarafından üretilen EPS'nin dermal yara iyileştirme aktivitesi, in-vitro antibakteriyel ve antioksidan aktiviteleri gösterilmiştir (Trabelsi ve diğerleri, 2017). Yazarlar EPS'nin, kontrol grubuna kıyasla yara iyileşme aktivitesini önemli ölçüde hızlandırdığını ve 14 günlük yara indüksiyonundan sonra tam bir kapanmanın sağlandığını bildirmişlerdir. Bulgular, EPS-Ca6'nın önemli antioksidan ve antibakteriyel özellikler sergilediğini göstermiştir. Bu çalışmada EPS-Ca6'nın, yaralı dokunun yeniden şekillenmesi, yara kapanmasının hızlandırılması ve hücre dışı matrisin teşvik edilmesi yoluyla yara iyileşme sürecine etki ettiği bildirilmiştir (Trabelsi ve diğerleri, 2017).

İmmün modüle edici etki kapsamında yapılmış çalışmalar kapsamında, RAW 264.7 hücrelerinde Wang ve arkadaşları *Trichoderma pseudokoningii*'den elde edilen EPS'nin NO, TNF- α ve IL-1 üretiminin yanı sıra fagositik aktiviteyi de önemli ölçüde artırdığını keşfetmiştir. Bu bulgular, *T. pseudokoningii* EPS'sinin, TLR4 ve Dectin-1'in aracılık ettiği NF-B ve MAPK sinyal yolları yoluyla RAW 264.7 hücrelerini aktive ettiğini göstermektedir (Wang ve diğerleri, 2016). Başka bir araştırma grubu *Lactiplantibacillus plantarum*-12 bakterisinden ürettikleri EPS ile yaptıkları kolon kanseri çalışmalarında, in-vitro insan kolon kanseri hücre hattı olan HT-29 hücreleri üzerinde çoğalmayı önleyici etki gözlemledi. Dahası, bu EPS'in oral uygulanması, AOM/DSS ile tedavi edilen farelerin serumunda pro-inflamatuar faktörler TNF- α , IL-8 ve IL-1 β seviyelerini önemli ölçüde azalttı ve anti-inflamatuar faktör IL-10 seviyesini arttırdığı gözlemlenmiştir. (Ma ve diğerleri, 2021). EPS'lerin anti-inflamatuar etkilerinin gözlemlendiği bir başka çalışmada araştırmacılar *Lactiplantibacillus plantarum* L-14 bakterisinden elde edilen EPS'yi çalışmışlardır. Bu EPS tarafından indüklenen RAW264.7 hücreleri Toll-benzeri reseptör-4 aracılığıyla anti-inflamatuar etkiler sergilemiştir. Alınan sonuçlar ışığında bu EPS ayrıyeten TNF- α , IL-6 ve IL-1 β gibi pro-inflamatuar aracılara baskıladığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte oksidatif strese yol açtığı bilinen indüklenebilir bir nitrik oksit sentazının ifadesini aşağı yönde regüle etmiştir (Kwon ve diğerleri, 2020). Her ne kadar birçok çalışma EPS'nin anti-inflamatuar ve anti-oksidan etkileri gibi faydalı etkilerini tanımlamış olsa da altta yatan mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. EPS'lerin inflamasyon üzerine etkisi çeşitli hastalık ve mekanizmalarda çalışılmış olmasına rağmen literatürde cilt yaralanmalarında inflamasyona yönelik etkisine değinen az sayıda çalışma vardır. Yara iyileşmesinde yeni ve doğal etken

madde arayışında yapılan çalışma bu sebeple *Lactiplantibacillus plantarum* GD2 suşundan üretilen EPS'nin inflamasyon üzerindeki etkisine odaklanmıştır. Çalışılan EPS'nin ana yapısı şekil 2.8' de verilmiştir.



Şekil 2.8. Çalışılan EPS'nin ana yapısı

2.6.3. Yara iyileşmesinde β -glukanlar

β -glukan, hücre duvarlarının önemli bir bileşeni olan β -D-glikoz polisakkaritleri için genel bir terimdir ve bakteri, mantar, maya, tahıl gibi kaynaklara bağlı olarak mikrobiyal veya bitki kaynaklı glukanlar olarak sınıflandırılır (Lattimer ve Haub, 2010; Yun, Estrada, Van Kessel, Park ve Laarveld, 2003). Genel olarak beta-glukanlar, β -1,3 bağlantılı D-glikoz birimlerine sahiptir, ancak tahıl beta-glukanı hem β -1,3 hem de β -1,4 omurga bağlarını içerir. Maya ve mantar β -glukanı sırasıyla uzun β -1,6 ve kısa β -1,6 dallanmasını içerirken bakteriyel beta-glukanda dallanma yoktur (Volman, Ramakers ve Plat, 2008). Dallanma ve yapı bakımından bu dört tip β -glukan Şekil 2.7'de gösterilmiştir.

β -glukan çeşidi	Yapı	Tanımlama
Bakteriyal		Düz bağlı β 1,3-glukan
Fungal		Kısa β 1,6 dallanmalı β 1,3-glukan
Maya		Uzun β 1,6 dallanmalı β 1,3-glukan
Arpa		Düz β 1,3/1,4-glukan

Şekil 2.9. β -glukan çeşitlerinde yapısal bağlanmalar (Seo, Hyun, Choi, Kim ve Cho, 2019)

β -glukanlar, kaynağa bağlı olarak önemli ölçüde farklı fizikokimyasal özelliklere sahip tahıllarda, bakterilerde, mayalarda ve mantarlarda doğal olarak bulunan β -1,3 d-glukoz polimerleridir. Bu polimerler özellikle mantarların, hücre duvarında bulunan heterojen (nişasta-olmayan) polisakkaritlerdir (Wani, Gani, Mir, Masoodi ve Khanday, 2021). Ayrıca beta-glukanların farklı türleri, farklı moleküler ağırlık çözünürlük ve viskozite sergileyerek çeşitli fizyolojik fonksiyonlara neden olur (Lee ve diğerleri, 2015). Yalnızca glikoz kalıntıları içeren β -glukanların bağışıklık sistemindeki immün sistemi uyarıcı ve immün modülatör potansiyelleri yoğun bir şekilde incelenmiştir (Hamidi ve diğerleri, 2023). Genel bağlamda β -glukanlar, kemokinlerin, pro-inflamatuar sitokinlerin ve oksidatif reaktiflerinin (ROS) üretimini artırmanın yanı sıra; makrofajlar, nötrofiller ve antijen sunan hücreler gibi bağışıklık hücrelerini aktive eder. β -glukanların fagositoz gibi bağışıklık fonksiyonlarını modüle ettiği, anti-kanser ve anti-biyotik özelliklere sahip olduğu ve kan basıncını veya kolesterol seviyelerini düşürdüğü iyi bilinmektedir (Rahar, Swami, Nagpal, Nagpal ve Singh, 2011). β -1,3 ve β -1,6 glukanları bağlayan dektin-1, doğuştan gelen bağışıklık tepkisini başlatabilmektedir (Sun ve Zhao, 2007). Dektin-1 aktivasyonunda birkaç sinyal molekülünün dahil olduğu rapor edilmiştir. Bunlar nükleer faktör kappa B (NF- κ B), sinyal veren adaptör protein kaspaz-alımı domaini 9 (CARD9) ve aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörüdür (NFATC). Bu durum IL-12, IL-6, TNF- α ve IL-10 dahil olmak üzere çeşitli sitokinlerin salınmasına yol açar (Rahar ve diğerleri, 2011). Makrofajlar üzerinde β -glukanların opsonik olmayan tanınmasında Dectin-1 ile iş birliği yapan önemli mannoz reseptörleri vardır (Taylor ve diğerleri, 2004). β -glukanların immün modülatör etkisi, hücre hatları, hayvan modelleri ve insan denemeleri üzerinde yapılan çeşitli çalışmalardan açıkça görülmektedir (Chaichian ve diğerleri, 2020; Li ve diğerleri, 2023). Son yıllarda β -glukanların immün modülatör etkileri sayesinde yara iyileşmesini geliştirici potansiyeli ilgi odağı haline gelmiştir. Yara iyileşmesinde β -glukanların immün stimülatör aktivitesi açısından, iki etki modu mümkündür: Birincisi dolaylı aktivasyonla makrofajların çeşitli sitokinleri yoluyla kendini gösterirken; diğeri ise keratinositler ve fibroblastlar üzerindeki doğrudan etkiyle kendini gösterir (Majtan ve Jesenak, 2018).

β -glukanın yara iyileşmesindeki önemini vurgulayan bir çalışmada araştırmacılar gümüş yayın balıklarının yaşadıkları ortama β -glukan ilave ederek, balıklara açılan yaraları gözlemlemişlerdir (Dos Santos Voloski ve diğerleri, 2019). Alınan genel sonuçlarda kontrol grubuna göre yara iyileşmesinin ve kapanmasının hızlandığı ve kandaki kortizol seviyelerinin düştüğü gözlemlenmiştir. Çalışmadaki en son sonuçlar 28.günde β -glukan

ilave edilen gruplarda yara kapanması ve cilt katlanmaları tamamlanmışken; kontrol grubunda hala inflamasyon, fibrozis ve kas lifi rejenerasyonu vardır (Dos Santos Voloski ve diğerleri, 2019). Bir başka çalışmada β -glukanlar, hidrojel formunda yara iyileşmesini hızlandırma yetenekleri açısından araştırılmıştır (Muthuramalingam ve diğerleri, 2019). Sonuçlara bakıldığında β -Glukan bazlı hidrojel, yara iyileşme süresini önemli ölçüde hızlandırmıştır. Araştırmacıların iyileşmiş yara bölgesinden izole ettiği cilt dokusunda yaptığı çalışmalar dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta 3$ 'ün artan ekspresyonunu gözler önüne sermektedir. Bu durum cilt onarımından ziyade cilt yenilenmesinin gerçekleştiğini ve skar oluşumunun en aza indirildiğini göstermektedir (Muthuramalingam ve diğerleri, 2019). Bir başka araştırma grubu yaptığı çalışmada *Avena sativa*'dan türetilen β -Glukanın doza bağlı yara iyileştirme mekanizmalarını araştırmıştır. Sonuçlar incelendiğinde β -Glukan, kontrollere kıyasla fibrozisin göstergesi olan daha fazla anjiyogenez sergilemiştir (Kussie ve diğerleri, 2024). Başka bir araştırma grubu bir β -Glukan süngerini geliştirip yara örtüsü olarak test etmiştir. Alınan sonuçlar kapsamında geliştirilen sünger antioksidan, anti-enfeksiyon, anti-inflamatuar ve hücre proliferasyonu üzerinde olağanüstü bir etki göstermiştir (Zhou ve diğerleri, 2023).

β -Glukanın yara iyileşmesinde inflamatuvar etkilerini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birince araştırmacılar RAW 264.7 makrofajlarının β -glukan ile muamele edilmesi sonucunda, TNF- α , IL-6 ve PGE2 gibi birçok inflamatuvar ilişkili aracının üretimini indüklediğini gözlemledi. Ayrıca bu çalışmada makrofajların morfolojik yapısında ve fagositik aktivitesinde belirgin değişiklikler sergilediği gösterilmiştir (Xin ve diğerleri, 2022). *Saccharomyces cerevisiae*'den elde edilen β -Glukanın, bir çalışmada p38 MAPK (mitojenle aktiveleşen protein kinazlar) fosforilasyonunu düzenleyerek insan monositik lösemi (THP-1) hücrelerindeki inflamatuvar yanıtı azalttığı belirtilmiştir. THP-1 hücreleri, in vitro anti-inflamatuar çalışmalar için model olarak yaygın şekilde kullanıldığı bilinmektedir. (Qin, 2012). Visseral yağ dokularındaki inflamasyon, diyabet patolojisine katkıda bulunur. Bu doğrultuda yapılmış bir çalışmada araştırmacılar obez fareler üzerinde bir maya β -Glukanının visseral yağ dokusundaki inflamasyona etkisi çalışılmıştır (Cao ve diğerleri, 2018). Maya β -Glukanı bu hücrelerde protein ve mRNA düzeylerinde TNF- α , IL-6, IL-1 β , CCL2 ve SAA3'ün proinflamatuvar sitokinlerini aşağı yönde regüle ettiği rapor edildi. Anti-inflamatuar etki bakımından ise Azgp1'in ekspresyon seviyelerini arttırdı. Tüm bunlar dışında ayrıca alınan sonuçlar yağ dokuya makrofaj göçünü azalttığını göstermiştir. Bu bulgular, β -glukanının diyabetik farelerde anti-

inflatuar etkiye sahip olduunu ve diyabet iin bir gıda bileoeni veya terapötik ajan olarak kullanılabileceini göstermektedir (Cao ve diğeri, 2018). Baaka bir alışma grubu β -glukanın ateroskleroz üzerindeki ve bunun geişinin moleküler mekanizmaları üzerindeki immün modölatör etkilerini araştırmıştır (Wang ve diğeri, 2014). Bu alışmada insan monosit lösemi hücreleri, β -glukanın yokluğunda ya da varlığında oxLDL ile farklılaştırıldı. Alınan sonuçlarda β -glukan, CD86 ve CD80 ekspresyonunu zayıflattı ve aynı zamanda inflamatuvar sitokinler IL-2, IL-8, IL-12, TNF-a ve IFN-y'nin salınımını azaltmıştır. Sağlıklı donörlerden elde edilen monositlerle yapılan deneylerde β -glukan, IL-8, IL-12 ve TNF-a sitokinlerinin üretilmesini inhibe etmiştir. Bu alışma kapsamında ayrıyeten β -glukanın anti-inflatuar etkileri aterosklerotik plak hücrelerinde de gözlemlendiği bildirilmiştir (Wang ve diğeri, 2014). Yukarıda belirtilen alışmalar incelendiğinde β -glukanın immün modölasyonu üzerine etkisi bazı alışmalarda farklı hücre hatları üzerinden anti-inflatuar mekanizmayı güçlendirdiğini; bazı alışmalarda ise yine alışılan hücre hattına bağlı olarak pro-inflatuar mekanizmayı güçlendirdiği gözlemlenmiştir. β -glukanın yara iyileşmesi ve biyoaktif etken madde olarak alışılması üzerine yoğunlaşan alışmalar yaygınlaşmakla birlikte; immün modölatör etki üzerine yoğunlaşan genetik mekanizmaları açıklayan sınırlı sayıda alışma bulunmaktadır. Yapılan alışmada immün modölatör etki pro-inflatuar ve anti-inflatuar yolaklar üzerinden hem gen hem protein düzeyinde yapılmıştır.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Bakteri Kültürü Çalışmaları

3.1.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizma

Çalışma kapsamında kullanılan mikroorganizma bebek gaitasından izole edilmiş bir bakteri olan *Lactopantibacillus plantarum*'un GD2 suşudur. Kullanılan suş Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonuna aittir. Tez çalışmasında kullanılan bakteri suşunun biyokimyasal ve fizyolojik analizleri Prof. Dr. Belma ASLİM danışmanlığında yapılan tez ve projelerde yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda kullanılan suşun RNA alt birimi olan 16S rRNA gen bölgesi baz alınarak moleküler analizler yapılmış ve probiyotik özellikleri ortaya konmuştur (Tukenmez ve Aslim, 2018; Tukenmez ve diğerleri, 2019; Sirin ve Aslim, 2020; Sirin ve Aslim, 2021). Tez çalışmasında kullanılan *Lactobacillus plantarum* GD2 bakteri suşu taksonomi çalışmalarına göre yeni tür adı olan *Lactopantibacillus plantarum* GD2 olarak değiştirilmiştir (Zheng ve diğerleri, 2020).

3.1.2. Çalışmada kullanılan mikroorganizmanın geliştirilmesi ve muhafaza edilmesi

Lactopantibacillus plantarum GD2 suşu De Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS) sıvı besiyerinde geliştirilmiştir besiyerinin içeriği Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1. MRS broth besiyeri ortamı içerikleri

Kullanılan Maddeler	Miktar (g, L)
Beef Extract	10,00
Yeast Extract	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

Besiyeri içeriğinde verilen maddeler belirtilen miktarda tartılarak hazırlanıp distile suda çözdürülmek üzere manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından çözdürülmüş maddelerin bulunduğu çözeltinin pH'sı 6,2' ye ayarlanıp üzerine distile su eklenerek 1 litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri otoklavda (Sanyo) steril (121°C, 15 dk) edilmiştir.

Mikroorganizma %2'lik inokülasyonlarla MRS broth besiyerinde (37°C 18 saat inkübe edilerek) iki kere aktifleştirilmiştir. Çalışmaların öncesinde, bakterilerin gram boyaması ve agar besiyerine (%1,5 MRS brotha agaroz ilavesi) tek koloni ekimi yapıp temiz olduğu gözlemlenen bakteriler ile çalışmalar yürütülmüştür. Bu aşamalardan sonra mikroorganizma kültürü deneyler için hazır hale gelir. Çalışmada kullanılan bakteri suşu %10 gliserol %90 aktif bakteri kültürü olacak şekilde -30°C derecede cryoviallerde muhafaza edilir. (Tukenmez ve diğerleri, 2019).

3.1.3. GD2 suşundan EPS üretimi, saflaştırılması ve liyofilize EPS (L-EPS) eldesi

Aktif bakteri kültürü %2 oranında 800mL MRS broth besiyerine ekilerek 37 °C derecede 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda sıcak su banyosunda 95 °C'de 10 dk bırakılmış ve oda sıcaklığında %4 oranında trikloroasetikasit (Merk) eklenerek manyetik karıştırıcıda (Heidolph) 2 saat karıştırılmıştır. Bu işlemin ardından karışım 25 dk 4000 rpm'de santrifüjü (Nüve) yapıldıktan sonra, mevcut besiyeri miktarın en az iki katı kadar %96'lık soğuk alkol (Teksol) ile muamele edilerek, +4°C'de bir gece bekletilmiştir. Gece boyu inkübasyonun ardından 4000 rpm'de 25 dk santrifüj yapılarak EPS eldesi sağlanmıştır. Elde edilen EPS 1 mL steril distile suda çözdürülerek viallere 500µl olarak dağıtılmış ve en az 1 gece -80 °C derecede bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra EPS'ler liyofilizatörde (Christ alpha 2-4 LD plus) dondurup kurutma işlemiyle liyofilize edilmiştir. Liyofilize EPS'lerin (L-EPS) miktar tayini laboratuvarımızda daha önceki bir çalışmada fenol sülfürik asit yöntemiyle yapılmıştır. Bu Çalışmaya göre *Lactopantibacillus plantarum* GD2 suşundan elde edilen L-EPS miktarı 398±4,4 mg/L olarak belirlenmiştir (Demir, 2022; Tsuda ve diğerleri., 2008; Yi, Huang ve Ge, 2008; Kanmani ve diğerleri, 2011; Bunkoed ve Thaniyavarn, 2014).

3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları

Yapılan in-vitro hücre çalışmaları için L929 fare fibroblast hücre hattı (ATCC®, CCL-1™) ve RAW264.7 fare makrofaj hücre hattı (ATCC®TIB-71™) kullanılmıştır. Hücreler Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Hücre hatları ile ilgili bilgiler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan hücrelerin özellikleri (İnternet.1)

	L929 Fibroblast hücre hattı (ATCC®, CCL-1™)	RAW264.7 Makrofaj benzeri hücre hattı (ATCC®TIB-71™)
Organizma	Fare	Fare
Morfoloji	Fibroblast	Monosit/ Makrofaj
Doku	Subkutanöz bağ doku; Adipoz, Ariolar	Ascites
Uygulamalar	-Hücre Kültürü -Büyüme Koşulları, -Protein Ekspresyonu, -Stabil Hücre Transfeksiyonu, -Geçici Transfeksiyon	-3D hücre kültürü -İmmün sistem hastalıkları araştırmaları -İmmünooji

3.2.2. Hücrelerin geliştirilmesi ve muhafazası

Çalışma kapsamında yapılan in-vitro hücre deneylerinde, L929 ATCC®CCL-1™ fare fibroblast hücre hattı ve ATCC®TIB-71™ RAW264.7 fare makrofaj hücre hattı kullanılmıştır. Çalışılan hücre hatları stoktan açılırken mikoplazma test kitiyle temizlik kontrolleri yapılmıştır. Hücreler için besi yeri hazırlanırken 50ml DMEM (Gibco) için 5 ml fetal bovin serum (FBS) ve 500 µl penisilin-streptomisin antibiyotik karışımı hazırlanıp 0.22µm filtrelerden geçirilerek steril besi ortamı sağlanmıştır. Yalnızca in-vitro yara modelinin serum açlığı aşamasında kullanılacak besiyerleri FBS içermemektedir (Liang, Park ve Guan, 2007; Santhini ve diğerleri, 2018). Kültüre edilen hücreler T-75 flasklar içerisinde %5’lik karbondioksitli etüvde (Panasonic) 37 °C’de geliştirilmiştir.

Hücrelerin muhafazası için Tripsin-EDTA (Carpricorn Scientific) ile flasklardan toplanan hücreler, 2400 rpm de 4 dk santrifüj edilerek tripsinden uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti %10’luk dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich) içeren besiyerinde çözündürülerek cryoviallere aktarılmıştır. Ardından cryovialler önce 1 saat -20 °C’de sonra 1 gece -80 °C’de

ve en son olarak azot tankına alınıp -196 °C’de kademeli olarak dondurularak bir sonraki çalışmaya kadar muhafaza edilmiştir. (Lima-Neto, Fernandes, Alvarenga ve diğerleri, 2010).

3.2.3. Ticari β -glukanın çözündürülmesi

Ticari olarak temin edilebilen β -glukandan stok çözelti hazırlanmıştır. Bunun için, 1000ug β -glukan 100ul NaOH çözeltisi içinde bir gece çözündürülmeye bırakılıp daha sonra pH’ı nötralize etmek için 900ul distile su ile seyreltilmiştir. Böylece 1000 μ g/ml ana stok β -glukan çözeltimiz hazırlanmıştır. Ana stok, besiyeri ile tekrar seyreltilerek hücrelere uygulanmıştır (Kataoka, Muta, Yamazaki ve Takeshige, 2002).

3.2.4. Hücre çalışmalarında kullanılan uygulama grupları

Hücre çalışmalarında kullanılan uygulama grupları Çizelge 3.3’te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Hücre çalışmalarında kullanılan uygulama grupları. (a) Makrofajlarda pro-inflamatuar gen ekspresyon çalışmalarında LPS kontrolü olmasının yanı sıra kontrol uygulaması dışındaki tüm gruplar bu uygulama ile 12 saat inkübe edilerek uyarılmıştır

Uygulama grupları	Uygulama koşulları	Uygulamaların kullanıldığı çalışmalar
Kontrol uygulaması	Hiçbir uygulama yapılmamış DMEM besi ortamında geliştirilen hücreler.	Tüm deneylerin kontrol grubu bu şekilde tasarlanmıştır.
Serum açlığı uygulaması	FBS içermeyen DMEM besi ortamında geliştirilen hücreler	Yalnızca in-vitro yara modelinin (scratch assay) serum açlığı aşaması için kullanılmıştır.
LPS kontrol uygulaması (a)	1 μ g/ml LPS konsantrasyonu içeren DMEM besi ortamında geliştirilen hücreler	Pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını teşvik etmek için makrofaj hücrelerinde kullanılmıştır.
B-glukan uygulaması	Farklı konsantrasyonlarda β -glukan içeren DMEM besi ortamında geliştirilen hücreler	Tüm deneylerin β -glukan uygulaması grubunda kullanılmıştır.
GD2 EPS uygulaması	Farklı konsantrasyonlarda EPS içeren DMEM besi ortamında geliştirilen hücreler	Tüm deneylerin EPS uygulaması grubunda kullanılmıştır.
B-glukan/L-EPS kombinasyon uygulaması	Farklı konsantrasyonlarda β -glukan/EPS kombinasyonu içeren DMEM besi ortamında geliştirilen hücreler.	Tüm deneylerin β -glukan/EPS kombinasyonu grubunda kullanılmıştır.

MTT çalışmalarında L-EPS grubu uygulaması tüm hücrelerde 500 ve 1000 μ g/mL konsantrasyonlarında yapılmıştır. Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada 1000 μ g/mL konsantrasyondaki L-EPS’nin, L929 fibroblast hücreleri üzerinde hücre canlılığı ve hücre göçü yönünden etkili sonuçları verdiği bildirildiği için fibroblast çalışmalarında bu

konsantrasyon kullanılmıştır (Demir, 2022). 264.7 RAW makrofaj hücrelerinde yapılan ön çalışmalarda ise 1000µg/mL L-EPS konsantrasyonu hücre canlılığını olumsuz etkilemiştir. Aynı hücrelerde yapılan gen ifadesi çalışmaları pro-inflamatuar genlerin inhibe edilmesi noktasında yetersiz kaldığı için L-EPS grubu 500µg/mL konsantrasyona düşürülmüştür. EPS grubunun 18 saatlik inkübasyonu RAW264.7 makrofaj hücrelerindeki gen ekspresyonu çalışmalarında özellikle pro-inflamatuar gen ifadelerinde anlamsız sonuçlar vermiştir. Alınan anlamsız sonuçlardan dolayı uygulama süresi 18 saatten 6 saate düşürülmüştür.

MTT analizlerinde kullanılan β-glukan uygulaması tüm hücrelerde 10 ve 15µg/mL konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Bu doğrultuda alınan en etkili sonuç 10µg/mL β-glukan konsantrasyonu olduğu için gen ekspresyon çalışmalarında tüm hücrelerde bu uygulama üzerinden devam edilmiştir. B-glukan grubunun uygulama süreleri L929 fibroblast hücrelerindeki MTT, in-vitro yara modeli ve gen ekspresyonu çalışmaları için 18 ve 24 saattir. RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde β-glukan grubunun MTT analizi 18 ve 24 saat yapılmıştır. Gen ekspresyonu çalışmalarına geçtiğimizde başta β-glukan uygulamasının 18 saatlik inkübasyonu yapılmış ve sonradan alınan daha etkili sonuçlardan dolayı inkübasyon süresi 6 saate düşürülmüştür.

3.2.5. MTT analizi ile sitotoksitenin belirlenmesi

MTT analizi, suda çözünebilen sarı renkli MTT'nin [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] mitokondriyal bir redüktaz etkisiyle çözünemeyen mor renkli formazan kristallerine dönüşmesini içerir. Yoğun formazan kristali ve yoğun mor renk yoğun mitokondriyal aktiviteye işaret eder. Bu renkteki yoğunluk, optik yoğunluk ölçen cihazlarla okunur ve deneyin kontrol grubuna göre yüzde canlılık hesaplamaları yapılır (Kumar, Nagarajan ve Uchil, 2018).

L929 ve RAW264.7 hücre hatlarında uygulamaların (Bkz. Çizelge 3.3) farklı zaman ve konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisi MTT analizi ile belirlenmiştir. MTT analizi 96'lık well platelerde kuyu başına yaklaşık 1×10^4 hücre düşecek şekilde hazırlanmıştır. Prof. Dr. Belma ASLİM'in danışmanlığında tamamlanan Abdullah DEMİR'in yüksek lisans tez çalışmasında L929 hücreleri için en etkin L-EPS konsantrasyonu 1000µg/mL olarak bildirilmiştir (Demir, 2022). Bundan dolayı bu çalışmada da bu L-EPS konsantrasyonu üzerinden devam edilmesine karar verilmiştir. Test edilen

mikrobiyal β -glukanın seçilen dozları Seo, G ve çalışma arkadaşları (2019) tarafından hem yara kapatma da hem de hücre göçünde etkili olduğu bildirilmiştir. Deneyde β -glukan konsantrasyonu olarak 10 μ g/mL ve 15 μ g/mL uygulamaları seçilmiştir. (Seo ve diğerleri, 2019). 264.7 RAW makrofaj hücrelerinde yapılan ön çalışmalar sonucu 1000 μ g/mL L-EPS konsantrasyonu hücreleri olumsuz etkilediği için L-EPS konsantrasyonu 500 μ g/mL ye düşürülmüştür.

Bu analizlerde 18 ve 24 saat olmak üzere iki farklı zaman aralığı test edilmiştir. RAW264.7 hücre hattında pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokinler çalışılacağı için iki farklı deney uygulama modeli kullanılmıştır. İlk modelde makrofajlarda proinflamatuar fenotipin gözlemlenmesi için hücreler 12 saatlik 1 μ g/ml konsantrasyonda LPS uygulama grubuyla uyarılmıştır. Uygulama gruplarının pro-inflamatuar sitokinler ile bağışıklık cevabı etkisi belirlenmesi için LPS indüklenmesi kullanılmıştır. LPS'nin yapısında bulunan ve bir endotoksin olan lipitA organizmadaki bağışıklık tepkilerini ve inflamasyonu harekete geçirmektedir. Bu durum bağışıklık cevabını oluşturan pro-inflamatuar etkinin gözlemlenmesi için oldukça kullanışlıdır. (Gram ve Kowalewski, 2022). Ardından uygulama grupları belirlenen konsantrasyon ve sürelerde uygulanmıştır. Oluşturulan ikinci modelde anti-inflamatuar etki LPS uygulaması olmadan çalışılmıştır. Elde edilecek sonuçlara bağlı olarak, hücreler için toksik olmayan etkili konsantrasyon ve süreler belirlenmiştir (Seo ve diğerleri, 2019).

3.2.6. İn-vitro yara modeli

İn-vitro yara modeli (scratch assay), hücre kültüründe yarayı taklit etmek amacıyla çizik atılarak hücrelerin göç etmedeki dolayısıyla yara kapatmadaki etkinliklerinin ölçüldüğü bir analizdir. Bu protokol 4 ana unsurdan oluşur: hücrelerin kültüre edilmesi, çizik yara modeli oluşturulması, hücre göçünün görüntülenmesi ve verilerin analizi (Martinotti ve Ranzato, 2020) Bu çalışmada kültüre edilen L929 hücreleri, 24 kuyucuklu plate'lere kuyucuk başına 5×10^4 hücre olacak şekilde transfer edilmiştir. Hücreler karbondioksitli (%5) etüvde 37 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücrelerin besiyeri FBS içermeyen besiyeri ile değiştirilip 8 saatlik serum açlığına bırakılmıştır. Serum açlığı sonunda kuyucuklarda p200 pipet ucu kullanılarak yapay bir yara alanı oluşturulmuştur.

Mikroskop yardımıyla yapay yaranın oluşturulduğu uygun kuyular seçilip, ilgili kuyulara belirtilen uygulamalar (Bkz. Çizelge 3.3) yapılmıştır. Uygulamalardan sonra 0.saat, 18.saat ve 24.saat görüntüleri alınmıştır. Görüntüler, image-J programı ile analiz edilip, sonuçlar yara kapanma yüzdesi (%) ve yüzde (%) verimlilik olarak verilmiştir.

$$\% \text{ Yara Kapanma} = (\Delta 0h - \Delta th) / \Delta 0h \times 100 \quad (\Delta 0h: 0. \text{ Saat yara alanı}) \quad (3.1)$$

$$/ \Delta th: t. \text{ Saat yara alanı})$$

$$\% \text{ Verimlilik} = [(uygulama \% \text{ kapatma} \times 100) / \text{kontrol} \% \text{ kapatma}] - 100 \quad (3.2)$$

Görüntüler yukarıda belirtilen formülleri kullanarak hesaplanmıştır (Liang ve diğerleri, 2007; Santhini ve diğerleri, 2018).

3.3. Gen Ekspresyon Çalışmaları

3.3.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Bu çalışma kapsamında belirlenen uygulama gruplarının ilk aşamada L929 hücre hattı üzerindeki yara iyileştirmesinde görev alan kilit genlere etkisi incelenmiştir. Bu genler kollajen (COL1A1), fibronektin (FN), fibroblast büyüme faktörü (FGF-2) ve delta benzeri homolog (DLK1) genleridir. Kültüre edilen hücreler, 6 kuyucuklu well-platelere, kuyucuk başına 5×10^5 hücre düşecek şekilde transfer edilmiştir. Ardından kuyucuklara deney grupları (bkz. Çizelge 3.3) uygulanmıştır. Burada kullanılan etken madde konsantrasyonlarının yara iyileşmesinde önemli rol oynayan genler üzerinde ekspresyon artırıcı özelliğinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Etken maddelerin uygulamalarında RAW264.7 hücre hattı için 2 farklı model uygulanmıştır. Pro-inflamatuar sitokinlerin gen ekspresyon analizleri 12 saatlik LPS indüklemesinin ardından deney grupları (Bkz. Çizelge 3.3) uygulanmıştır. RAW 264.7 hücre hattı için kurulan ilk deney modelinde çalışılan proinflamatuar sitokinler IL-1 β , TNF- α ve IL-6 genleridir. LPS indüklemesinin yapıldığı deney modelinde uygulama gruplarının inflammatuar yanıtı inhibe edip etmediği araştırılmıştır. LPS indüklemesi olmayan ikinci deney modelinde amacımız uygulama gruplarının iyileşme sürecini başlatan anti-inflamatuar gen ifadelerini arttırıp arttırmadığını belirlemektir. Bu modelde çalışılan anti-inflamatuar sitokinler IL-10, TGF- β ve IL-4 genleridir. 264.7 RAW hücresiyle yapılan ön

Çalışmalarda 1000µg/ml L-EPS konsantrasyonlarıyla deneyler yapılmış ve istenilen sonucun alınamaması üzerine, EPS konsantrasyonu 500µg/ml'ye inkübasyon süresi de 18 saatten 6 saate düşürölmüştür.

Hücrelerden Total RNA izolasyonu için, GeneAll® Hybrid-R™ RNA izolasyon kiti kullanılmıştır. RNA izolasyonu boyunca üretici firmanın talimatları uygulanarak yapılmıştır. Hücre peletinin üzerine 500µl RiboEx™ solüsyonu ve 100µl kloroform eklenmiştir. Hücreler solüsyonda çözüldükten sonra 4°C'de 12000 g'de 15 dk santrifüj edilmiş ve ependorflarda 3 faz meydana gelmiştir. Bu fazlardan renksiz sulu üst faz steril bir ependorfa aktarılır. Ependorfdaki numuneye kitin içinde bulunan Buffer RB1 500µl eklenerek karıştırılmıştır ve meydana gelen bu karışım izolasyon kolonlarına aktarılmıştır. Oda sıcaklığında ≥10000 g'de 30 sn santrifüjledikten sonra kolonun altında biriken geçiş atılarak temiz bir ependorfa tekrar takılmıştır. İzolasyon kolonuna 500 µl BufferSW1 eklenip tekrar oda sıcaklığında ≥10000 g'de 30 sn santrifüjledikten sonra kolonun altında biriken akış tekrar atılır ve kolon aynı ependorfa tekrar takılır. İzolasyon kolonuna 500 µl Buffer RNW eklenip tekrardan oda sıcaklığında ≥10000 g'de 30 sn santrifüjleyip geçiş sıvısını atılmış ve kolon aynı ependorfa tekrar yerleştirilmiştir. Kalan yıkama tamponunun çıkması için kolon boş bir şekilde oda sıcaklığında ≥10000 g'de 1dk daha santrifüjledikten sonra kolon ortasına 50µl nükleaz içermeyen su eklenerek yıkama yapılmış ve oda sıcaklığında ≥10000 g'de 1dk santrifüj yapılmıştır. İzole edilen RNA'nın kantitatif analizi, Take3 Micro-Volume Plate kullanılarak, mikropIaka okuyucuda (Epoch, Biotek) gerçekleştirilmiştir. İzole edilen total RNA'ların mikropIaka okuyucu (Epoch Biyotek) cihazında 260 ve 280 nm dalga boyunda okumaları yapılmış ve 260/280 saflık değerleri ~2,0 olan örnekler çalışmalarda kullanılmıştır. İzole edilmiş total RNA bir sonraki çalışmaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Total RNA (1 µg), cDNA sentez kiti ile cDNA'ya dönüştürölmesi için High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Steril PCR tüplerinde 2µL 10xRT buffer, 0,8 µL 25xdNTP karışımı (100 mM), 2 µL 10XRT Random Primerleri, 1 µL reverse transkriptaz enzimi, 4,2 µL nükleaz-free water ve 10 µL total RNA'dan eklenmiştir ve nihai olarak PCR tüpü içerisinde 20 µL hacim bulunmaktadır. Her bir tüp 25 °C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk ve 85 °C'de 5 dk polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutularak cDNA sentezi tamamlanmıştır. Sentez sonrası cDNA'nın kantitatif analizi Epoch (Biyotek) mikropIaka okuyucu cihazında 260 ve 280 nm dalga boyunda okutulmuş, 260/280 saflık

değerleri ~1,8 olan örnekler çalışmalarda kullanılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar çalışmalarda kullanılana kadar -30°C'de saklanmıştır. (Behera Das Kumar Bissoyi ve Singh., 2018).

3.3.2. Genlerin transkripsiyonel analizi

Tez projesi kapsamında yapılmış tüm qRT-PCR çalışmaları için Quant Studio 3 qRT-PCR (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific) cihazı ve reaksiyon için SYBR Green PCR Kiti (SensiFAST SYBR® LowROX Kit) (BIO94005- Bioline, ABD) kullanılmıştır. Çalışmada qRT-PCR için PCR wellplate kuyucuğu başına kullanılan içerikler miktarlarıyla Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. qRT PCR da well plate kuyucuk başına kullanılan bileşen miktarları

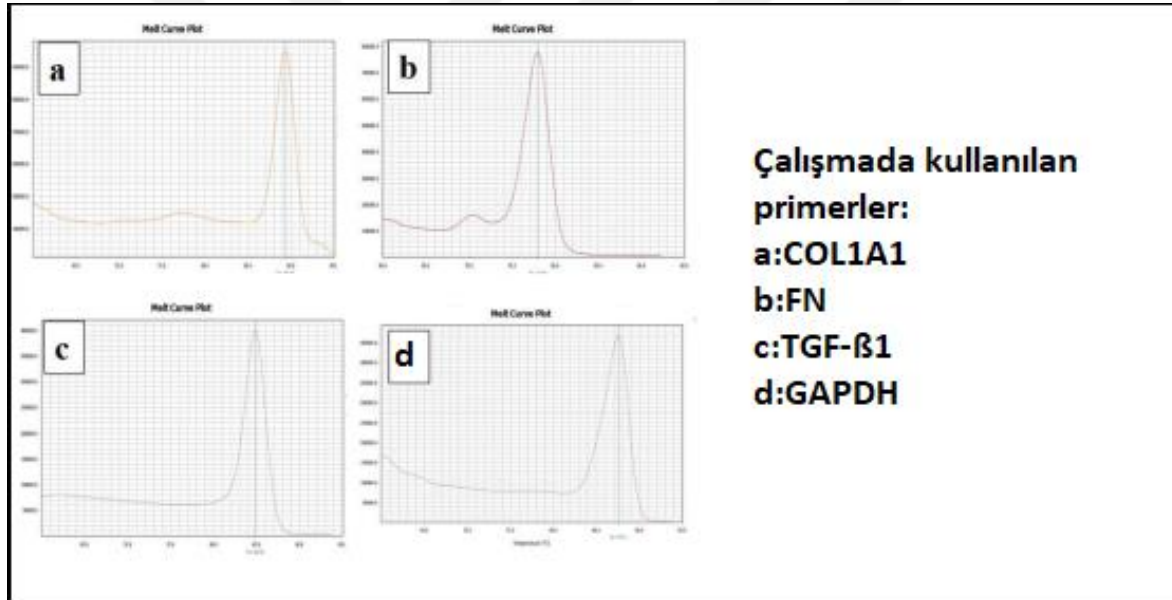
Maddeler	Miktar (μl)
SYBER green	10,0
cDNA	2,0
Hedef genin Forward primeri	0,8
Hedef genin Reverse primeri	0,8
Distile su	6,4

Tez çalışması boyunca L929 hücre hattında, sırasıyla kolajen (COL1A), fibronectin (FN), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF-β1), fibroblast büyüme faktörü (FGF-2) ve delta benzeri homolog (DLK1) genleri qRT-PCR aracılığıyla çalışılmış ve mRNA ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Çalışmalarda GAPDH geni referans gen olarak kullanılmıştır. Yapılmış olan qRT-PCR döngüleri 95°C'de 2 dakika polimeraz aktivasyonu ardından 95°C'de 5 saniye, 50-65°C'de 20 sn primerlerin bağlanması ve uzama aşaması için 72 °C'de 20 sn olacak şekilde 40 döngü olarak tamamlanmıştır. Sonradan FGF-2, DLK1 primer bağlanma sürelerindeki değişiklik deney kiti değişikliğinden kaynaklanmaktadır. Reaksiyon, SYBR Green boyası kullanılarak yapılmış daha sonra, COL1A1, FN, TGF-β1, FGF-2 ve DLK1 genlerinin nicel olarak analizi 2-ΔΔCT metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılmış primerler Çizelge 3.5'te gösterilmiştir (Behera ve diğerleri, 2018; Demir, 2022).

Çizelge 3.5. L929 hücre hattında çalışılan genlerin primerleri

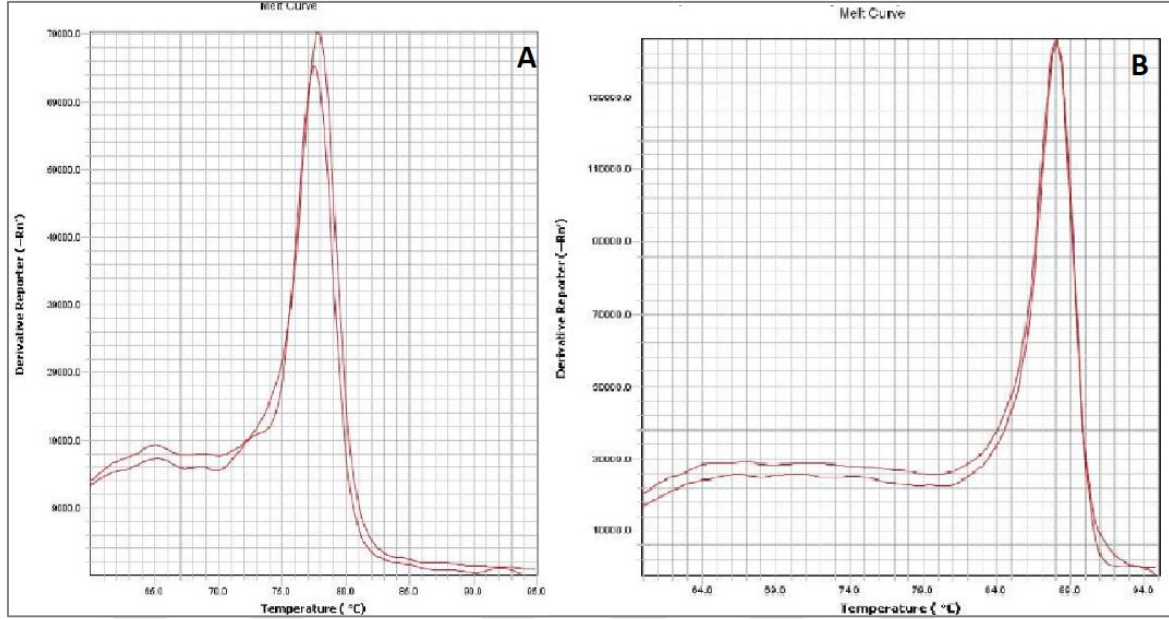
Genler	Primerler	bç
COL1A1	FW: 5'-ACATGCCGCGACCTCAAGAT-3' RV: 5'-ATGTCTAGTCCGAATTCCTG-3'	20 20
FN	FW: 5'-ATGTGGACCCCTCCTGATAGT-3' RV: 5'-GCCCAGTGATTTACAGCAAAGG-3'	21 21
TGF-β1	FW: 5'-GTGTGGAGCAACATGTGGAACCTA-3' RV: 5'-TTGGTTCAGCCACTGCCGTA-3'	25 20
DLK1	FW: 5'-CTAACCCATGCGAGAACGATG-3' RV: 5'-TCTTGTGACGAATCCAGCTG-3'	21 21
FGF-2	FW: 5'-ATCACCTCGCTTCCCGCA-3' RV: 5'-TCAGCTCTTAGCAGACATTGG-3'	18 21
GAPDH	FW: 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAA-3' RV: 5'-CTTCTCCATGGTGGTGAAGA-3'	20 20

Çalışma kapsamında kullanılan genlerin primer erime eğrileri laboratuvarımızda yapılan daha önceki bir çalışmada (bkz. Şekil 3.1) verilmiştir (Demir, 2022).



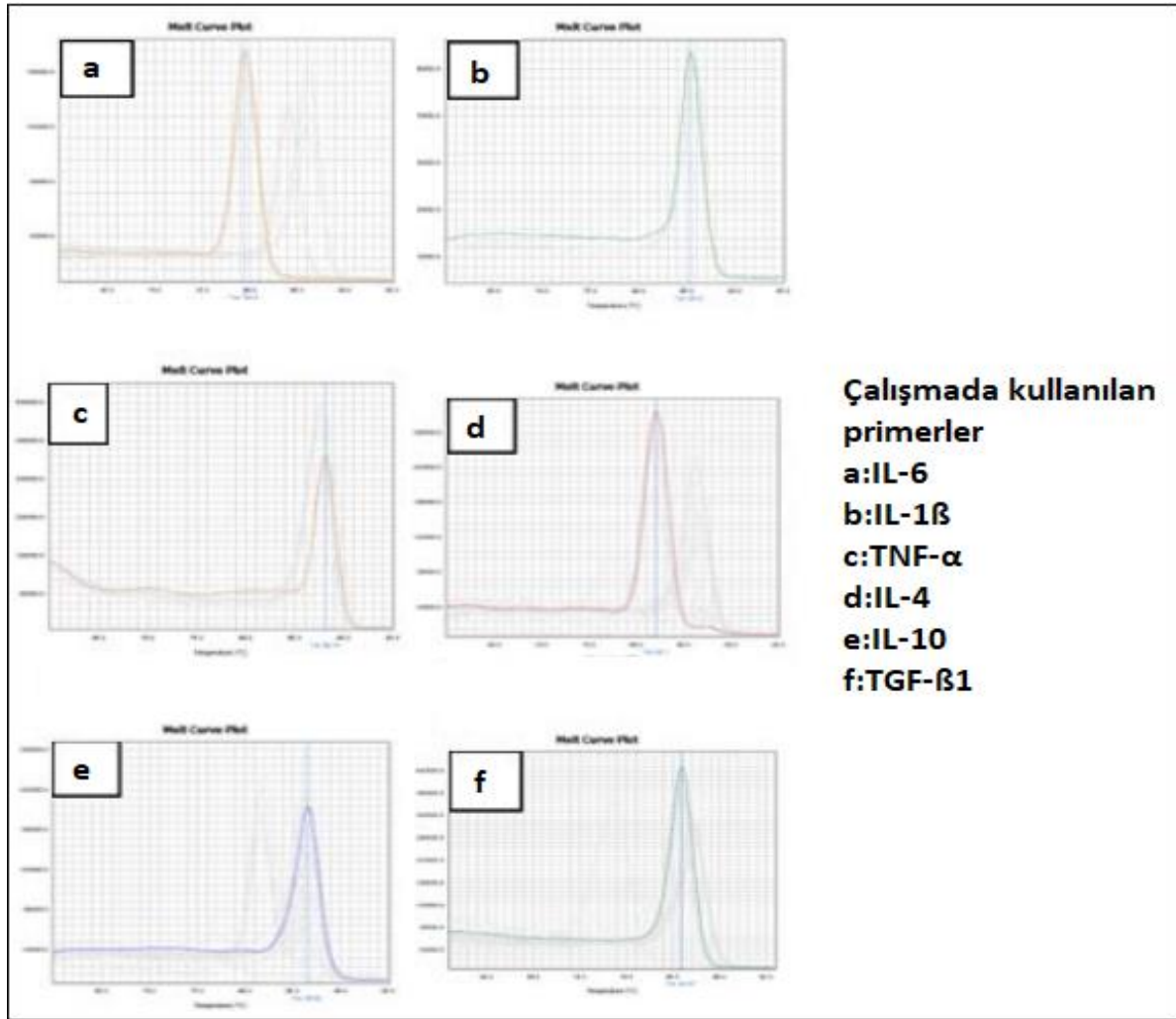
Şekil 3.1. Fibroblast çalışmalarında kullanılacak genlerin erime eğrisi (Demir, 2022)

Laboratuvarımızda ilk kez çalışılan FGF-2 ve DLK1 primerlerinin erime eğrileri Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. DLK1 (A) ve FGF-2 (B) geninin primerine ait erime eğrisi

Tez çalışması boyunca RAW 264.7 makrofaj hücre hattında, sırasıyla tümör nekroz faktörü (TNF- α), interlökin (IL)-1 β , IL-6, IL-4, IL-10 ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β) genlerinin qRT-PCR aracılığıyla transkripsiyonel analizi yapılmıştır. Burada amaç bu genler aracılığıyla uygulama gruplarımızın immün regülatör etkisini belirlemektir. Proinflamatuvar sitokinlerin baskılanması yoluyla bir regülasyon gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için TNF- α , IL-1 β ve IL-6 sitokinlerinin gen ifadeleri çalışılmıştır. Anti-inflamatuar etkiyi incelemek içinse uygulama gruplarının TGF- β , IL-4 ve IL-10 sitokinlerinin gen ifadesi çalışılmıştır. Bu sayede uygulama gruplarında immün düzenleyici ve iyileşme başlatıcı etkisinin olup olmadığını anlamak hedeflenmiştir. Çalışılan genlerin primer dizileri çizelge 3.6'da verilmiştir (Ji ve diğerleri, 2007; İçin, 2023). Çalışma kapsamında kullanılan genlerin primer erime eğrileri laboratuvarımızda yapılan daha önceki bir çalışmada (Şekil 3.3) verilmiştir (İçin, 2023).



Şekil 3.3. Makrofaj çalışmalarında kullanılacak genlerin erime eğrisi (İçin, 2023)

Çizelge 3.6. RAW264.7 hücre hattında çalışılan genlerin primer dizileri

Genler	Primerler	bç
TNF- α	FW: 5'-CAAGGGACAAGGCTGCCCCG-3'	20
	RV: 5'-GCAGGGGCTCTTGACGGCAG-3'	20
TGF- β 1	FW: 5'-GTGTGGAGCAACATGTGGAACCTA-3'	25
	RV: 5'-TTGGTTCAGCCACTGCCGTA-3'	20
IL-1 β	FW: 5'-GCAACTGTTCTGAACTC-3'	18
	RV: 5'-CTCGGAGCCTGTAGTGCA-3'	18
IL-4	FW: 5'-ACCACAGAGAGTGAGCTCGT-3'	20
	RV: 5'-AGGCATCGAAAAGCCCCGAAA-3'	20
IL-6	FW: 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'	18
	RV: 5'-TGCTGGTG ACAACCACGGCC-3'	18
IL-10	FW: 5'-CCCTGGGTGAGAAGCTGAAG -3'	20
	RV: 5'-CACTGCCTTGCTCTTATTTTCACA -3'	24
GAPDH	FW: 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAA-3'	20
	RV: 5'-CTTCTCCATGGTGGTGAAGA-3'	20

Çalışma boyunca kullanılan genlerin qPCR koşulları çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Çalışılan genlerin qRT PCR koşulları

Çalışılan tüm genlerin ortak PCR safhaları ve döngüleri		
<u>1 döngü</u> 95 °C’de 2 dk <u>40 döngü</u> 5 °C’de 5 sn 72 °C’de 20 sn uzama		
Çalışmalarda kullanılan genler	Bağlanma sıcaklıkları 40 döngü	
	L 929	RAW264.7
COL 1A1 TGF-β1 FN	60 °C’de 20sn primer bağlanması	—
IL-4 IL-10	—	60 °C’de 20sn primer bağlanması
TNF-α, IL-1β	—	62 °C’de 20sn primer bağlanması
IL-6	—	63 °C’de 20sn primer bağlanması
DLK 1	53 °C’de 30sn primer bağlanması	—
FGF-2	64 °C’de 30sn primer bağlanması	—

3.3.3. Protein izolasyonu ve protein miktarının belirlenmesi

Laboratuvarımızda protein izolasyonu için Jiang ve meslektaşlarının (2016) çalışmaları baz alınarak bazı modifikasyonlarla geliştirilmiş bir metot kullanılmıştır. Burada hem anti-inflamatuar hem pro-inflamatuar sitokinler protein düzeyinde incelenmiştir. Hücre kültürü 6 kuyucuklu platelerde uygulama gruplarıyla anti-inflamatuar proteinler için 6 ve 18 saat pro-inflamatuar sitokinler için 6 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Inkübasyona tabi tutulduktan sonra kuyucuklar steril ependorflara toplanmıştır. Ependorflar soğuk santrifüjde 4 °C’de 2500 g’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Hücre peletine 250 µL soğuk radyo-immüno presipitasyon (Ripa) lizis buffer (89900-Thermo Fisher Scientific, ABD) ve proteaz inhibitörü kokteyl tableti (11 836 153 001-Roche, Almanya veya A32963- Thermo Fisher Scientific, ABD) eklenmiştir. Ependorflar 5’er dakika aralılarla soğuk santrifüjde 4 °C ve 2500g ‘de santrifüjlenerek 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından ependorflar 4 °C ve 16000g ‘de 30 dk santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra süpernatantta bulunan berrak bölge steril bir tüpe alınıp protein saflığı için kantitatif analizler yapılmıştır. Bu analizler Pierce Bikionik asit (BCA) Protein Assay Kit (23228- Thermo Fisher Scientific, ABD) aracılığıyla üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Bu doğrultuda laboratuvarımızda daha önce bir protein standart eğrisi oluşturulmuştur (Niğdelioğlu Dolanbay, 2023). İzole edilen

protein Epoch (Biyotek) mikroparka okuyucu aracılığıyla 562 nm optik yoğunluk (OD) değerleri alınarak standart ile kıyaslanarak saflık analizi yapılmıştır.

3.3.4. Western blotlama

Çalışmada kullanılan western blot hibridizasyonu laboratuvarımızda kullanılan Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, ABD) ile yapılmıştır. Protein örneklerinin denatürasyonu için protein örnekleri kuyu başına 10-30 µg olacak biçimde 1:1 hacim oranında %5 β-merkaptoetanol ile 2x yükleme tamponu Laemmli Sample Bufferla (1610737-Bio-Rad, ABD) muamele edilmiş ve 90 °C'de 10 dk denatüre edilmiştir (Jiang ve diğerleri, 2016; Linan-Rico ve diğerleri, 2017; Maharjan, Serova ve Sabban, 2010; Tifoun ve diğerleri, 2022).

Bu aşamadan sonra proteinler 3 boyutlu yapılarını kaybedeceği için poliakrilamid jel üzerinde büyüklüklerine göre yürüme eğilimindedir. Transfer-Blot System için kullanılan hazır bis-tris jel (MiniPROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 50 µl) (4561094-Bio-Rad, ABD) sodyum-dodesil-sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için dikey elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Dikey yürütme tankı 1 × Tris/Glycine/SDS (1610732- Bio-Rad, ABD) yürütme tamponu ile doldurulmuş ve protein örnekleri ile protein marker'ı jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Çalışmalarda kullanılan marker olarak PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (26619-Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Proteinlerin yürütme işlemi 120 voltta 60 dk olarak (Mini Trans-Blot®Cell-Bio-Rad, ABD) yapılmıştır (Fedorenko ve diğerleri, 2020; Mohammad ve diğerleri, 2021; Tifoun ve diğerleri, 2022). Proteinler bu aşamadan sonra yürütüldükleri jelden polivinilidin florür (PVDF) membrana transferi için Trans-Blot Turbo RTA Mini 0,20 µm PVDF Transfer kit (1704272-Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır. Ardından Trans-Blot Turbo Transfer System (1704150-81 Bio-Rad, ABD) kullanılarak proteinlerin jelden PVDF membrana geçişi sağlanmıştır (Jiang ve diğerleri, 2016; Liu ve diğerleri, 2015; Wang ve diğerleri, 2017).

Transfer işleminden sonra bloklama aşaması gelmektedir. Polivinil florür (PVDF) membran %5'lik süt tozu ve %0,1'lik tween-20 içeren 1× Tris-buffer tuzlu su (TBS) (1706435-Bio-Rad, ABD) çözeltisinden oluşan bloklama çözeltisinde 1 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Ardından, membran 5 mL %0,1'lik tween-20 içeren 1 × TBS ile 3 kez 5'er dk

yıkanmıştır (Mohammad ve diğerleri, 2021). Hücrede protein düzeyinde ifade edilmiş proteinlerin gösterilmesi için primer antikörler 10 mL bloklama çözeltisinde dilüsyona tabi tutulmuştur. Bloklama ve yıkama işlemlerinden geçen PVDF membran hedef proteinin primer antikörüne oda sıcaklığı koşullarında 2 saat tabi tutulmuştur. Ardından, PVDF membran 5 mL %0,1'lik tween-20 içeren 1x TBS yıkama tamponuyla 3 kez 5'er dk yıkanmıştır. Primer antikorda olduğu gibi sekonder antikorda 10 mL bloklama çözeltisinde üretici talimatlarına göre seyreltilerek kullanılmıştır. PVDF membran sekonder antikörle oda sıcaklığı koşullarında 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra tekrardan 5 mL %0,1'lik tween-20 içeren 1x TBS yıkama tamponuyla 3 kez 5'er dakika aralıklarla yıkanmıştır (Coleman, Kulp ve Venditti, 2015; Gaude ve diğerleri, 2018; Mohammad ve diğerleri, 2021).

Yıkama süreçlerinin ardından PVDF membran 10 mL alkaline phosphatase (AP) Conjugate Substrate kit (1706432-Bio-Rad, ABD) boyaması kullanılarak 1 saat çalkalayıcıda muamele edilmiştir (Amanat ve diğerleri, 2018). Boyamanın ardından fazlaca boyanmış protein görüntüsünün giderilmesi için 10 mL steril distile su (dH₂O) içinde 10 dakikada 2 kez yıkanmıştır. PVDF membran üzerindeki protein bantları görüntüleme sisteminde (Gel Doc™ XR+Imaging System-Bio-Rad, ABD) görüntülenmiş ve protein bantlarının analizi image j programı aracılığıyla yapılmıştır (Takalo ve diğerleri, 2020). İncelenecek proteinlerin primer ve sekonder antikörleri Çizelge 3.8'de verilmiştir. Elde edilen sonuçların normalizasyonu için GAPDH kullanılacaktır (Tian ve diğerleri, 2021).

Çizelge 3.8. Çalışmada kullanılacak primer ve sekonder antikörler. Antikörlerin tamamı tavsan orijinli olup İnsan, Mouse ve Rat çalışmaları için uygun poliklonal antikörlerdir

Antikör adı	Katalog numarası	Molekül ağırlığı (kDa)	Üretici firma
GAPDH poliklonal primer antikör	10494-1-AP	36	Proteintech
IL-4 poliklonal primer antikör	AF5142	30	Affinity
TGF- β 1 poliklonal antikör	E-AB-33090	44	Elabscience
IL-10 poliklonal primer antikör	FNab04211	21	Finetest
IL-6 poliklonal primer antikör	NB600-1131	24	Novusbio
Goat anti-rabbit IgG (H+L) poliklonal sekonder antikör	S0003	-	Affinity

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonuçları SPSS 27.0 programı aracılığıyla istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Uygulama grupları ile referans grup arasındaki farklar ve verilerin anlamlılık düzeyleri

($p<0,05$) t testi ile belirlenmiştir. MTT testinde elde edilen hücre canlılığı ortalamaları arasındaki farklar Multivariate Anova Post Hoc Tukey HSD ($p<0,05$) ile belirlenmiştir. İn-vitro yara analizi çalışmasında uygulama grupları kontrol grubuna kıyasla yara kapanması arasındaki farklar Multivariate Anova Dunnett ($p<0,05$) ile tespit edilmiştir. qRT-PCR ve western blotlama analizlerinde elde edilen ortalama ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar tek yönlü Anova Post Hoc Tukey HSD ($p<0,05$) ile belirlenmiştir. Ayrıyeten çalışmalarda uygulam gruplarının korelasyon değerleri (r değeri) bivariate korelasyon hesabıyla yapılmıştır. Tüm analizler 3 kere tekrarlanmış ve çalışma örneklemeleri ($n=x$) verilmiştir.



4. BULGULAR

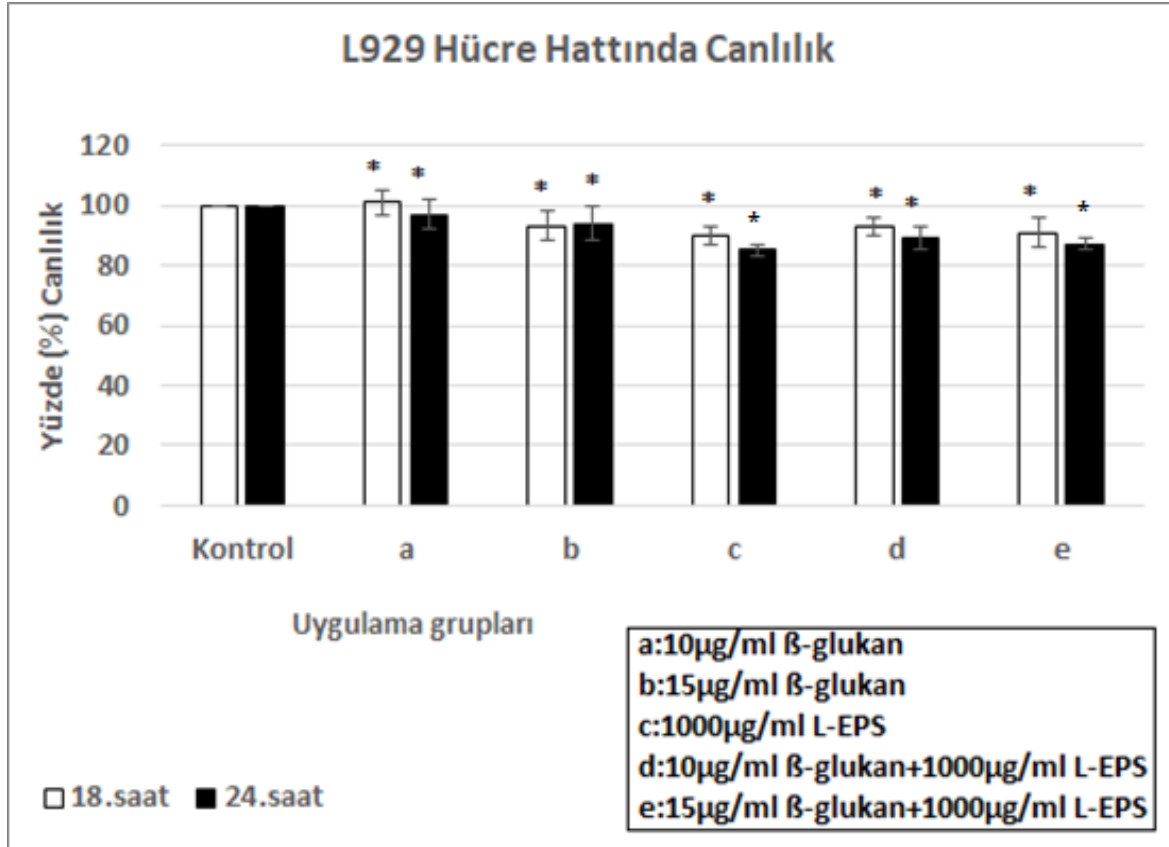
4.1. *Lactopantibacillus plantarum* GD2 Suşunun L-EPS Mikarı

Çalışmada kullanılan *L.plantarum* GD2 suşundan üretilen ardından liyofilize hale getirilmiştir. Prof. Dr Belma ASLİM'in danışmanlığında yapılan bir tez çalışmasında bu L-EPS'nin ölçümleri fenol sülfürik asit metoduyla yapılmış olup L-EPS miktarının $398 \pm 4,4$ mg/L olduğu tespit edilmiştir (Demir, 2022).

4.2. Uygulama Gruplarının Sitotoksosite Sonuçları

Çalışma kapsamında başlangıç olarak etken maddelerin L929 ve RAW264.7 hücre hatlarındaki canlılığa etkisi yüzde (%) olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak her iki hücre hattında da yalnızca DMEM uygulanmış gruplar seçilmiştir. Bu çalışmada uygulama gruplarının sitotoksik olmayan konsantrasyon ve sürelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Değerlendirilen sonuçların sitotoksosite değerleri ISO 10993-5 standartlarına göre belirlenmiştir. Bu durumda hücre canlılığının %70'in altına düşmesi uygulamanın sitotoksik potansiyeli olduğunu göstergesidir (ISO, 2009).

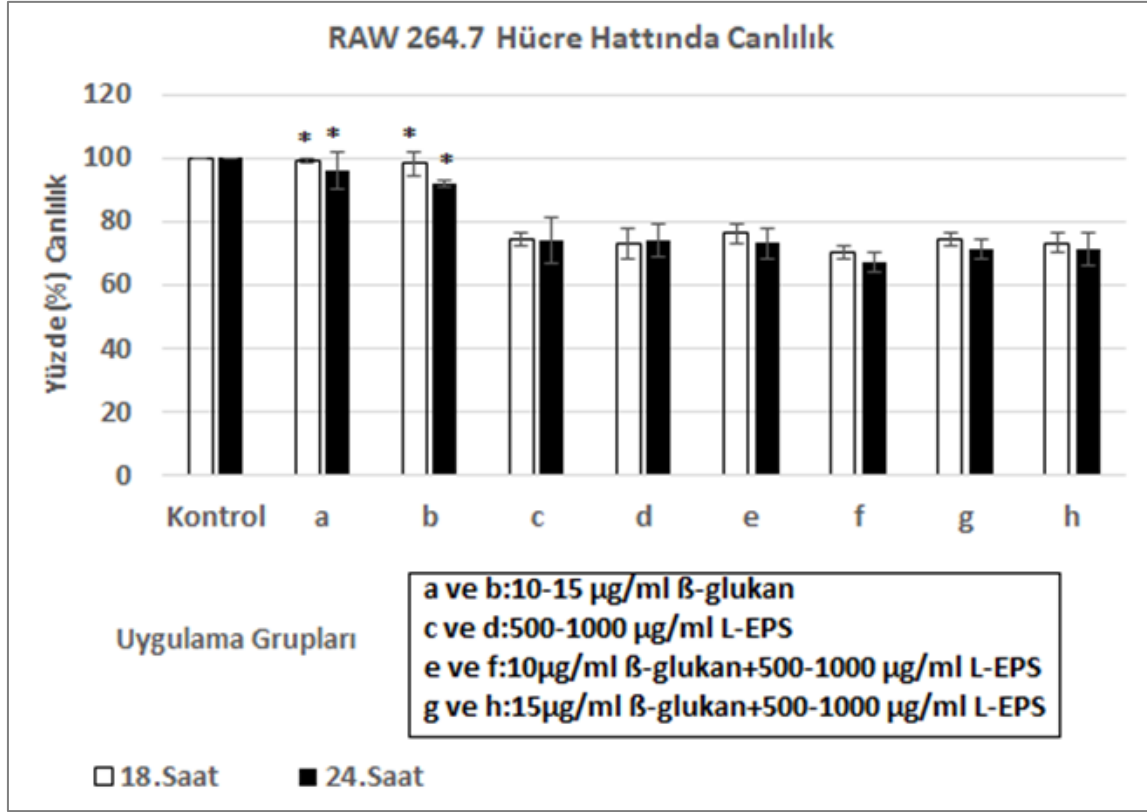
Fibroblast hücreleriyle yapılan çalışmalarda uygulama gruplarından alınan sonuçlar Şekil 4.1'de verilmiştir. Alınan sonuçlar ışığında β -glukan ($10-15 \mu\text{g/ml}$), L-EPS ($1000 \mu\text{g/ml}$) ve iki biyopolimerin kombinasyonları herhangi bir sitotoksosite sergilememiştir. Uygulama gruplarının neredeyse tamamından alınan sonuçlar %70'in üzerinde olduğu için ve alınan sonuçlar bu minvalde anlamlı olduğu için $*(p<0,05)$ kullanılan biyopolimerler güvenli kabul edilir (ISO, 2009). Buna göre uygulanan doz ve sürelerin L929 fibroblast hücreleri için toksik olmadığı ve bu hücrelerde kullanılan biyopolimerlerin güvenli kullanımının mümkün olacağı söylenebilir. En etkili sonuçlar $10\mu\text{g/ml}$ β -glukan uygulamasının 18 ve 24 saatlik uygulamalarında alınmıştır. Uygulama grupları herhangi bir sitotoksosite göstermediğinden ve sonuçlar birbirine yakın olduğundan in-vitro yara analizlerinde en etkili uygulamanın belirlenmesi için tüm uygulamalar tekrardan test edilmiştir.



Şekil 4.1. L929 hücre hattında yüzde canlılık. Yapılan analizde n=5'tir ve Yüzde (%) Canlılık $\pm$ standart sapma (SS) hata çubuklarıyla verilmiştir *($p < 0,05$)

Uygulama gruplarının RAW264.7 hücre hattında sitotoksitesinin belirlenmesi için iki farklı deney modeli kurgulanmıştır. İlk modelde uygulama grupları direkt hücrelere uygulanmış herhangi bir inflamasyon aktivasyonu yapılmamıştır. İkinci modelde ise hücreler uygulama gruplarıyla muamele edilmeden önce LPS (1µg/ml) ile aktive edilmiştir.

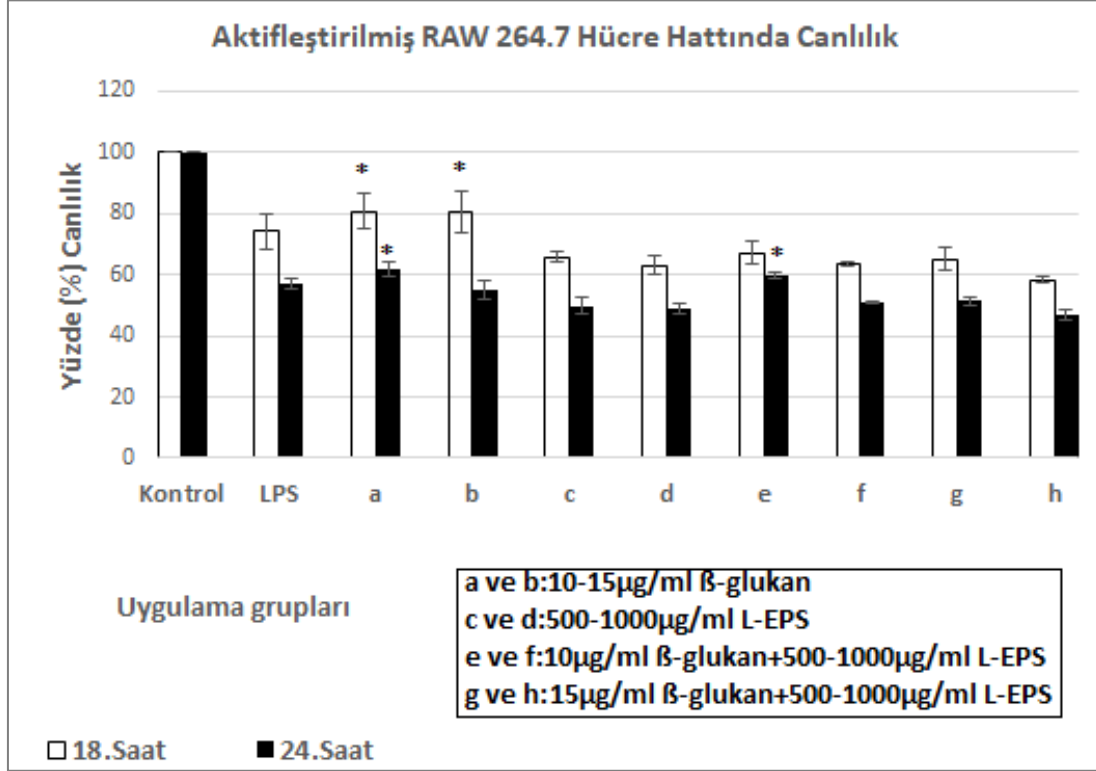
RAW264.7 hücre hattında yapılan ilk deney modelinde, LPS indüklemesi olmadan uygulama grupları çalışılmıştır ve alınan sonuçlar Şekil 4.2'de verilmiştir. Bu deney modelindeki sonuçlar göz önüne alındığında uygulama gruplarında artan EPS konsantrasyonları ($r = -0,86$) hücre canlılığını olumsuz etkilemektedir. Hücre canlılığının korunduğu en etkili sonuçlar sadece β-glukan (10-15µg/ml) uygulamalarının olduğu sonuçlardır ve sonuçlar istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlıdır. L-EPS uygulamasının dahil olduğu deney grupları herhangi bir sitotoksikite göstermese de sitotoksik olma potansiyeli sınırına yakındır (ISO, 2009).



Şekil 4.2. RAW264.7 hücre hattında LPS etkisi olmadan yüzde canlılık. Yapılan analizde n=5'tir ve Yüzde (%) Canlılık ± standart sapma (SS) hata çubuklarıyla verilmiştir *(p<0,05)

İkinci deney modeli pro-inflamatuar etkinin çalışılacağı model olduğu için uygulama gruplarının LPS (1µg/ml) indüklemesi ile inflammatuar fenotip aktif hale getirilmiştir. Hücreler aktiveleştirildikten sonra uygulama gruplarının çeşitli doz ve süreleri hücre canlılığına etkisine bakılmıştır. Yapılan çalışmanın sonuçları Şekil 4.3'te verilmiştir. En etkili sonuçlar 18.saatte 10µg/ml ve 15µg/ml β-glukan uygulamalarından;24.saatte ise tek başına 10µg/ml β-glukan uygulaması ve onun 500 µg/ml L-EPS kombinasyonundan alınmıştır. Yapılan çalışmalar β-glukan uygulamasının LPS'nin toksik etkisini giderdiğini ve hücre canlılığını arttırdığını ortaya koymaktadır ve bu bağlamda alınan sonuç (p<0,05) anlamlıdır. Buna rağmen 24.saatte β-glukan uygulamaları hücre canlılığı üzerinde toksik potansiyele sahiptir ama bu LPS indüklenmesinden kaynaklanmaktadır. Uygulamalara belirtilen konsantrasyonlarda (500-1000µg/ml) L-EPS'nin dahil olmasıyla hücre canlılıklarının ciddi anlamda düştüğü ve sitotoksik etkinin çok yüksek seviyelere kadar vardığı görülmektedir. Uygulamalarda bulunan L-EPS'nin artan konsantrasyonu (r=-0,66) ve muamele süreleri (r=-0,45) hücre canlılığını olumsuz etkilemektedir. Tüm sitotoksikite analizleri göz önüne alındığında özellikle çalıştığımız konsantrasyonlardaki L-EPS

konsantrasyonlarının RAW-264.7 makrofaj hücreleri için güvenli olmadığı ve sitotoksik potansiyelinin olduğunu göstermektedir.

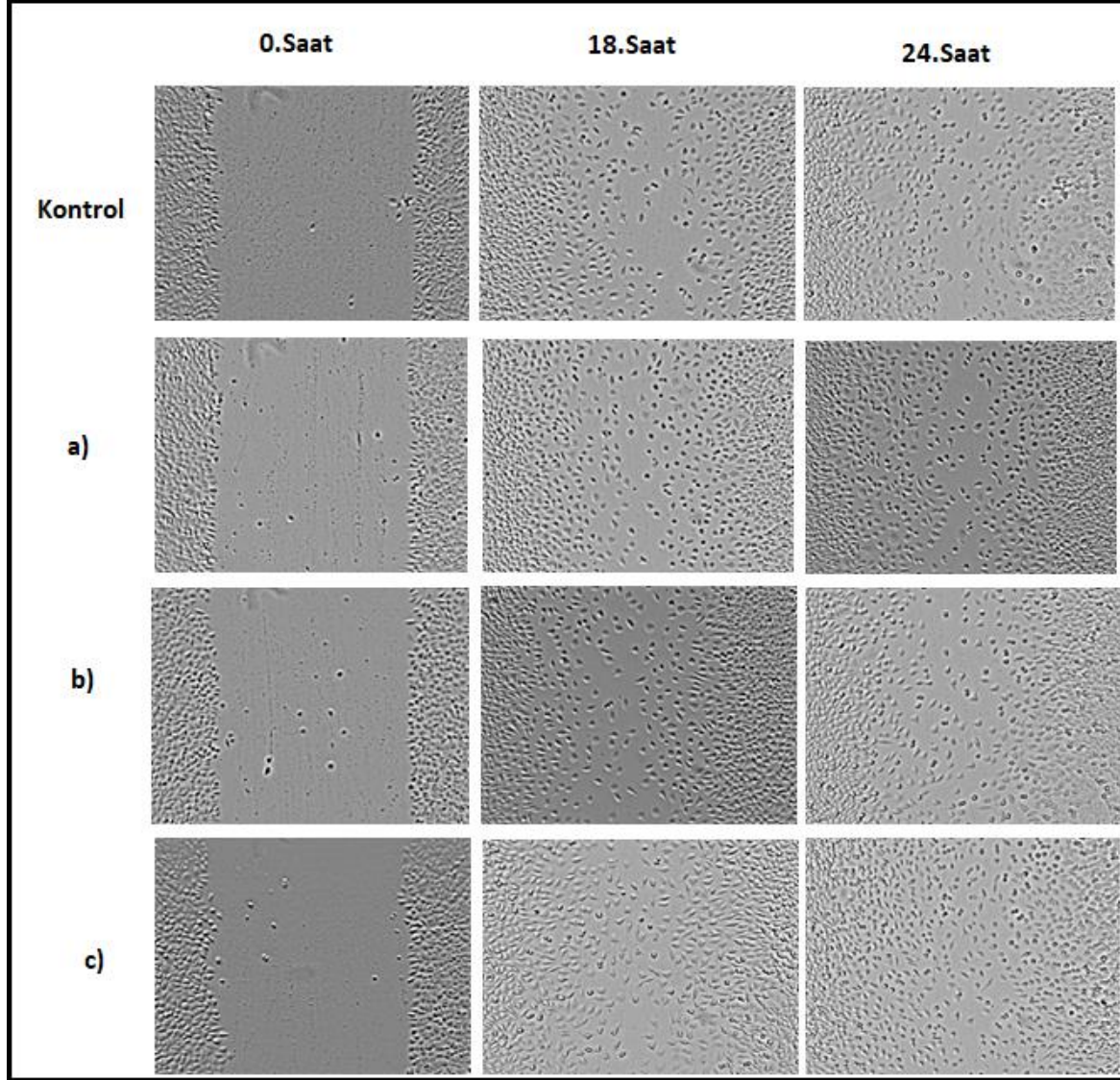


Şekil 4.3. RAW264.7 hücre hattında LPS etkisinde yüzde canlılık. Yapılan analizde n=5'tir ve Yüzde (%) Canlılık $\pm$ standart sapma (SS) hata çubuklarıyla verilmiştir *(p<0,05)

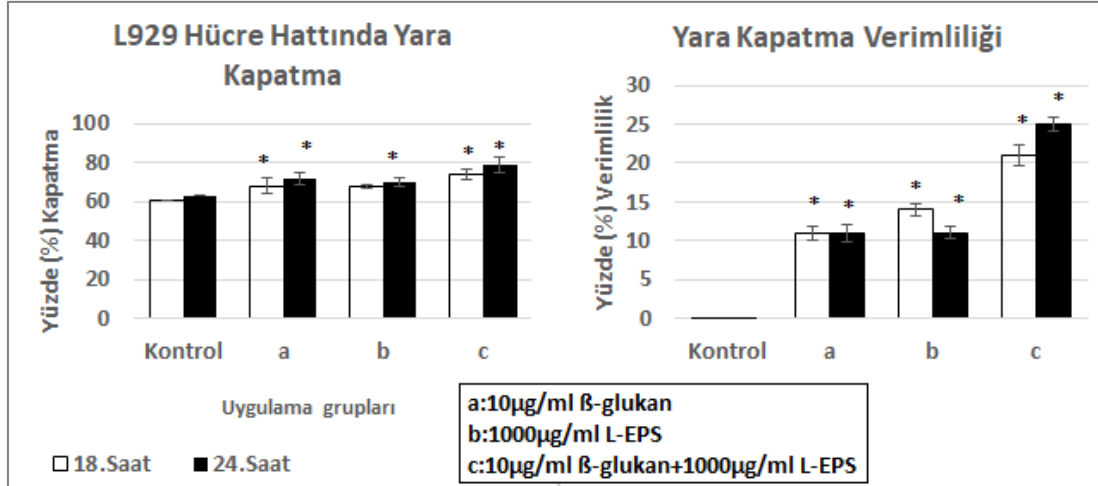
4.3. Uygulama Gruplarının L929 Hücre Hattında İn-Vitro Yara Modeli Kapatma Sonuçları

Yara iyileşmesi süreçlerinde, inflamasyon ve doku yenilenmesinde görev alacak hedef hücrelerin görev yerine zamanında gelmesi sağlıklı bir yara iyileşmesi için önemli bir faktördür. Hedef hücrelere bu doğrultuda sinyal gönderen kemokinler hücre göçünü uyarmaktadır. Kurgulanan deney modelinde amaç, kullanılan biyopolimerlerin kemokinlere yardımcı olabilme potansiyelini hücre göçü aracılığıyla ölçmektir. MTT sonuçlarına göre seçilen β-glukan uygulaması iki farklı deneyle uygulanmıştır. Birinci deneyde 10 µg/ml β-glukan+1000 µg/ml EPS kombinasyonu; ikinci deneyde ise 15 µg/ml β-glukan+1000 µg/ml EPS kombinasyonu çalışılmıştır. Alınan sonuçların yara kapatma görüntüleri Resim 4.1 (10 µg/ml β-glukan) ve Resim 4.2'de (15 µg/ml β-glukan), deneylerin istatistik analizleri ise

sırasıyla Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir. Birinci deneyde tüm uygulama grupları yara kapatmada olumlu etki ($r=0,86$) sağlamıştır.

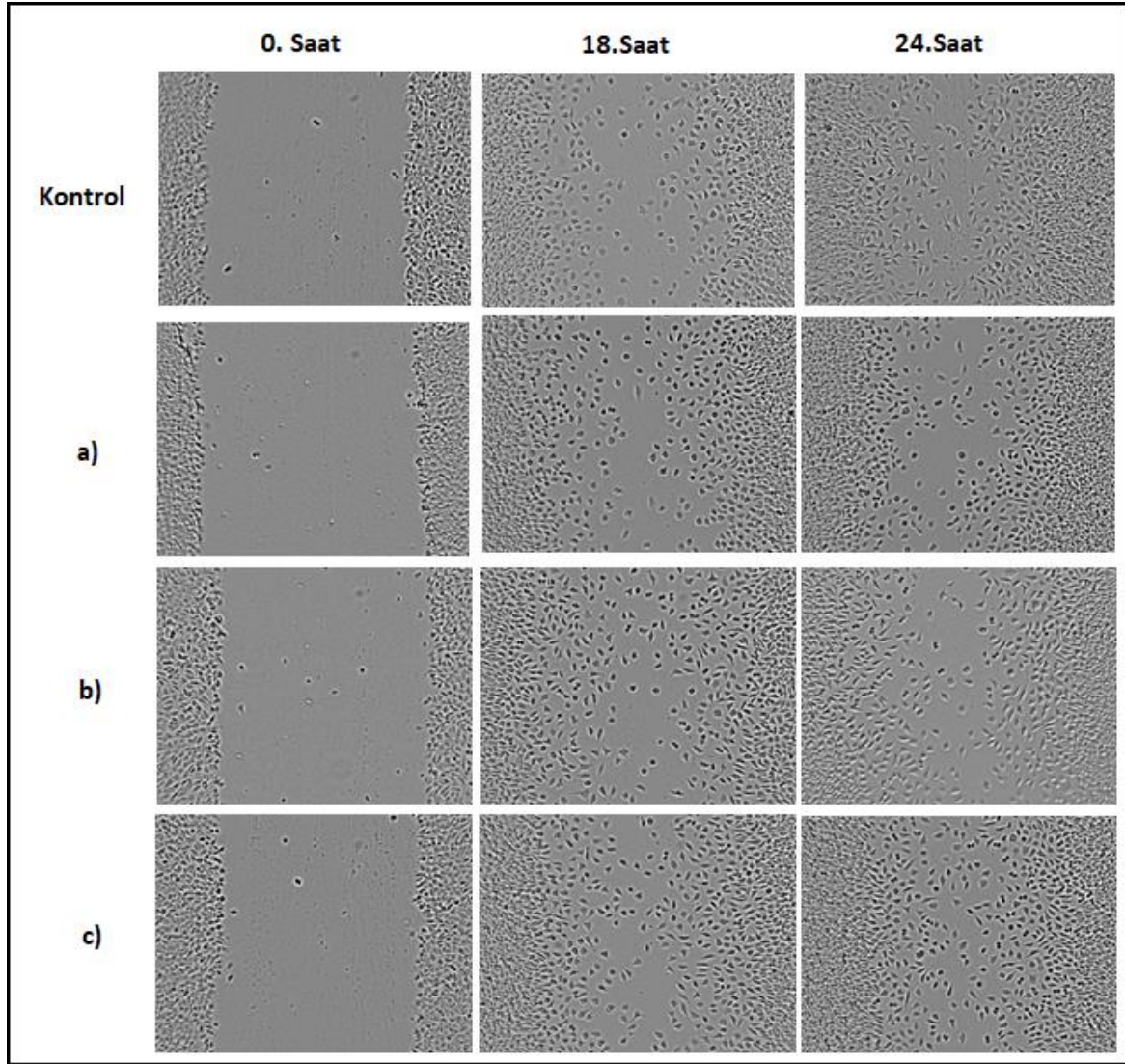


Resim 4.1. İn-vitro yara modeli kapatma görüntüleri. Kontrol: DMEM içeren kontrol grubu, a) 10µg/ml β-glukan konsantrasyonu b) 1000µg/ml EPS konsantrasyonu ve c) 10µg/ml β-glukan+1000µg/ml EPS konsantrasyonu



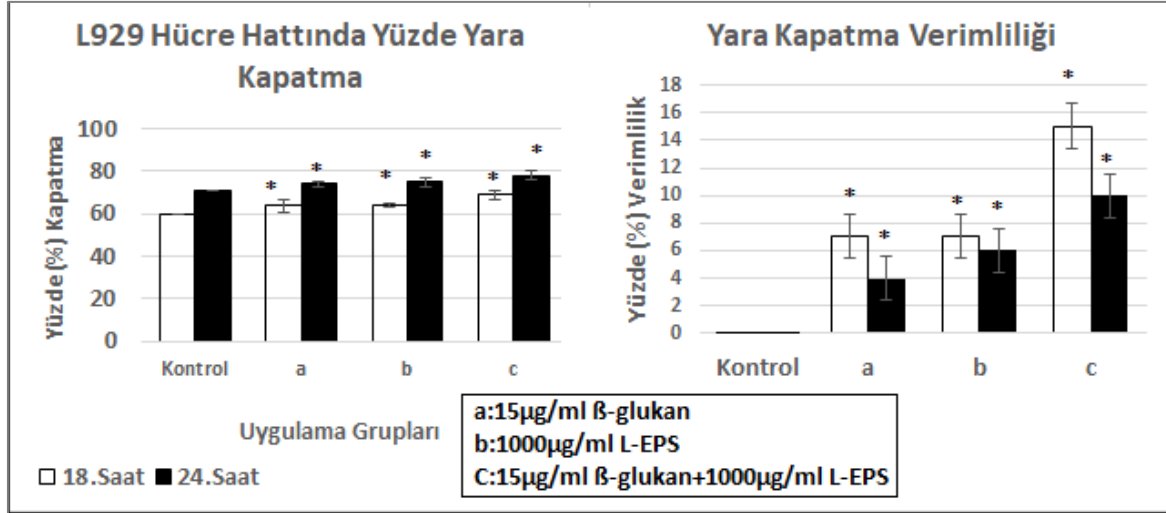
Şekil 4.4. L929 hücre hattında yara kapatmasının analizleri. Kapatmalar yüzde (%) kapatma $\pm$ SS hata çubuklarıyla verilmiştir ve n=8'dir *(p<0,05)

Birinci deney modeli kapsamında aldığımız sonuçlara göre 10µg/ml β-glukan, 1000µg/ml L-EPS ve 10µg/ml β-glukan+1000µg/ml L-EPS kombinasyonları olumlu sonuçlar vermiştir ve alınan tüm sonuçlar bu doğrultuda (p<0,05) anlamlıdır. Tüm uygulama gruplarının kontrole kıyasla yara kapma oranları % 68-79 ve yara kapatma verimliliği % 11-25 arasında değişmektedir. Aldığımız en etkili sonuç hem 18.saatler hem de 24. saatler için 10µg/ml β-glukan+1000µg/ml EPS kombinasyonu uygulamasında gözlemlenmiştir



Resim 4.2. İn-vitro yara modelinde yara kapatma görüntüleri. Kontrol: DMEM içeren kontrol grubu, a) 15µg/ml β-glukan konsantrasyonu b) 1000µg/ml EPS konsantrasyonu ve c) 15µg/ml β-glukan+1000µg/ml EPS konsantrasyonu

Yapılan ikinci deneyde alınan sonuçlar değerlendirildiğinde benzer sonuçlar bu deney içinde geçerlidir. Yapılan çalışmada kullanılan tüm uygulama grupları yara kapatmada ilk deneydeki kadar olmasa da olumlu etki ($r=0,47$) sağlamıştır. İkinci deney modeli kapsamında aldığımız sonuçlara göre 15µg/ml β-glukan, 1000µg/ml L-EPS ve 15µg/ml β-glukan+1000µg/ml L-EPS kombinasyonları olumlu sonuçlar vermiştir ve alınan tüm sonuçlar bu doğrultuda ($p<0,05$) anlamlıdır. En etkili sonuçlar yine kombinasyon grubu uygulamasında 15µg/ml β-glukan+1000µg/ml EPS uygulama grubuyla alınmıştır. Alınan sonuçlar kapsamında kontrole kıyasla uygulama gruplarının yara kapatmaları % 68-74 ve verimlilikleri % 4-15 aralığındadır.

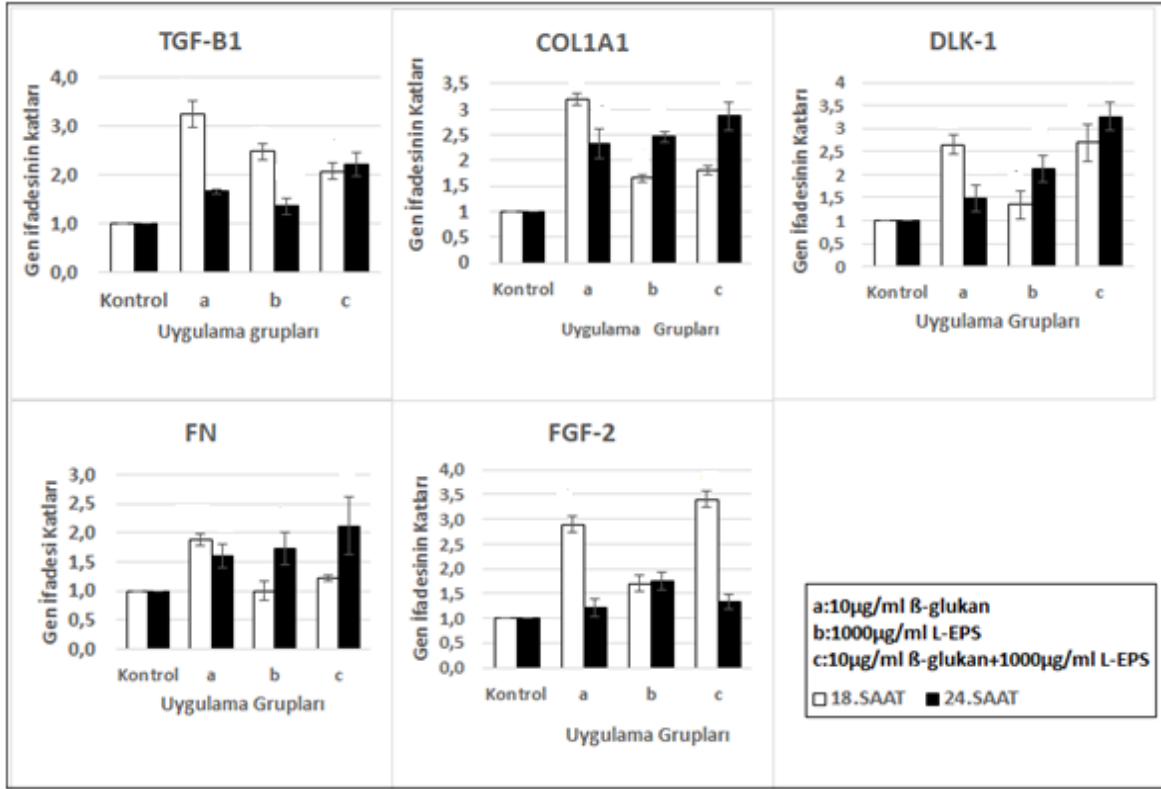


Şekil 4.5. L929 hücre hattında yara kapatmasının analizleri. Kapatmalar yüzde (%) kapatma $\pm$ SS hata çubuklarıyla verilmiştir ve n=8'dir *(p<0,05)

Her iki çalışma kıyaslandığında 10µg/ml β-glukan grubu ve kombinasyonları hem 18 hem 24.saatlerde etkinliğini korumaktadır. 15µg/ml β-glukan grubu ve kombinasyonları 24.saatte yine iyi sonuçlar alınsa da 18. Saate göre azalan hücre göçü sergilemiştir. 10µg/ml β-glukan grubu ve kombinasyonları hem 18 hem 24.saatte hücre göçü etkinliğini artırarak koruduğu için sonraki ekspresyon çalışmaları için seçilmiştir.

4.4. Uygulama Gruplarının L929 Hücre Hattında Genlerin Gen İfadesi Sonuçları

Çalışılan uygulama gruplarının L929 hücre hattındaki gen ifadesine etkisi belirlenmiştir. Uygulama gruplarının gen ifadesine etkisi L929 hücrelerinde dönüştürücü büyüme faktörü (TGF-β1), kollajen (COL1A1), fibronektin (FN), fibroblast büyüme faktörü (FGF-2) ve Delta benzeri homolog-1 (DLK1) genleri aracılığıyla belirlenmiştir. COL1A1, FN ve TGF-β1 genleri aracılığıyla uygulama gruplarının ECM oluşumu üzerindeki etkisini gözlemlemek amaçlanmıştır. DLK1 ve FGF-2 genleri aracılığıyla uygulama gruplarının proliferasyonun uyarılması ve doku tabakalaşmasının tetiklenmesindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Alınan sonuçlar Şekil 4.6'da verilmiştir.



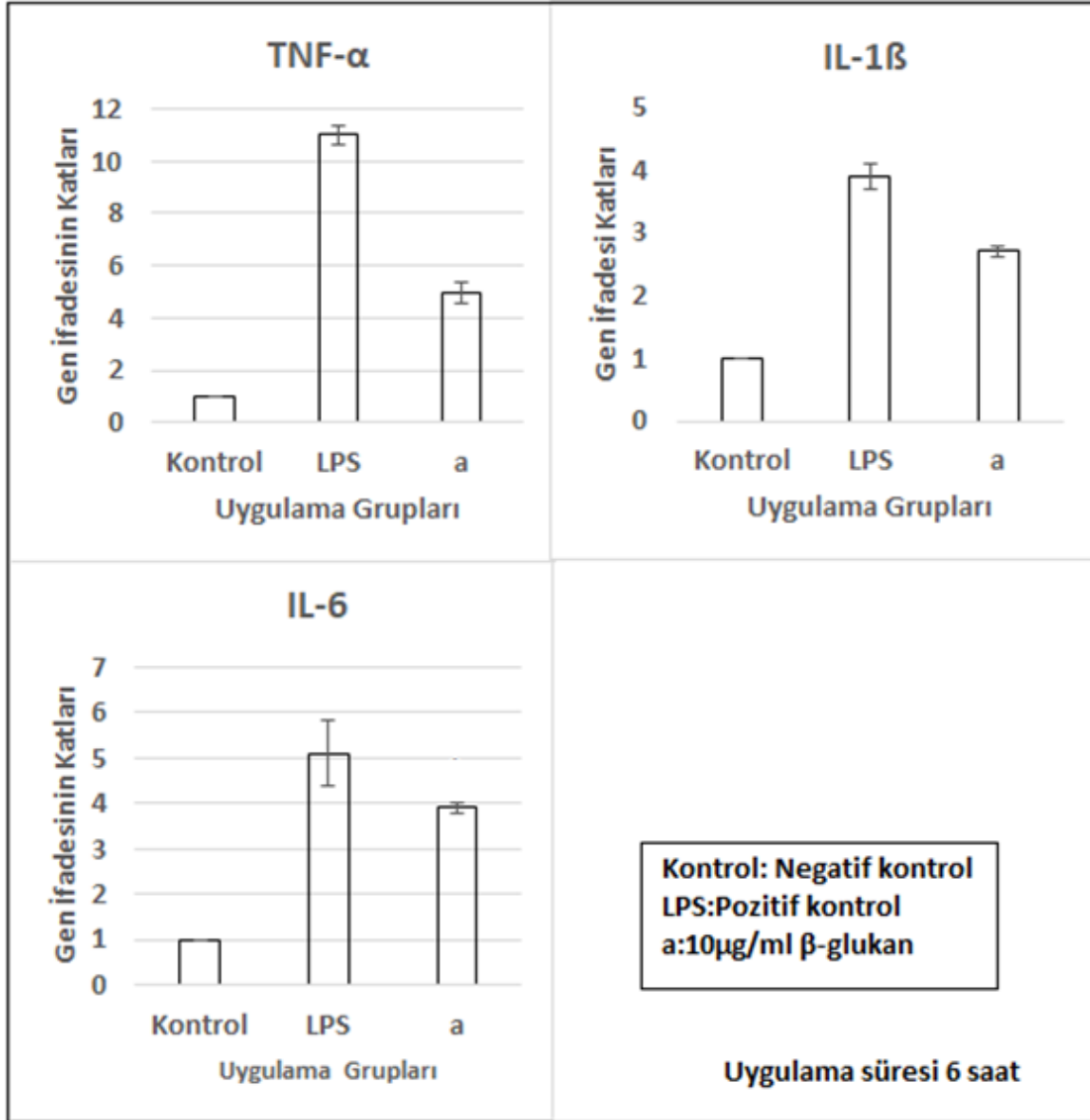
Şekil 4.6. L929 hücre hattında uygulamaların etkisinde gen ifadeleri. Gen ifadesinin katları $\pm$ SS hata çubuklarıyla verilmiştir ve n=3'tür *(p<0,05)

β -glukan, L-EPS ve iki biyopolimerin kombinasyonlarının TGF- β 1, COL1A1, FN, FGF-2 ve DLK1 gen ifadelerinde etkili olduğu ancak bu etkinin uygulama grupları ve inkübasyon sürelerine göre farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Çalışılan tüm genlerde tek başına β -glukan ve β -glukan/L-EPS kombinasyonu öne çıkmıştır. Alınan en etkili sonuçlar 18.saate 10 μ g/ml β -glukan grubunda TGF- β 1 (3,2 kat), COL1A1 (3,2 kat), FN (1,9 kat) ve DLK1 (2,7 kat) genlerinde gözlemlenmiştir. 24 saatlik inkübasyonlarda ise alınan en etkili sonuçlar β -glukan/L-EPS kombinasyonu grubunda TGF- β 1 (2,2 kat), COL1A1 (2,9 kat), FN (2,1 kat) ve DLK1 (3,3 kat) genlerinde gözlemlenmiştir. Özellikle 18 saatlik inkübasyonlardan alınan sonuçlar incelendiğinde FGF-2 ve DLK1 genlerinde kombinasyon grubunun etkinliği yüksek oranda β -glukandan kaynaklanmaktadır. Bu sonuçlar bağlamında β -glukan/L-EPS kombinasyonu yarada TGF yolağı ve notch sinyal yolağı aracılığıyla ECM oluşumu, proliferasyon ve doku farklılaşması süreçlerine olumlu etki edebileceği düşünülmektedir.

4.5. Uygulama Gruplarının RAW264.7 Hücre Hattında Gen İfadesi Sonuçları

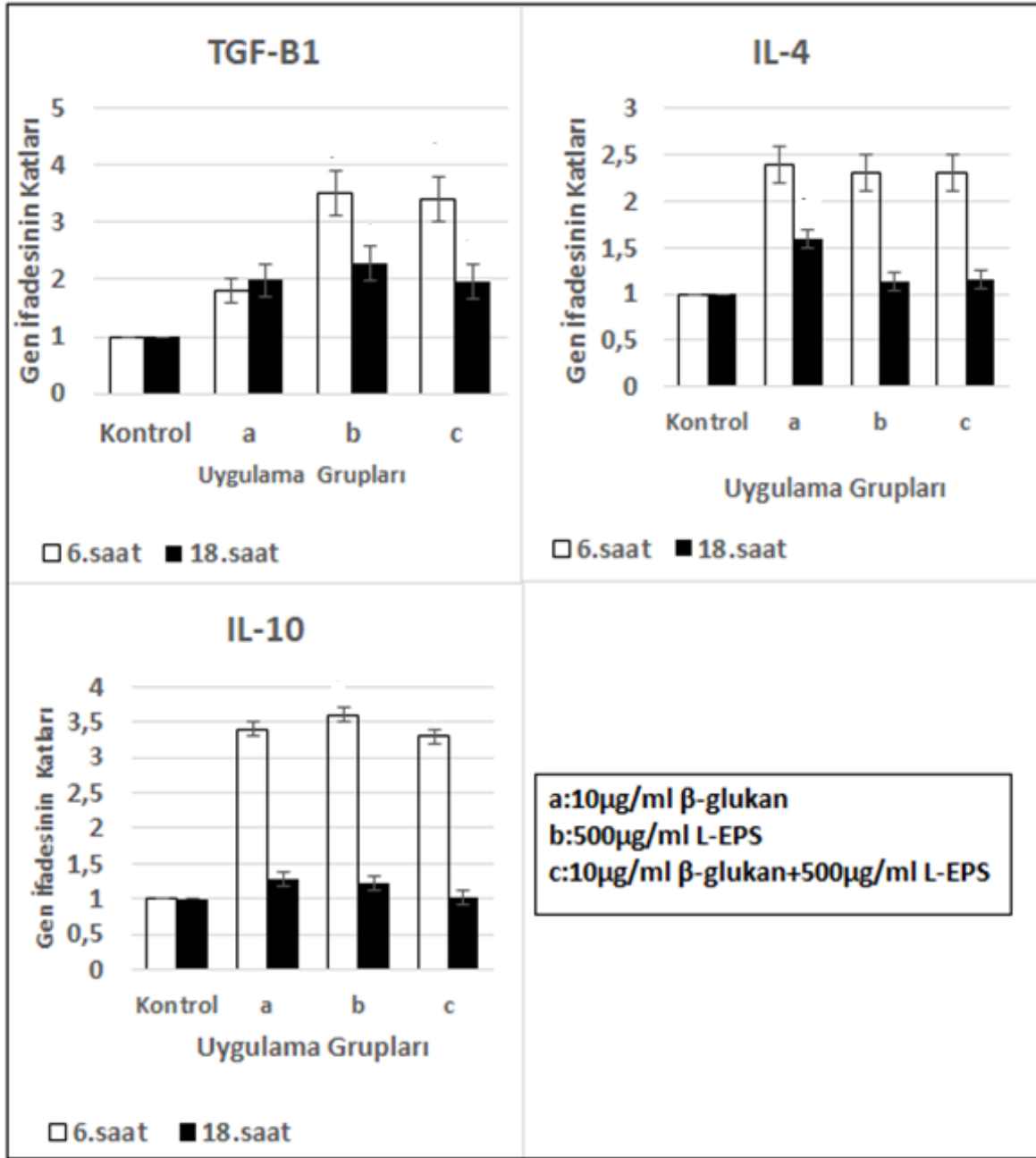
Çalışmanın amacı uygulama gruplarının pro-inflamatuar sitokinlere ve anti-inflamatuar sitokinlere gen düzeyinde etkisini ortaya çıkarmaktır. Yapılan ilk deneylerde uygulama gruplarının pro-inflamatuar sitokinler üzerindeki etkisine bakılmıştır. Bu sitokinler yarada inflammatuar cevabı üretilip bağışıklık hücrelerini harekete geçiren sitokinlerdir. İlk deneyler için seçilen EPS uygulaması L929 hücre hattında olumlu sonuç gözlemlense bile RAW264.7 hücre hattında olumsuz sonuçlar vermiştir. Ayrıca pro-inflamatuar genlerle yapılan çalışmalarda uygulama gruplarının 18 saatlik inkübasyonları anlamsız sonuçlar verdiğinden inkübasyon süresi 6 saate düşürülmüştür. Ön denemelerde alınan sonuçlarda 1000µg/ml EPS grubu pro-inflamatuar fenotipe bir inhibisyon göstermediği için L-EPS miktarı 500µg/ml'ye düşürülmüştür. 500µg/ml EPS grubu pro-inflamatuar sitokinler kapsamında istenilen inhibisyonu yine de sağlamamıştır.

En etkili sonuçlar 6.saatte 10µg/ml β-glukan grubunda TNF-α (2,2 kat düşüş), IL-1β (1,4 kat düşüş) ve IL-6 (1,3 kat düşüş) gen ifadelerinde gözlemlenmiştir. Bu minvalde pro-inflamatuar fenotipe alınan sonuçlar β-glukanın inflamasyonu baskılayarak hücre canlılığını arttırdığını (bkz. Şekil 4.3) mtt analizlerinde göstermektedir. Çalışılan L-EPS ve kombinasyonda anlamlı sonuçlar alınamadığı gibi uygulamalar inflammatuar etkiyi arttırmıştır. Bu durum uygulama grubundaki L-EPS varlığından kaynaklanmaktadır. Ayrıca alınan sonuçlar anlamlı olmadığı için aşağıda verilmemiştir. Deney kapsamında alınan sonuçlar Şekil 4.7'de verilmiştir. L-EPS uygulamasının dahil olduğu deney gruplarından elde edilen pro-inflamatuar gen ifadesi sonuçları, MTT analizlerinde sitotoksitenin (bkz. Şekil 4.3) aşırı inflamasyon kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.7. RAW264.7 hücre hattında uygulamaların etkisinde pro-inflamatuar (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) gen ifadeleri. Gen ifadesinin katları $\pm$ SS hata çubuklarıyla verilmiştir n=3

Pro-inflamatuar fenotipin baskılanması hem inflammatuar fazın acısının hafiflemesi hem de yaranın inflamasyon fazından çıkması için önemlidir. Alınan gen ifadesi sonuçları kapsamında 10 μ g/ml β -glukan uygulama grubu pro-inflamatuar fenotipi baskılama anlamında etkili olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.8. RAW264.7 hücre hattında uygulamaların etkisinde anti-inflamatuar gen ifadeleri. Gen ifadesi katlarının ortalaması $\pm$ SS hata çubuklarıyla verilmiştir. n=3'tür

Yarada üretilen anti-inflamatuar sitokinler inflamatuvar fazın sönümlenmesine yol açarak iyileşme süreçlerini başlatır. İkinci deney modelinde LPS indüklemesi olmadan, uygulama gruplarının anti-inflamatuar fenotipe etkisini gözlemlemek için anti-inflamatuar gen ifadeleri incelenmiştir. Bu deney kapsamında istenilen olumlu sonuç, yara iyileşmesinin rejeneratif süreçlerini tetikleyici ve inflamatuvar fazı baskılayıcı genlerin gen ifadelerinde artış olmasıdır. Uygulama grupları önce 18 saatlik uygulamalarla yapılmış ve istenilen sonular TGF- β (tüm uygulamalar) ve IL-4'ün (β -glukan grubu) gen ifadeleri dışında

alınamamıştır. Yapılan sonraki çalışmalarda deney grupları pro-inflamatuar çalışmalarda iyi sonuçlar veren 6 saatlik inkübasyon süresiyle yapılmıştır. Deney sonuçları Şekil 4.8'de verilmiştir.

Bu sonuçlar kapsamında anti-inflamatuar tüm genlerde uygulama grupları oldukça etkili sonuçlar vermiştir ve sonuçlar bu doğrultuda ($p < 0,05$) anlamlıdır. En etkili sonuçlar IL-4 ve IL10 genlerinde tüm uygulama gruplarından alınırken; TGF- β 1 geninde EPS ve kombinasyon gruplarında etkili sonuçlar alınmıştır. Alınan sonuçlar göz önüne alındığında 6.saatte TGF- β 1 geni için uygulamalar ile gen ifadesi artışı arasında doğrudan ($r=0,77$) ilişki vardır. Uygulama gruplarının artan inkübasyon süreleri gen ifadesindeki artışı az da olsa ($r=-0,34$) olumsuz etkilemektedir. Uygulama grupları IL-4 ve IL10 genlerinde 6.saatteki gen ifadesi artışlarıyla doğrudan ilişkiliyken (r ortalama 0,7) artan inkübasyon süreleri gen ifadesindeki artışı olumsuz (r ortalama -0,75) etkilemektedir.

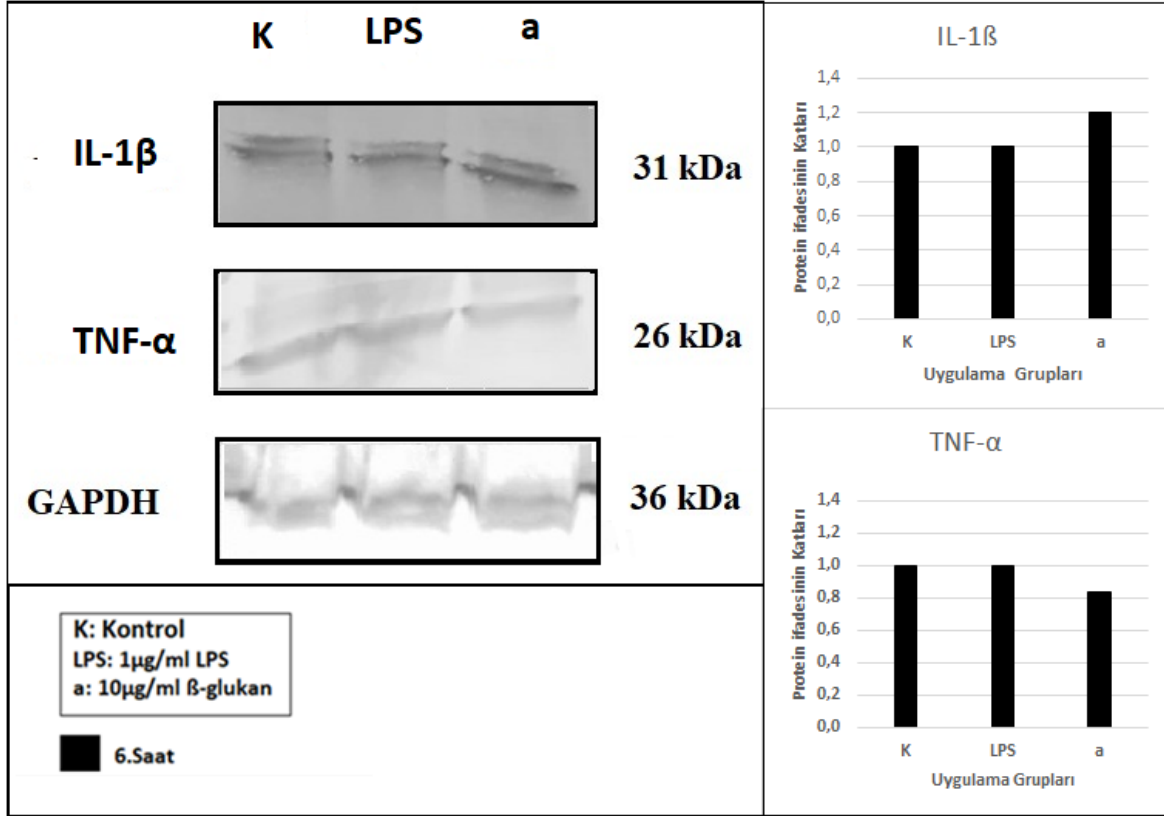
Bu sonuçlar doğrultusunda uygulama gruplarının yara iyileşmesinde inflammatuar fazı bitirmede -özellikle TGF- β 1 ve IL-10 genlerindeki yukarı yöndeki regülasyon sayesinde etkili olacağı düşünülmektedir. Ayrıca hem fibroblastlarda hem de makrofajlarda TGF- β 1 rejeneratif süreçleri başlatmada önemli sitokinlerdir. Ancak uygulamaların inkübasyon süresi arttıkça etkinliği de azalmaktadır.

4.6. Uygulama Gruplarının RAW264.7 Hücre Hattında Protein İfadesinin Sonuçları

Gen analizlerinde alınan pozitif sonuçların sınanması için ayrıca inflammatuar genler protein düzeyinde çalışılmıştır. Alınan gen ifadesindeki artışların protein düzeyine ne kadar yansıdığının gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalar kapsamında sonuç alınamayan proteinlerin analizi yapılamamıştır.

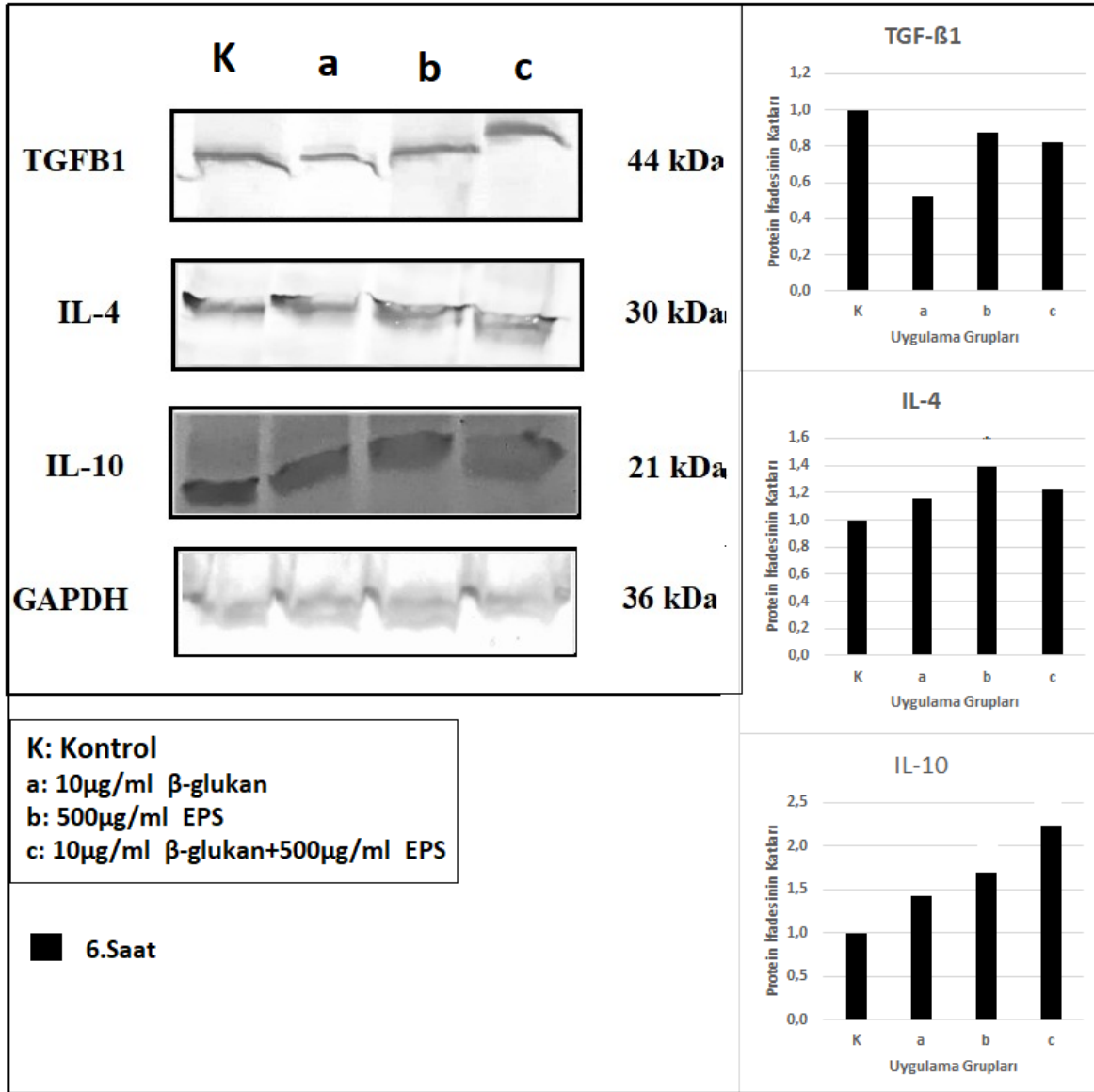
Pro-inflamatuar sitokinlerin çalışıldığı uygulamada yalnızca 10 μ g/ml β -glukan grubu 6 saatlik inkübasyonla çalışılmıştır. Deneyde alınan sonuçların membran görüntüsü ve sonuç grafikleri şekil 4.9'da beraberce verilmiştir. Bu sonuçlar kapsamında IL-6 herhangi bir sonuç vermemiştir. Bu durumun antikordan kaynaklandığı düşünülmektedir. Zaman ve kaynak sınırlılıklarından dolayı IL-6 antikoru için tekrar çalışması yapılamamıştır. Ayrıca deney genelinde LPS grubu kontrol grubuyla aynı ifade düzeyinde için bir inflamasyon modelinin protein ifadesi düzeyinde oluşturulabildiğinden söz edilemeyebilir. Yine de TNF- α

sitokininde gen ifadesinde gözlemlenen inhibisyon protein ifadesinde de gözlemlenmiştir. Bu durum 10µg/ml β-glukan uygulama grubunun aşırı inflamatuvar etkiyi baskılayabileceğini düşündürmektedir.



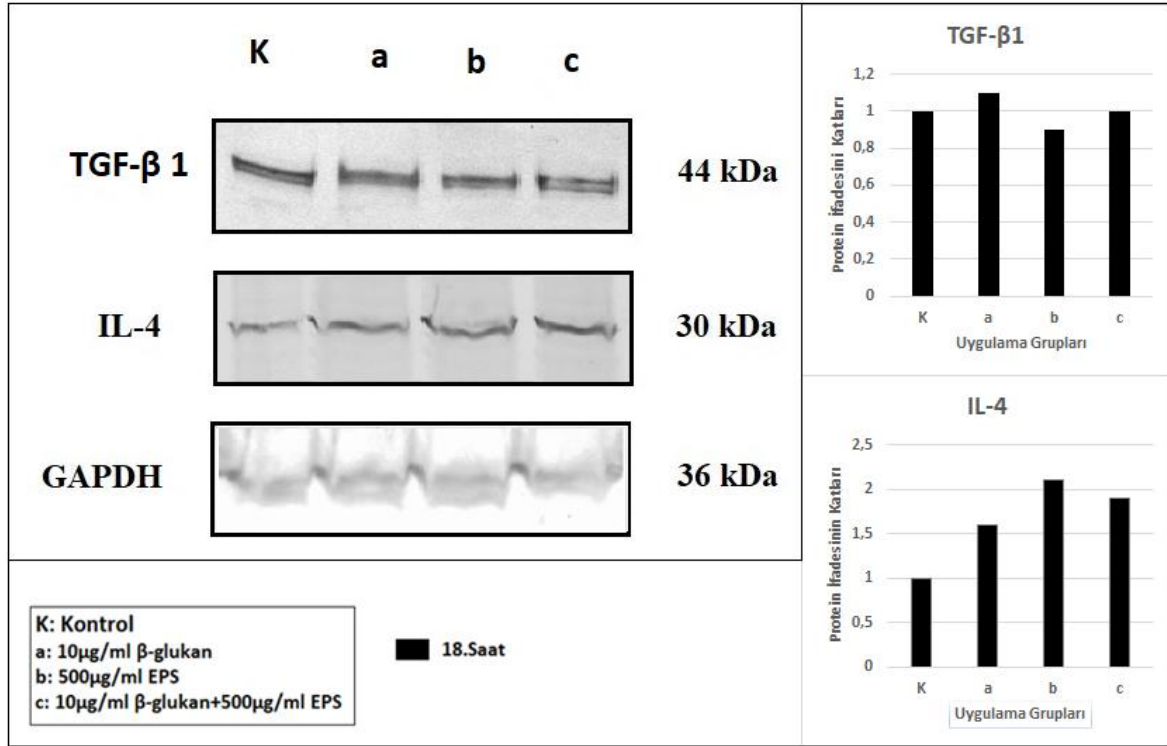
Şekil 4.9. Pro-inflamatuvar sitokinlerde western blot sonuçları

Yapılan sonraki deneylerde anti-inflamatuvar sitokinlerde 6 saatlik ve 18 saatlik inkübasyonlarda uygulama gruplarının protein ifadesine etkisi bakılmıştır. Burada amaç gen ifadesinde aldığımız olumlu sonuçların protein düzeyinde gözlemlenip gözlemlenmediğini tayin etmektir. Uygulama gruplarının 6 saatlik inkübasyonu sonucunda alınan sonuçlar membran görüntüleriyle beraber Şekil 4.10'da verilmiştir. Bu sonuçlar kapsamında uygulama gruplarının 6 saatlik inkübasyonları IL-4 (özellikle EPS) ve IL-10 (özellikle kombinasyon) sitokinlerinde oldukça olumlu sonuçlar vermiştir. IL-10 inflamatuvar fazın bitmesi ve rejeneratif süreçlerin başlaması hususunda oldukça önemli bir sitokindir. Bundan dolayı uygulama gruplarının en etkili sonucu IL-10 sitokininde vermesi bu grupların inflamatuvar fazı sonlandırmada etkili olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.10. Anti-İnflamatuar sitokinlerde 6 saatlik inkübasyonun western blot sonuçları

Sonraki başka bir çalışmada uygulama grupları aynı sitokinlerle 18 saatlik inkübasyonla çalışılmıştır. Alınan sonuçlar membran görüntüsü ve grafik sonuçları olarak Şekil 4.11’de verilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda TGF-β1 geninin ifade düzeyinde sağlanan artış protein düzeyinde gözlemlenmezken IL-4 geninde sağlanan gen ifadesi artışı protein düzeyine yansımıştır. En etkili sonuç ise 18.saatte IL-4 proteininde EPS uygulama grubunda alınmıştır. IL-10 için 6.saatte alınan olumlu sonuçlara rağmen 18.saatte sonuç alınamamıştır. Tip-2 immün yanıtın önemli parçalarından olan IL-4 rejeneratif süreçlerin başlaması için önemli bir sitokindir. Bundan dolayı uygulama gruplarının yaraya inflamasyon sürecinden çıkartıp rejeneratif süreçlere başlamasında yardımcı olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.11. Anti-İnflamatuvar sitokinlerde 18 saatlik inkübasyonun western blot sonuçları
 *(p<0,05)

5. TARTIŞMA

Mikrobiyal kaynaklı olan EPS ve β -glukanlar literatürde farklı biyolojik aktivitelere sahip özellikle immün düzenleyici mekanizmalar üzerinde etkisi olabileceği gösterilen biyopolimerdir (He ve diğerleri, 2019; Chaichian ve diğerleri, 2020; Li ve diğerleri, 2023). Polisakkaritlerdeki mannoz, glukoz, galaktoz ve arabinoz kalıntılarının immün modülatör etkiye katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Tian ve diğerleri, 2021; Figueiredo ve diğerleri, 2012). Mannozun Th1 hücrelerini ve Th2 hücrelerini baskılamayan yanı sıra inflamatuvar makrofajları da baskıladığı bildirilmiştir (Torretta ve diğerleri, 2020). Torretta ve araştırma grubu mannozun IL-1 β üretimini sınırlayabildiğini ve in vitro çalışmalarda LPS kaynaklı makrofajların aktivasyonunu baskılayabildiğini göstermişlerdir (Torretta ve diğerleri, 2020). Yüksek lisans çalışmasında kullanılan GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin karakterizasyonu Prof. Dr Belma ASLIM'in yürütücülüğünde tamamlanan TÜBİTAK projesi ve danışmanlığında tamamlanan doktora tezi çalışmasında gerçekleştirilmiştir. GD2 suşundan elde edilen L-EPS'nin içerik olarak mannoz (%71,03), glukoz (%25,97), arabinoz (%2,73) ve n-asetil glukozamin (%0,27) içeren bir heteropolisakkarit olduğu bilinmektedir (Tukenmez ve diğerleri, 2019). Hücrelerde bulunan mannoz reseptörleri, ağırlıklı olarak makrofajlar, olgunlaşmamış dendritik hücreler ve endotelial hücreler üzerinde eksprese edilen reseptörlerdir. Bu reseptörler patojenleri seçici olarak bağlayan ve hücre içine alınımını sağlayan bir model tanıma reseptörü olarak görev yapar. IL-4 ve IL 10 sitokinlerinden kaynaklı sinyallere bağlı olarak mannoz reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri artış gösterdiği bildirilmiştir (Paurević ve diğerleri, 2024). Anti-inflamatuvar fenotipte alınan gen ifadesi sonuçları tüm uygulama gruplarında IL-4 ve IL-10 genlerinin ifadesini oldukça arttırmıştır. Bu durum IL-4 ve IL-10 sinyalleme aracılığıyla hücrelerdeki mannoz reseptörlerinin ifadesinin artmasına sebep olabilir. Bu bağlamda EPS biyopolimeri hem IL-4 ve IL-10 sitokinlerinin ekspresyonlarını arttırarak hem de bu ekspresyonlarla tetiklenir. Böylece EPS içerisinde bulunan yoğun mannoz miktarının mannoz reseptörlerini aktive ederek immün modülatör etkiye katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Yalnızca glikoz kalıntılarını içeren β -glukanlar, mayalarda ve filamentli mantarlarda bulunan EPS'lerden biridir ve bunların bağışıklık sistemindeki immün sistemi uyarıcı ve immün modülatör potansiyelleri yoğun bir şekilde incelenmiştir (Hamidi ve diğerleri, 2023; Rahar ve diğerleri, 2011; Chaichian ve diğerleri, 2020; Li ve diğerleri, 2023). Kanseri önlemek ve tedavi etmek, kolesterolü düşürmek, diyabeti önlemek ve bağışıklık sistemi fonksiyonunu

arttırmak için bitkisel ilaç olarak alınırlar (Rahar ve diğerleri, 2011). β -glukanlar hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık üzerinde etkili olan immün modölatörlerdir. Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin istilacı bir patojeni hızlı bir şekilde tanıma ve ona yanıt verme yeteneği, enfeksiyonu kontrol etmek için gereklidir. β -1,3 ve β -1,6 glukanları bağlayan tip II transmembran protein reseptörü olan dektin-1, doğuştan gelen bağışıklık tepkisini başlatabilir ve düzenleyebilir (Sun ve Zhao, 2007). Dektin-1 aktivasyonu, nükleer faktör kappa B (NF- κ B), kaspaz-1 alımı domaini 9 (CARD9) ve aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü (NFATC) aracılığıyla IL-12, IL-6, TNF- α ve IL-10 dahil olmak üzere çeşitli sitokinlerin salınmasına yol açar. Makrofajlar üzerinde β -glukanların opsonik olmayan tanınmasında Dektin-1 ile iş birliği yapan önemli mannoz reseptörleri vardır (Taylor ve diğerleri, 2004). Bu durumda β -glukanların, mannoz reseptörlerinin ve dektin 1 reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla immün modölatör süreçlere katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar gen ifadelerinden alınan sonuçlar göz önüne alındığında, β -glukanların aşırı inflamasyonu baskıladığı ve iyileştirme süreçlerini anti-inflamatuar aracılığıyla başlattığı düşünülmektedir.

MTT analiziyle belirlenen uygulama gruplarının sitotoksitesi ISO 10993-5 standartlarına göre: hücre canlılığı 70'in altındaysa ise sitotoksite potansiyeli gösteriyor demektir (ISO, 2009). Belirlenen uygulama gruplarının sitotoksite analiz sonuçlarına bakıldığında (bkz. Şekil 4.1, şekil 4.2, ve Şekil 4.3) her iki biyopolimerde fibroblast hücrelerinde (bkz. Şekil 4.1) herhangi bir sitotoksite göstermemektedir. Dahası 264.7 RAW makrofaj hücrelerindeki canlılıklar incelendiğinde (bkz. Şekil 4.2) L-EPS uygulamasının dahil olduğu gruplar β -glukana göre daha düşük canlılık oranları vermektedir. Kombinasyonlar da dahil olmak üzere L-EPS uygulamasının dahil olduğu deney grupları ISO 10993-5 standartlarına göre sitotoksik etki potansiyeli göstermiştir. L-EPS'nin bu hücreler üzerindeki sitotoksik potansiyelinin LPS ile aktifleştirilmiş makrofaj hücrelerinde daha fazla (bkz. Şekil 4.3) hücre ölümüne sebep olduğu gözlemlenmiştir. Aktifleştirilmiş makrofaj hücreleriyle yapılan çalışmalar ayrıyeten β -glukanın tek başına uygulamalarının sitotoksiteyi giderdiğini ve hücre canlılığını arttırdığını göstermektedir.

Hücrelerin göçünün aktifleştirilip hızlı bir şekilde yara bölgesine gelmesi sağlıklı ve hızlı bir yara iyileşmesi için çok önemlidir. L929 fibroblast hücre hattıyla yapılan yara izi modelinde uygulama gruplarının tamamı yara kapatmaya katkıda bulunmuştur. Uygulamalar kapsamında her iki biyopolimerin kombinasyonlarının daha etkili sonuçlar verdiği (bkz.

Şekil 4.4 ve Şekil 4.5) gözlemlenmiştir. Bu durum EPS'lerin ve β -glukanların yara kapanmasını indüklemeye ve hücre göçünü arttırmada sinerjistik etkisinin olabileceğini göstermektedir. Ayrıca literatürde çalışılan çeşitli EPS'lerin ve β -glukanların in-vitro ve in-vivo yara kapanmasında oldukça etkili olduğu farklı çalışmalarca gösterilmiştir (Alvarez ve diğerleri, 2021; Sahana ve Rekha, 2020; Hamidi ve diğerleri, 2023; Trabelsi ve diğerleri, 2017; Dos Santos Voloski ve diğerleri, 2019). Bu durum L-EPS ve β -glukan kombinasyonundan geliştirilebilecek bir yara bakımı stratejisinin yara kapatma ve hücre göçünü hızlandırma konusunda etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Kollajen, insan ve memelilerin ECM'sinde oldukça bol bulunan bir proteindir ve vücudun yapısal bütünlüğünün korunmasında kritik bir rol oynar. Tip I kollajen en yaygın kollajen türüdür ve çeşitli dokuların yapısal bütünlüğü için gereklidir (Selvaraj, Sekaran, Dhanasekaran ve Warriar, 2024). TGF- β ve PDGF gibi büyüme faktörleri, fibroblastları, yara kapanmasını kolaylaştıran kasılma kuvvetleri üreten miyofibroblastlara dönüştüren fenotipik değişiklikleri başlatmaktadır (Davison-Kotler, Marshall ve García-Gareta, 2019). Miyofibroblastlar, yara dokusunda kollajen/ECM üretilip organize ederek yara iyileşmesinin ve hasarlı dokuların onarılmasını sağlar. Ayrıca miyofibroblastların sentezlediği matriks metaloproteinaz inhibitörleri ECM'nin korunumunda rol alır. Fibronektin, diğer birçok ECM proteininin yanı sıra küçük moleküller, büyüme faktörleri, glikozaminoglikanlar, hücre yüzeyi reseptörleri ve diğer fibronektin molekülleri ile etkileşime girerek ECM'nin kohezyonunu sağlamaktadır (Dalton ve Lemmon, 2021). FGF'ler güçlü anjiyogenez faktörleridir, fibroblastların anjiyogenezi ve çoğalmasını uyararak granülasyon dokusunu oluşturur. FGF'ler temel olarak hücre yüzeyindeki tirozin kinaz reseptörlerini/fibroblast büyüme faktörü reseptörlerini (FGFR'ler) bağlayarak -aktif ederek- çeşitli hücre içi tepkileri düzenler. Bu proteinler TGF- β ve nükleer antijen çoğalan proteinin (PCNA) ekspresyonunu güçlendirebilir, böylece yara iyileşmesinin rejeneratif profilini güçlendirebilir (Xie ve diğerleri, 2011). DLK1 çoklu farklılaşma süreçlerini düzenler, yapısal olarak notch ligandlarına benzer ve kanonik olmayan bir ligand olarak kabul edilir. DLK1'in adipogenez, kas ve nöronal farklılaşma, kemik farklılaşması ve hematopoiez dahil çeşitli farklılaşma süreçlerini etkilediği açıklanmıştır. Notch sinyal yolu, doğum öncesi ve sonrası anjiyogenezi kontrol ettiği için vasküler gelişim için gereklidir (Rodríguez ve diğerleri, 2012). L929 fibroblast hücre hattıyla yapılan gen ifadesi (bkz. Şekil 4.6) çalışmalarında TGF- β 1, FN, COL1A1, FGF-2 ve DLK-1 genleri çalışılmıştır. Bu çalışmalardan alınan sonuçlara bakıldığında tek başına β -glukan ve kombinasyon uygulamaları ECM birikimiyle

ilgili süreçleri kontrol eden genlerde (TGF- β 1, COL1A1 ve FN) gen ifadesi artışı göstermektedir. Fibroblastlarda TGF- β /Smad sinyal yolağı skar oluşumu ve fibrozisle ilişkilidir. Bu yolak fibroblastların miyofibroblastlara dönüşmesine, hücre dışı matriks birikimine, yara kontraksiyonuna ve skar oluşumuna aracılık eder (Penn, Grobbelaar ve Rolfe, 2021). TGF β 1 geninin düşük ekspresyonları hipertrofik skarlaşma ve keloid oluşumu gibi fibroproliferatif bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (Penn ve diğerleri, 2021). Bu açıdan β -glukan uygulaması TGF- β 1 gen ekspresyonunda sağladığı artış nedeniyle bu tip bozukluklar için etkili bir strateji olabilir.

DLK ve FGF-2 genlerinden alınan ekspresyon sonuçlarına göre kombinasyon uygulaması gen ekspresyonunun artışında oldukça etkili olmuştur. Bu durum β -glukan/L-EPS kombinasyonunun, notch sinyalleme ve FGF/FGFR yolağı üzerinden anjiyogenezi olumlu etkileyebileceğini düşündürmektedir. FGF-2 geninin ekspresyonunda alınan sonuçlar kombinasyon uygulamasının fibroblastların çoğalmasını, kollajen birikimini ve granülasyon dokusunun oluşumunu olumlu etkileyebileceğini göstermektedir (Enoch ve diğerleri, 2006). Ayrıca çeşitli çalışmalarda, FGF'nin hipertrofik skar tedavisinde olumlu etki yaparak skar oluşumunu azalttığı öne sürülmüştür. (Shi ve diğerleri, 2013). Bu gende β -glukan/L-EPS kombinasyonunda gözlemlenen gen ifadesi artışı, bu uygulamanın bu tip bozukluklarda ve skarsız iyileşme için yara bakım stratejisi geliştirmede kullanılabileceği düşündürmektedir. DLK-1 proteini notch sinyal yolağının kanonik olmayan majör bir proteindir. Cilt gelişimi sırasında, notch sinyali, epiderminin doğru tabakalaşmasını sağlamak için epidermal farklılaşmayı düzenlemektedir. Bu yolak yara iyileşmesinde, kollajen birikimi, makrofajlar aracılığıyla inflamasyonun düzenlenmesi ve anjiyogenez aşamalarında rol almaktadır (Bielefeld ve diğerleri 2013). DLK-1 gen ifadesinde gözlemlenen gen ifadesi artışı β -glukan/L-EPS kombinasyonunun, doku tabakalaşması ve farklılaşmasına katkı sağlayabileceğini, buna yönelik yara bakım stratejilerinde kullanışlı olabileceğini ve yarayı çeşitli iyileşme aşamalarda destekleyebileceğini düşündürmektedir.

TNF- α /TNFR sinyal yolağı akut inflamasyon sırasında hücreler içinde nekroz veya apoptoza yol açan çeşitli sinyal olaylarından sorumludur. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, istilacı mikroorganizmalardan gelen moleküler kalıpları algılar. Aktive edildikten sonra, IL-1 tipi sitokinler -özellikle IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler- salgılayarak inflamatuvar yanıtı düzenler (Rodrigues ve diğerleri, 2019). IL-1, ikincil inflamasyonda yer alan çok sayıda genin ekspresyonuna aracılık eder. IL-1 β /IL-1R sinyal yolağı IL-1'e duyarlı genleri ve lokal

inflamasyonun tüm yönlerini koordine eder ve aynı zamanda enfeksiyon bölgelerindeki kazanılmış bağışıklık sisteminin hücrelerini çeker ve aktive eder (Weber, Wasiliew ve Kracht. 2010). IL-6 bağışıklık yanıtlarında, hematopoezde, kemik metabolizmasında ve embriyonik gelişimde rol oynar. Bağışıklık hücreleri, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi sitokinler, NF- κ B ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3) inflamasyonda önemli rol oynar. IL-6/IL-6R sinyal yolağı bir NF- κ B hedefi olduğundan, immün olmayan hücrelerde NF- κ B ve STAT3'ün eşzamanlı aktivasyonu, IL-6/STAT3 eksenini tarafından NF- κ B aktivasyonunun pozitif geri besleme döngüsünü tetikler (Raziyeva ve diğerleri, 2021). RAW264.7 Makrofaj hücre hattında pro-inflamatuar fenotipin çalışıldığı deney modelinde (bkz. Şekil 4.7) TNF- α , IL-1 β ve IL-6 genleri çalışılmıştır. Yapılan ön çalışmalarda EPS yüksek inflamasyon ve anlamsız sonuçlar verdiği için L-EPS miktarı düşürülüp uygulamaların inkübasyon süresi 6 saate indirilmiştir. Buna rağmen L-EPS uygulamasını barındıran herhangi bir uygulama grubu pro-inflamatuar fenotipi baskılamamıştır. Bu minvalde tek olumlu sonuç β -glukanın tek başına uygulanmasından alınmıştır. Özellikle TNF- α geninin ifadesinde sağlanan baskılama β -glukan uygulamasının inflamasyonu giderici etkisini ortaya koymaktadır. Bu doğrultuda yapılan diyabetik ülser çalışmaları TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin aşırı ekspresyonunun, IL-10 ve TGF- β dahil olmak üzere iyileştirici araçların üretiminin azalmasına neden olduğunu göstermektedir. Bu durum, M1 fenotipine doğru makrofaj polarizasyonuna sebebiyet vererek, T hücrelerinin aktivasyonu ve degranülasyonuna yol açarak doku nekrozu ile sonuçlanır (Seraphim ve diğerleri, 2020). Bu tarz durumlarda TNF- α geninin baskılanması uygun bir yara bakım stratejisi olabilir. β -glukan biyopolimerinin TNF- α gen ifadesinde sağladığı baskılama bu tarz bir kullanım için etkili bir yara bakım stratejisi olabileceğini göstermektedir. IL-1 β ve IL-6 gen ifadelerinde gözlemlenen inhibisyon β -glukan biyopolimerinin pro-inflamatuar fenotipi baskıladığını göstermektedir. Bu genler, yara makrofajlarındaki inflamatuvar aktivitenin yukarı yönde düzenleyicisidir. Bu durum makrofajların anti-inflamatuar fenotipe doğru polarizasyonunu engeller (Raziyeva ve diğerleri, 2021).

İnflamasyon fazında TGF- β 1 salgılanması makrofaj fenotipinin M2 yönüne kaydığının göstergesidir. Bu durum inflamatuvar süreçlerin sonlandığını ve rejeneratif süreçlerin başladığını gösterir. IL-10 sitokini, yarada kollajen birikimini önleyen pro-inflamatuar fenotipten anti-inflamatuar fenotipe geçişin önemli bir aracısı olarak bilinmektedir (Seraphim ve diğerleri, 2020). IL-10'un yaralı yumuşak dokulardaki pro-rejeneratif süreçlere, tip 2 immün yanıtın sitokinleriyle beraber -özellikle IL-4 tarafından- önemli

ölçüde aracılık ettiği görülmektedir. (Daines, Schellhardt ve Wood, 2021). RAW264.7 Makrofaj hücre hattında anti-inflamatuar fenotipin çalışıldığı deney modelinde (bkz. Şekil 4.8) TGF- β 1, IL-4 ve IL-10 genleri çalışılmıştır. TGF- β 1/TGFR sinyalleme makrofajlarda hücrenin M2 fenotipe geçişi için önemlidir. Bu fenotip yaranın inflamasyon sürecini bitirmekte ve iyileştirici süreçlerini başlatmaktadır (Gong ve diğerleri, 2012). İstenilen gen ifadesi artışları 6.saatte tüm uygulama gruplarında alınırken 18.saatte gen ifadeleri azalmış ve kontrol grubuna yaklaşmıştır. Alınan sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda uygulama grupları anti-inflamatuar fenotipin gen ifadesini uygulamanın erken safhalarında arttırmıştır. TGF- β 1 geninin ifadesinden alınan sonuçlar uygulama gruplarının anti-inflamatuar fenotipi yaranın erken safhalarında tetikleyebileceğini ve ilerleyen sürelerde de bu etkisini korunduğunu göstermektedir. IL-10 geninin ifadesinden alınan sonuçlar incelendiğinde tüm uygulama grupları erken safhalarda anti-inflamatuar fenotipi tetiklerken; ilerleyen uygulama sürelerinde gen ifadesi kontrole eşitlenmiştir. IL-10/IL-10R sinyal yolağı yara da artık inflamasyonun bitmesi gerektiğine yönelik bir sinyaldir. Bu sinyalleme yoğunlukla makrofajlar ve T hücreleri tarafından yapılmaktadır. Uygulama gruplarının yaranın erken safhalarında bu genleri yukarı yönde regüle etmesi, inflamasyon bölgesine erkenden inflamatuvar baskılayıcıların salınımına sebep olabilir. IL-4 geninden alınan sonuçlar uygulamanın erken safhalarında anti-inflamatuar fenotipi tetiklerken ilerleyen safhalarda az da olsa sadece β -glukan grubunun etkisini koruduğunu göstermektedir. Tip-2 immün yanıtın önemli parçalarından olan IL-4/IL-4R sinyal yolağı rejeneratif süreçlerin başlaması için elzem bir sitokindir (Daines, Schellhardt ve Wood, 2021). Çalışılan biyopolimerlerin erken inkübasyonlarda sağladığı gen ifadesi artışları, inflamatuvar fenotipi baskılayarak iyileşme sürecini başlatabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan western blotlama çalışmalarında hem anti-inflamatuar proteinler hem de pro-inflamatuar proteinler çalışılmıştır. Anti-inflamatuar proteinlerin olduğu çalışmada (bkz. Şekil 4.10 ve Şekil 4.11) 2 biyopolimerde test edilmiştir. Pro-inflamatuar proteinlerin çalışıldığı deneyde (bkz. Şekil 4.9) yalnızca β -glukan grubu test edilmiştir. IL-6 proteini antikor kaynaklı bir sorundan dolayı hiç sonuç vermemiştir. Zaman ve kaynak sınırlılıklarından ötürü bu çalışmadaki sorunlar çözülememiştir. Yapılan çalışmada LPS indüklemesi olan grup kontrole yakın çıktığı için inflamasyon modeli grubunda sorun olmuştur. Buna rağmen TNF- α protein ifadesinde bakıldığında gen ifadesinde alınan etkili sonuç protein ifadesine az da olsa yansımaktadır. Anti-inflamatuar proteinlerin çalışıldığı western blotlama çalışmasında hem 18 saatlik hem 6 saatlik uygulama inkübasyonları

yapılmıştır. TGF- β 1 proteininde aldığımız sonuçlara bakıldığında uygulama gruplarının gen ifadesinde aldığımız sonuçlar 6.saatte ve 18.saatte protein ifadesine yansımamıştır. IL-4 proteininden alınan sonuçlara bakıldığında 6. saatteki gen ifadeleri yalnızca EPS grubu uygulamasında protein ifadesine anlamlı miktarda yansımıştır. 18.saatteki uygulamalarda ise gen ifadelerinin aksine sadece protein ifadelerinde artış gözlemlenmiştir. Bu durum bizim gözlemlemediğimiz bir sürede bu genin aktive olup yukarı yönde regüle olmuş olabileceğini ve sonra tekrar ifadesinin düştüğünü o sırada da bizim gözlemimizi yaptığımızı düşündürmektedir. IL-10 proteininden alınan sonuçlara baktığımızda 6.saatte uygulama gruplarının gen ifadesine etkisi tüm uygulamalarda oldukça fazlaca görülmektedir. Hatta 2 farklı biyopolimerin birleşen etkisi kombinasyonda daha fazla protein ifadesiyle sonuçlanmıştır. Ancak 18 saatlik uygulama sürelerine geldiğinde IL-10 proteini ifade olmamıştır. Bu durum uygulamaların gen ifadeleriyle de örtüşmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda kullanılan biyopolimerlerle ya da çeşitli versiyonlarıyla ilgili çalışmalar literatürde yapılmış olup yara iyileşmesindeki ve immün düzenleyici mekanizmalardaki etkileri ortaya konulmuştur. Çalışmamızda kullanılan biyopolimerler *Saccharomyces cerevisiae* kaynaklı ticari β -glukan ve *Lactiplantibacillus plantarum* bakterisinin GD2 suşundan üretilen L-EPS'lerdir. Bu yüksek lisans tez çalışmasında aşağıdaki çıkarımlar ve öneriler yapılmıştır.

1. Çalışmada kullanılan Beta glukan ve EPS biyopolimerleri yapılan MTT analizleri sonucu sitotoksik olmayıp biyouyumlu olduğu söylenebilir (ISO, 2009). Bu sonuçlara göre, her iki biyopolimerin ve kombinasyonlarının gerek ilaç gerekse biyomalzemede kullanımı mümkün olabilecektir
2. Çalışılan biyopolimerlerinin yara kapatma ve hücre göçü üzerindeki etkisi L929 fibroblast hücrelerinde in-vitro yara modeli (scratch assay) deneyiyle belirlenmiştir. Yara iyileşmesindeki proliferasyonun önemini etkenlerinden biri fibroblast göçü ve göç eden fibroblastlardan ECM üretmesidir. Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar her iki biyopolimerinde L929 fibroblast hücrelerinde hücre göçünü indükleyerek yara kapatmaya katkı sağladığını göstermiştir. Kombinasyondan alınan yara kapanma sonuçlarının tek başlarına verdiği sonuçtan fazla olması, yara bakım stratejilerinde etkili biyoaktif maddelerin geliştirilirken çeşitli biyopolimerlerin kombinasyon halinde kullanmanın önemini ortaya koymuştur.
3. Çalışılan uygulama gruplarının ECM bileşenlerine (COL1A1, TGF- β 1 ve FN), doku farklılaşması ve anjiyogeneze (FGF-2 ve DLK1) etkisi L929 fibroblast hücrelerinde yapılan gen ifadesi analizleri belirlenmiştir. Uygulama gruplarının bu genlerin ifadesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan uygulama grupları ve inkübasyon süreleri ekspresyon düzeyindeki artışı farklı oranlarda etkilemiştir. β -glukan biyopolimeri ve β -glukan/L-EPS kombinasyonu, 5 genin ifadesinde de en etkili sonuçları vermiştir. Alınan sonuçlar bağlamında çalışılan iki biyopolimerinde, yara iyileşme sürecinde ECM oluşumu, doku farklılaşması ve anjiyogeneze aracılığıyla yara iyileşmesinde rol alabileceği söylenebilir. ECM üretimiyle ilgili gen ekspresyon sonuçları in-vitro yara modeli (scratch assay) sonuçlarını desteklemiştir. Bu sonuçlar her iki biyopolimerlerin kombinasyon halinde ECM oluşumuna da katkı sağlayarak, yara kapanmasını indükleyebilecek biyoaktif maddeler olabileceğini göstermiştir.

4. Pro-inflamatuar fenotipte alınan gen ifadeleri baskılanması β -glukan uygulamasının inflamasyonu baskılayarak alarm yanıtı hafiflettiğini göstermektedir. TNF- α genin gözlemlenen yüksek baskılama TNF- α /TNF reseptörü sinyal yolağı aracılığıyla β -glukanın yarayı inflamasyondan çıkarmasında önemli bir role sahip olduğu göstermiştir. Ayrıca diğer bir pro-inflamatuar sitokinler olan IL-1 β ve IL-6'da gözlemlenen baskılanma β -glukan uygulamasının IL-1 β /IL-1 reseptörü ve IL-6 reseptörü sinyal yolları aracılığıyla inflamasyonu modüle ettiğini göstermektedir. Pro-inflamatuar fenotipte L-EPS grubunda istenen baskılanma olmadığı gibi inflamatuvar fenotipte fazlasıyla artış gözlemlenmiştir. Bu durum MTT analizleriyle ortaya koyulan inflamasyon modelinde β -glukanın inflamasyonu hafifletici etkisi olduğunu desteklerken, L-EPS'nin daha fazla inflamasyona -dolayısıyla daha fazla hücre ölümüne- sebebiyet verdiğini göstermektedir.
5. Anti-inflamatuar fenotipte (TGF- β 1, IL-4 ve IL-10) alınan sonuçlara göre yara iyileşmesinin erken saatlerinde L-EPS, β -glukan ve L-EPS/ β -glukan kombinasyonları anti-inflamatuar genlerin ifadesini arttırmıştır. Bu durum yara bakım stratejilerinde tüm uygulama gruplarının TGF- β 1/TGF reseptörü, IL-4/IL-4 reseptörü ve IL-10/IL-10 reseptörü sinyal yolları üzerindeki etkileri aracılığıyla inflamasyonu azaltıcı ajanlar olarak kullanılabilme potansiyelini göstermektedir. Ancak L-EPS'nin sebebiyet verdiği yoğun inflamatuvar etki anti-inflamatuar etkiden daha fazladır. Bu durumu gidermek için ileriki çalışmalarda yeni dozaj denemeleri yapılabilir.
6. Yapılan çalışmalarda alınan sonuçlar L-EPS ve β -glukan biyopolimerlerinin anti-inflamatuar yollar üzerinde sinerjistik etkisi olduğunu göstermektedir.
7. L-EPS ve β -glukan biyopolimerleri hem mannoz ve dectin-1 reseptörlerinin aktivasyonu ile hücrelerin doğrudan aktivasyonu hem de anti-inflamatuar sitokinler aracılığıyla hücrelerin dolaylı aktivasyonu aracılığıyla sinerjistik etki göstermiştir.
8. Anti-inflamatuar (TGF- β 1, IL-4 ve IL-10) fenotipte alınan olumlu sonuçların protein ifadesine etkisi western blotlama aracılığıyla belirlenmiştir. Anti-inflamatuar proteinin ifadelerine bakıldığında ise tüm uygulama gruplarının erken inkübasyon sürelerinde özellikle IL-10 proteinin ifade düzeyini arttırmıştır. En fazla artış iki biyopolimerin birleşen etkileriyle beraber L-EPS/ β -glukan kombinasyonu uygulamasında görülmüştür. Bu durum yara stratejilerinde iki farklı biyopolimerin kombinasyon olarak kullanılan biyoaktif maddelerin birleşip daha güçlü bir iyileştirici etki sergileyebileceği fikrini desteklemektedir.

9. L-EPS'nin içeriğinde bulunan yoğun mannoz miktarının literatürde anti-inflamatuar fenotip üzerine etkisi gösterildiği halde çalışmalarda meydana gelen yoğun inflammatuar etki araştırılabilir. Bu durum mannozun ya da EPS içeriğinde bulunan herhangi bir şekerin inflammatuar fenotipe yönelik etkisine dair farklı bir pencere açılabilir.
10. Bu çalışma kapsamında elde edilen veriler, çalışılan iki biyopolimer ve kombinasyonlarının yara kapatma kapasitesi yüksek deri grefti, yara örtüsü ya da yara iskeleleri gibi terapötik yaklaşımlarda etken madde olabileceğini göstermiştir.

Öneriler;

1. Çalışma sonuçları, denenen iki biyopolimer ve bu polimerlerinin kombinasyonlarının yara iyileşmesinde umut vadeci ilaç ve malzeme etken maddeleri olabileceğini göstermiştir.
2. Ancak, hayvan denemeleri ile biyopolimerler ve kombinasyonların kapsamlı çalışılarak yara iyileşme mekanizmasındaki etkinlikleri gösterilmelidir. Aynı zamanda gen ve protein düzeyinde genomik ve proteomik yollarla ilişkili daha kapsamlı gen ve transkriptomun analiz edilebildiği bütüncül biyoinformatik yaklaşımlarla çoklu etki mekanizmalarının ortaya konulması bu biyopolimerlerin ilaç ve malzeme alanında kullanımının önünü açacaktır.
3. Probiyotik kaynaklı EPS'nin olumlu etkilerinin yanı sıra yüksek konsantrasyonlarda inflamasyonu artırmasına bağlı oluşabilecek olumsuzlukların aşılması için, geliştirilecek kontrollü salım yapabilen malzeme ile EPS uygulama konsantrasyonunun kontrollü olarak düzenleneceği yara iyileştirmede başarılı sonuç alınacak çalışmaların yapılması önerilmekte ve planlanmaktadır.



KAYNAKLAR

- Almadani, Y. H., Vorstenbosch, J., Davison, P. G., & Murphy, A. M. (2021). Wound healing: a comprehensive review. *Seminars in plastic surgery*, 35(3), 141-144.
- Alvarez, X., Alves, A., Ribeiro, M. P., Lazzari, M., Coutinho, P., & Otero, A. (2021). Biochemical characterization of *Nostoc* sp. exopolysaccharides and evaluation of potential use in wound healing. *Carbohydrate polymers*, 254, 117303.
- Amanat, F., Duehr, J., Oestereich, L., Hastie, K. M., Ollmann Saphire, E., & Krammer, F. (2018). Antibodies to the glycoprotein GP2 subunit cross-react between old and new world arenaviruses. *mSphere*, 3(3), e00189-18.
- Baba, M., Davis, W. A., Norman, P. E., & Davis, T. M. (2015). Temporal changes in the prevalence and associates of foot ulceration in type 2 diabetes: the fremantle diabetes study. *Journal of diabetes and its complications*, 29(3), 356-361.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*, 16(5), 585-601.
- Behera, S. S., Das, U., Kumar, A., Bissoyi, A., & Singh, A. K. (2017). Chitosan/TiO₂ composite membrane improves proliferation and survival of L929 fibroblast cells: Application in wound dressing and skin regeneration. *International journal of biological macromolecules*, 98, 329-340.
- Bellingeri, A., Falciani, F., Traspedini, P., Moscatelli, A., Russo, A., Tino, G., Chiari, P., & Peghetti, A. (2016). Effect of a wound cleansing solution on wound bed preparation and inflammation in chronic wounds: a single-blind RCT. *Journal of wound care*, 25(3), 160-168.
- Bielefeld, K. A., Amini-Nik, S., & Alman, B. A. (2013). Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cellular and molecular life sciences*, 70(12), 2059-2081.
- Blair, P., & Flaumenhaft, R. (2009). Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood reviews*, 23(4), 177-189.
- Bratton, D. L., & Henson, P. M. (2011). Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends in immunology*, 32(8), 350-357.
- Brown, L. F., Yeo, K. T., Berse, B., Yeo, T. K., Senger, D. R., Dvorak, H. F., & van de Water, L. (1992). Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *The Journal of experimental medicine*, 176(5), 1375-1379.
- Bunkoed, O., & Thaniyavarn, S. (2014). *Isolation of exopolysaccharides producing-lactic acid bacteria for fermented milks products*. In the 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference-TSB2014, Chiang Rai (Thailand), 360-366.

- Butzelaar, L., Schooneman, D. P., Soykan, E. A., Talhout, W., Ulrich, M. M., van den Broek, L. J., Gibbs, S., Beelen, R. H., Mink van der Molen, A. B., & Niessen, F. B. (2016). Inhibited early immunologic response is associated with hypertrophic scarring. *Experimental dermatology*, 25(10), 797-804.
- Caley, M. P., Martins, V. L., & O'Toole, E. A. (2015). Metalloproteinases and wound healing. *Advances in wound care*, 4(4), 225-234.
- Cao, Y., Sun, Y., Zou, S., Duan, B., Sun, M., & Xu, X. (2018). Yeast β -Glucan suppresses the chronic inflammation and improves the microenvironment in adipose tissues of ob/ob mice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(3), 621-629.
- Chaichian, S., Moazzami, B., Sadoughi, F., Haddad Kashani, H., Zaroudi, M., & Asemi, Z. (2020). Functional activities of beta-glucans in the prevention or treatment of cervical cancer. *Journal of ovarian research*, 13(1), 24.
- Chen, W. Y., & Rogers, A. A. (2007). Recent insights into the causes of chronic leg ulceration in venous diseases and implications on other types of chronic wounds. *Wound repair and regeneration*, 15(4), 434-449.
- Chen, L., & DiPietro, L. A. (2017). Toll-Like Receptor Function in Acute Wounds. *Advances in wound care*, 6(10), 344-355.
- Cherng, J. H., Chou, S. C., Chen, C. L., Wang, Y. W., Chang, S. J., Fan, G. Y., Leung, F. S., & Meng, E. (2021). Bacterial cellulose as a potential bio-scaffold for effective re-epithelialization therapy. *Pharmaceutics*, 13(10), 1592.
- Chicharro-Alcántara, D., Rubio-Zaragoza, M., Damiá-Giménez, E., Carrillo-Poveda, J. M., Cuervo-Serrato, B., Peláez-Gorrea, P., & Sopena-Juncosa, J. J. (2018). Platelet rich plasma: new insights for cutaneous wound healing management. *Journal of functional biomaterials*, 9(1), 10.
- Coleman, W. L., Kulp, A. C., & Venditti, J. J. (2015). Functional distribution of synapsin I in human sperm. *Federation of European Biochemical Societies: Open biology*, 5, 801-808.
- Costa, R., Costa, L., Rodrigues, I., Meireles, C., Soares, R., Tamagnini, P., & Mota, R. (2021). Biocompatibility of the biopolymer cyanoflan for applications in skin wound healing. *Marine drugs*, 19(3), 147.
- Daines, J. M., Schellhardt, L., & Wood, M. D. (2021). The role of the IL-4 signaling pathway in traumatic nerve injuries. *Neurorehabilitation and neural repair*, 35(5), 431-443.
- Dalton, C. J., & Lemmon, C. A. (2021). Fibronectin: Molecular structure, fibrillar structure and mechanochemical signaling. *Cells*, 10(9), 2443.
- Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 7, 301-311.
- Davison-Kotler, E., Marshall, W. S., & García-Gareta, E. (2019). Sources of Collagen for Biomaterials in Skin Wound Healing. *Bioengineering*, 6(3), 56.

- de Oliveira, S., Rosowski, E. E., & Huttenlocher, A. (2016). Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nature reviews: Immunology*, 16(6), 378-391.
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology reviews*, 23(2), 153-177.
- Demir, A. (2022). *Potansiyel probiyotik Lactobacillus plantarum GD2 tarafından üretilen Ekzopolisakkarit'in (EPS) yara iyileşme özelliklerinin araştırılması*. Yüksek lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 36-50.
- Desmoulière, A., Redard, M., Darby, I., & Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American journal of pathology*, 146(1), 56-66.
- Dhivya, S., Padma, V. V., & Santhini, E. (2015). Wound dressings: a review. *BioMedicine*, 5(4), 22.
- Dickinson, L. E., & Gerecht, S. (2016). Engineered biopolymeric scaffolds for chronic wound healing. *Frontiers in physiology*, 7, 341.
- Dilna, S.V., Surya, H., Aswathy, R.G., Varsha, K.K., Sakthikumar, D.N., Pandey, A., & Nampoothiri, K.M. (2018). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *London Weekend Television: Food Science and Technology*, 64, 1179-1186.
- DiPietro, L. A., Polverini, P. J., Rahbe, S. M., & Kovacs, E. J. (1995). Modulation of JE/MCP-1 expression in dermal wound repair. *The American journal of pathology*, 146(4), 868-875.
- DiPietro, L. A., Wilgus, T. A., & Koh, T. J. (2021). Macrophages in healing wounds: paradoxes and paradigms. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 950.
- Dixon, D., & Edmonds, M. (2021). Managing diabetic foot ulcers: Pharmacotherapy for wound healing. *Drugs*, 81(1), 29-56.
- Dos Santos Voloski, A.P., de Figueiredo Soveral, L., Dazzi C.C., Sutili, F, Frandoloso, R., & Kreutz, L.C. (2019). B-Glucan improves wound healing in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish & Shellfish Immunology*, 93, 575-579.
- Eilken, H. M., & Adams, R. H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current opinion in cell biology*, 22(5), 617-625.
- Ellis, S., Lin, E. J., & Tartar, D. (2018). Immunology of wound healing. *Current dermatology reports*, 7(4), 350-358.
- Eming, S. A., Krieg, T., & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The Journal of investigative dermatology*, 127(3), 514-525.
- Englander, H. R. (1979). Fluoridation protects occlusal areas. *Journal of the American Dental Association*, 98(1), 11.

- Enoch, S., Grey, J. E., & Harding, K. G. (2006). Recent advances and emerging treatments. *British Medical Journal*, 332(7547), 962-965.
- Etulain J. (2018). Platelets in wound healing and regenerative medicine. *Platelets*, 29(6), 556-68.
- Fedorenko, O. A., Pulbutr, P., Banke, E., Akaniro-Ejim, N. E., Bentley, D. C., Olofsson, C. S., Chan, S., & Smith, P. A. (2020). CaV1.2 and CaV1.3 voltage-gated L-type Ca²⁺ channels in rat white fat adipocytes. *The Journal of endocrinology*, 244(2), 369-381.
- Feng, Y., Sun, Z. L., Liu, S. Y., Wu, J. J., Zhao, B. H., Lv, G. Z., Du, Y., Yu, S., Yang, M. L., Yuan, F. L., & Zhou, X. J. (2019). Direct and indirect roles of macrophages in hypertrophic scar formation. *Frontiers in physiology*, 10, 1101.
- Figueiredo, R. T., Bittencourt, V. C., Lopes, L. C., Sasaki, G., & Barreto-Bergter, E. (2012). Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) recognize polysaccharides of *Pseudallescheria boydii* cell wall. *Carbohydrate research*, 356, 260-264.
- Freedberg, I. M., Tomic-Canic, M., Komine, M., & Blumenberg, M. (2001). Keratins and the keratinocyte activation cycle. *The Journal of investigative dermatology*, 116(5), 633-640.
- Furie, B., & Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine*, 359(9), 938-949.
- Galli, S. J., Borregaard, N., & Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature immunology*, 12(11), 1035-1044.
- Gaude, E., Schmidt, C., Gammage, P. A., Dugourd, A., Blacker, T., Chew, S. P., Saez-Rodriguez, J., O'Neill, J. S., Szabadkai, G., Minczuk, M., & Frezza, C. (2018). NADH shuttling couples cytosolic reductive carboxylation of glutamine with glycolysis in cells with mitochondrial dysfunction. *Molecular cell*, 69(4), 581-593.
- Geller, A., Shrestha, R., & Yan, J. (2019). Yeast-derived β -Glucan in cancer: Novel uses of a traditional therapeutic. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3618.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., & Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology*, 161(6), 1163-1177.
- Gill, S. E., Pape, M. C., Khokha, R., Watson, A. J., & Leco, K. J. (2003). A null mutation for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (Timp-3) impairs murine bronchiole branching morphogenesis. *Developmental biology*, 261(2), 313-323.
- Goldberg, M. T., Han, Y. P., Yan, C., Shaw, M. C., & Garner, W. L. (2007). TNF-alpha suppresses alpha-smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *The Journal of investigative dermatology*, 127(11), 2645-2655.

- Goldberg, S. R., & Diegelmann, R. F. (2020). What makes wounds chronic. *The Surgical clinics of North America*, 100(4), 681-693.
- Gong, D., Shi, W., Yi, S. J., Chen, H., Groffen, J., & Heisterkamp, N. (2012). TGF β signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BioMedical Central immunology*, 13, 31.
- Goren, I., Allmann, N., Yogev, N., Schürmann, C., Linke, A., Holdener, M., Waisman, A., Pfeilschifter, J., & Frank, S. (2009). A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *The American journal of pathology*, 175(1), 132-147.
- Gram, A., & Kowalewski, M. P. (2022). Molecular mechanisms of lipopolysaccharide (LPS) induced inflammation in an immortalized ovine luteal endothelial cell line. *Veterinary sciences*, 9(3), 99.
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314-321.
- Gushiken, L. F. S., Beserra, F. P., Bastos, J. K., Jackson, C. J., & Pellizzon, C. H. (2021). Cutaneous wound healing: An update from physiopathology to current therapies. *Life*, 11(7), 665.
- Hamdan, S., Pastar, I., Drakulich, S., Dikici, E., Tomic-Canic, M., Deo, S., & Daunert, S. (2017). Nanotechnology-driven therapeutic interventions in wound healing: Potential uses and applications. *American Chemical Society: Central science*, 3(3), 163-175.
- Hamidi, M., Okoro, O. V., Ianiri, G., Jafari, H., Rashidi, K., Ghasemi, S., Castoria, R., Palmieri, D., Delattre, C., Pierre, G., Mirzaei, M., Nie, L., Samadian, H., & Shavandi, A. (2023). Exopolysaccharide from the yeast *Papiliotrema terrestris* PT22AV for skin wound healing. *Journal of advanced research*, 46, 61-74.
- He, L., & Marneros, A. G. (2013). Macrophages are essential for the early wound healing response and the formation of a fibrovascular scar. *The American journal of pathology*, 182(6), 2407-2417.
- He, C., Lin, H. Y., Wang, C. C., Zhang, M., Lin, Y. Y., Huang, F. Y., Lin, Y. Z., & Tan, G. H. (2019). Exopolysaccharide from *Paecilomyces lilacinus* modulates macrophage activities through the TLR4/NF- κ B/MAPK pathway. *Molecular medicine reports*, 20(6), 4943-4952.
- Hellström, M., Phng, L. K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A. K., Karlsson, L., Gaiano, N., Yoon, K., Rossant, J., Iruela-Arispe, M. L., Kalén, M., Gerhardt, H., & Betsholtz, C. (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 445(7129), 776-780.
- Hinz B. (2010). The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *Journal of biomechanics*, 43(1), 146–155.
- Hinz, B., & Gabbiani, G. (2003). Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thrombosis and haemostasis*, 90(6), 993-1002.

- Hobbs, R. M., Silva-Vargas, V., Groves, R., & Watt, F. M. (2004). Expression of activated MEK1 in differentiating epidermal cells is sufficient to generate hyperproliferative and inflammatory skin lesions. *The Journal of investigative dermatology*, 123(3), 503-515.
- Hu, M. S., Walmsley, G. G., Barnes, L. A., Weiskopf, K., Rennert, R. C., Duscher, D., Januszyk, M., Maan, Z. N., Hong, W. X., Cheung, A. T., Leavitt, T., Marshall, C. D., Ransom, R. C., Malhotra, S., Moore, A. L., Rajadas, J., Lorenz, H. P., Weissman, I. L., Gurtner, G. C., & Longaker, M. T. (2017). Delivery of monocyte lineage cells in a biomimetic scaffold enhances tissue repair. *Joint Commission International: insight*, 2(19), e96260.
- Huang, Y. Z., Gou, M., Da, L. C., Zhang, W. Q., & Xie, H. Q. (2020). Mesenchymal stem cells for chronic wound healing: Current status of preclinical and clinical Studies. *Tissue engineering. Part B: Reviews*, 26(6), 555–570.
- ISO, E. (2009). 10993-5. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Test for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.
- İçin, M. (2023). *Probiyotik kaynaklı paraprobiyotik ve postbiyotiğin, yara iyileşmesi ve moleküler inflamasyon mekanizmasındaki rolü*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 26-33.
- İnternet.1: L929 (ATCC®CCL-1™) ve RAW264.7 (ATCC®TIB-71™) hücre hatlarına ait özellikler. *ATCC*, URL: <https://www.atcc.org/products/tib-71>, Son Erişim Tarihi: 04.02.2024
- İnternet.2: National diabetes statistics report (2010). *CDC*, 10407 URL: <https://www.cdc.gov/diabetes/php/data-research/>, Son Erişim Tarihi: 30.05.2024.
- İnternet.3: Foot ulcers (2023). *Harvard health publishing* URL: https://www.health.harvard.edu/a_to_z/foot-ulcers-a-to-z, Son Erişim Tarihi: 30.05.2024.
- İnternet.4: The Global venous leg ulcer (VLU) treatment market size stood at USD 2.95 billion in 2018 is projected to reach USD 4.84 billion by 2026, exhibiting a CAGR of 6.4% during the forecast period (2024). *Fortune business insights* URL: <https://www.fortunebusinessinsights.com/venous-leg-ulcer-vlu-treatment-market-102370>, Son Erişim Tarihi: 30.05.2024.
- İnternet.5: Venous leg ulcer chronicity and recurrence: Breaking the cycle (2019). *Wound source* URL: <https://www.woundsource.com/blog/venous-leg-ulcer-chronicity-and-recurrence-breaking-cycle>, Son Erişim Tarihi: 30.05.2024.
- Ji, Z., Tang, Q., Zhang, J., Yang, Y., Jia, W., & Pan, Y. (2007). Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from *Ganoderma lucidum*. *Journal of ethnopharmacology*, 112(3), 445-450.
- Jiang, W., Luo, T., Li, S., Zhou, Y., Shen, X. Y., He, F., Xu, J., & Wang, H. Q. (2016). Quercetin protects against okadaic acid-induced injury via MAPK and PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathways in HT22 Hippocampal Neurons. *PloS one*, 11(4), e0152371.

- Jorch, S. K., & Kubes, P. (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nature medicine*, 23(3), 279-287.
- Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual review of immunology*, 30, 531-564.
- Kanmani, P., Satish kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., & Arul, V. (2011). Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresource technology*, 102(7), 4827-4833.
- Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S., & Takeshige, K. (2002). Activation of macrophages by linear (1right-arrow3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *The Journal of biological chemistry*, 277(39), 36825-36831.
- Khanna, S., Biswas, S., Shang, Y., Collard, E., Azad, A., Kauh, C., Bhasker, V., Gordillo, G. M., Sen, C. K., & Roy, S. (2010). Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PloS one*, 5(3), e9539.
- Kimball, A. S., Joshi, A. D., Boniakowski, A. E., Schaller, M., Chung, J., Allen, R., Bermick, J., Carson, W. F., 4th, Henke, P. K., Maillard, I., Kunkel, S. L., & Gallagher, K. A. (2017). Notch regulates macrophage-mediated inflammation in diabetic wound healing. *Frontiers in immunology*, 8, 635.
- Kohno, K., Koya-Miyata, S., Harashima, A., Tsukuda, T., Katakami, M., Ariyasu, T., Ushio, S., & Iwaki, K. (2021). Inflammatory M1-like macrophages polarized by NK-4 undergo enhanced phenotypic switching to an anti-inflammatory M2-like phenotype upon co-culture with apoptotic cells. *Journal of inflammation*, 18(1), 2.
- Kolimi, P., Narala, S., Nyavanandi, D., Youssef, A. A. A., & Dudhipala, N. (2022). Innovative treatment strategies to accelerate wound healing: Trajectory and recent advancements. *Cells*, 11(15), 2439.
- Koyutürk, A. ve Soyaslan, D. (2016). Yara ve yanık tedavisinde kullanılan örtüler. *Mehmet Akif Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(1), 58-65.
- Krampert, M., Bloch, W., Sasaki, T., Bugnon, P., Rüllicke, T., Wolf, E., Aumailley, M., Parks, W. C., & Werner, S. (2004). Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin. *Molecular biology of the cell*, 15(12), 5242-5254.
- Krangel M. S. (2003). Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nature immunology*, 4(7), 624-630.
- Krzyszczuk, P., Schloss, R., Palmer, A., & 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.
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor protocols*, 2018(6), 325.

- Kussie, H. C., Hahn, W., Sivaraj, D., Quintero, F., Knochel, A., Alfsharif, A. M., Yasmeh, J. P., Fischer, K., Mojadidi, S., Hostler, A., Granoski, M., McKenna, E., Henn, D., Litmanovich, B., Miller, A. A., Schurr, D. K., Li, V. W., Li, W. W., Gurtner, G. C., & Chen, K. (2024). Avenanthramide and β -Glucan therapeutics accelerate wound healing via distinct and nonoverlapping mechanisms. *Advances in wound care*, 13(4), 155-166.
- Kwon, M., Lee, J., Park, S., Kwon, O. H., Seo, J., & Roh, S. (2020). Exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* L-14 has anti-inflammatory effects via the Toll-Like Receptor 4 pathway in LPS-induced RAW 264.7 cells. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9283.
- Larouche, J., Sheoran, S., Maruyama, K., & Martino, M. M. (2018). Immune regulation of skin wound healing: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Advances in wound care*, 7(7), 209-231.
- Lattimer, J. M., & Haub, M. D. (2010). Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*, 2(12), 1266–1289.
- Laubach, J., Joseph, M., Brenza, T., Gadhamshetty, V., & Sani, R. K. (2021). Exopolysaccharide and biopolymer-derived films as tools for transdermal drug delivery. *Journal of controlled release*, 329, 971-987.
- Laurienzo P. (2010). Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Marine drugs*, 8(9), 2435-2465.
- Lech, M., & Anders, H. J. (2013). Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochimica et biophysica acta: Molecular basis of disease*, 1832(7), 989-997.
- Lee, S. H., Jang, G. Y., Hwang, I. G., Kim, H. Y., Woo, K. S., Kim, K. J., Lee, M. J., Kim, T. J., Lee, J., & Jeong, H. S. (2015). Physicochemical properties of β -Glucan from acid hydrolyzed barley. *Preventive nutrition and food science*, 20(2), 110-118.
- Levin, R., Grinstein, S., & Canton, J. (2016). The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunological reviews*, 273(1), 156-179.
- Li, L., Wang, Y., Huang, Z., Xu, Z., Cao, R., Li, J., Wu, B., Lu, J. R., & Zhu, H. (2023). An additive-free multifunctional β -glucan-peptide hydrogel participates in the whole process of bacterial-infected wound healing. *Journal of controlled release*, 362, 577-590.
- Li, S., & Shah, N. P. (2016). Characterization, anti-inflammatory and antiproliferative activities of natural and sulfonated exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Journal of food science*, 81(5), 1167-1176.
- Li, S., Tian, X., Fan, J., Tong, H., Ao, Q., & Wang, X. (2019). Chitosans for tissue repair and organ three-dimensional (3D) bioprinting. *Micromachines*, 10(11), 765.
- Liang, C. C., Park, A. Y., & 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.

- Lima-Neto, J. F., Fernandes, C. B., Alvarenga, M. A., Golim, M. A., & Landim-Alvarenga, F. C. (2010). Viability and cell cycle analysis of equine fibroblasts cultured in vitro. *Cell and tissue banking*, 11(3), 261–268.
- Liñán-Rico, A., Ochoa-Cortes, F., Zuleta-Alarcon, A., Alhaj, M., Tili, E., Enneking, J., Harzman, A., Grants, I., Bergese, S., & Christofi, F. L. (2017). UTP- gated signaling pathways of 5-HT release from BON cells as a model of human enterochromaffin cells. *Frontiers in pharmacology*, 8, 429.
- Lindley, L. E., Stojadinovic, O., Pastar, I., & Tomic-Canic, M. (2016). Biology and biomarkers for wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 138(3), 18–28
- Liu, Y., Liu, Y., Deng, J., Li, W., & Nie, X. (2021). Fibroblast growth factor in diabetic foot ulcer: Progress and therapeutic prospects. *Frontiers in endocrinology*, 12, 744868.
- Liu, M. H., Yuan, C., He, J., Tan, T. P., Wu, S. J., Fu, H. Y., Liu, J., Yu, S., Chen, Y. D., Le, Q. F., Tian, W., Hu, H. J., Zhang, Y., & Lin, X. L. (2015). Resveratrol protects PC12 cells from high glucose-induced neurotoxicity via PI3K/Akt/FoxO3a pathway. *Cellular and molecular neurobiology*, 35(4), 513–522.
- Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Müller, W., Roers, A., & Eming, S. A. (2010). Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *Journal of immunology*, 184(7), 3964–3977.
- Lumbers M. (2018). Wound debridement: choices and practice. *British journal of nursing*, 27(15), 16–20.
- Ma, F., Song, Y., Sun, M., Wang, A., Jiang, S., Mu, G., & Tuo, Y. (2021). Exopolysaccharide Produced by *Lactiplantibacillus plantarum*-12 Alleviates Intestinal Inflammation and Colon Cancer Symptoms by Modulating the Gut Microbiome and Metabolites of C57BL/6 Mice Treated by Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium Salt. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(12), 3060.
- Maharjan, S., Serova, L. I., & Sabban, E. L. (2010). Membrane-initiated estradiol signaling increases tyrosine hydroxylase promoter activity with ER alpha in PC12 cells. *Journal of neurochemistry*, 112(1), 42–55.
- Maity, P., Sen, I. K., Chakraborty, I., Mondal, S., Bar, H., Bhanja, S. K., Mandal, S., & Maity, G. N. (2021). Biologically active polysaccharide from edible mushrooms: A review. *International journal of biological macromolecules*, 172, 408–417.
- Majee S.B., Avlani D., & Biswas G.R. (2017). Rheological behavior and pharmaceutical applications of bacterial exopolysaccharides. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 174, 224–232.
- Majtan, J., & Jesenak, M. (2018). β -Glucans: Multi-functional modulator of wound healing. *Molecules*, 23(4), 806.
- Maouia, A., Rebetz, J., Kapur, R., & Semple, J. W. (2020). The immune nature of platelets revisited. *Transfusion medicine reviews*, 34(4), 209–220.

- Maquart, F. X. (2015). Extracellular matrix: a major partner of wound healing. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*, 199(7), 1199-1209.
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2020). Scratch wound healing assay. *Methods in molecular biology*, 2109, 225-229.
- Merecz-Sadowska, A., Sitarek, P., Zajdel, K., Kucharska, E., Kowalczyk, T., & Zajdel, R. (2021). The modulatory influence of plant-derived compounds on human keratinocyte function. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12488.
- Mirza, R., DiPietro, L. A., & Koh, T. J. (2009). Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *The American journal of pathology*, 175(6), 2454-2462.
- Mohammad, S., Hutchinson, K. A., da Silva, D. F., Bhattacharjee, J., McInnis, K., Burger, D., & Adamo, K. B. (2021). Circulating small extracellular vesicles increase after an acute bout of moderate-intensity exercise in pregnant compared to non-pregnant women. *Scientific reports*, 11(1), 12615.
- Muthuramalingam, K., Choi, S. I., Hyun, C., Kim, Y. M., & Cho, M. (2019). B-glucan-based wet dressing for cutaneous wound healing. *Advances in wound care*, 8(4), 125-135.
- Nathan C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews. Immunology*, 6(3), 173-182.
- Niculescu, A. G., & Grumezescu, A. M. (2022). An up-to-date review of biomaterials application in wound management. *Polymers*, 14(3), 421.
- Niğdelioğlu Dolanbay, S. (2023). *Glaucium grandiflorum* Boiss. & *A. Huet* subsp. *Refractum* (Nâbëlek) Mory alkoloit ekstraktlarının kalsiyum homeostazi mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz ve nöral ölüm yolları üzerindeki etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 78-84.
- Niu, J., Chang, Z., Peng, B., Xia, Q., Lu, W., Huang, P., Tsao, M. S., & Chiao, P. J. (2007). Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. *The Journal of biological chemistry*, 282(9), 6001-6011.
- Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International journal of molecular sciences*, 13(11), 14002-14015.
- Olsson, M., Järbrink, K., Divakar, U., Bajpai, R., Upton, Z., Schmidtchen, A., & Car, J. (2019). The humanistic and economic burden of chronic wounds: A systematic review. *Wound repair and regeneration*, 27(1), 114-125.
- Omar, A., Wright, J. B., Schultz, G., Burrell, R., & Nadworny, P. (2017). Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*, 5(1), 9.
- Opneja, A., Kapoor, S., & Stavrou, E. X. (2019). Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thrombosis research*, 179, 56-63.

- Oskeritzian C. A. (2012). Mast cells and wound healing. *Advances in wound care*, 1(1), 23–28.
- Padula, W. V., & Delarmente, B. A. (2019). The national cost of hospital-acquired pressure injuries in the United States. *International wound journal*, 16(3), 634-640.
- Park, J. E., & Barbul, A. (2004). Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American journal of surgery*, 187(5A), 11-16.
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N. C., Ramirez, H., Nusbaum, A. G., Sawaya, A., Patel, S. B., Khalid, L., Isseroff, R. R., & Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in wound healing: A comprehensive review. *Advances in wound care*, 3(7), 445-464.
- Paurević, M., Šrajer Gajdošik, M., & Ribić, R. (2024). Mannose ligands for mannose receptor targeting. *International journal of molecular sciences*, 25(3), 1370.
- Penn, J. W., Grobbelaar, A. O., & Rolfe, K. J. (2012). The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *International journal of burns and trauma*, 2(1), 18-28.
- Piipponen, M., Li, D., & Landén, N. X. (2020). The immune functions of keratinocytes in skin wound healing. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8790.
- Pool J. G. (1977). Normal hemostatic mechanisms: a review. *The American journal of medical technology*, 43(8), 776-780
- Prasad, S., & Purohit, S. R. (2023). Microbial exopolysaccharide: Sources, stress conditions, properties and application in food and environment: A comprehensive review. *International journal of biological macromolecules*, 242(3), 124925.
- Qin Z. (2012). The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, 221(1), 2-11.
- Rahar, S., Swami, G., Nagpal, N., Nagpal, M. A., & Singh, G. S. (2011). Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 2(2), 94-103.
- Raziyeva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S., & Saparov, A. (2021). Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*, 11(5), 700.
- Ren, Q., Chan, K. W., Huang, H., Wang, Z., Fang, X., Guo, C., Li, F., Zhang, L., Yao, Y., Chen, Z., Tian, Y., & Lin, T. (2020). Platelet-derived alpha-granules are associated with inflammation in patients with NK/T-cell lymphoma-associated hemophagocytic syndrome. *Cytokine*, 126, 154878.
- Ricard-Blum S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), a004978.
- Richer, J., Kral V., Stiborova, I., Rajnohova, D. And Vetvicka, V. (2015). Anti-inflammatory effects of β -glucan in cancer related fatigue. *Journal of Nutrition and Health Sciences*, 2(3), 304.

- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound healing: A cellular perspective. *Physiological reviews*, 99(1), 665-706.
- Rodríguez, P., Higuera, M. A., González-Rajal, A., Alfranca, A., Fierro-Fernández, M., García-Fernández, R. A., Ruiz-Hidalgo, M. J., Monsalve, M., Rodríguez-Pascual, F., Redondo, J. M., de la Pompa, J. L., Laborda, J., & Lamas, S. (2012). The non-canonical NOTCH ligand DLK1 exhibits a novel vascular role as a strong inhibitor of angiogenesis. *Cardiovascular research*, 93(2), 232-241.
- Romo-Rico, J., Krishna, S. M., Bazaka, K., Golledge, J., & Jacob, M. V. (2022). Potential of plant secondary metabolite-based polymers to enhance wound healing. *Acta biomaterialia*, 147, 34-49.
- Rumbaut, R. E., & Thiagarajan, P. (2010). *Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis*. San Rafael (California): Morgan & Claypool Life Sciences Publishing, 121.
- Sahana, T. G., & Rekha, P. D. (2018). Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. *Molecular biology reports*, 45(6), 2857-2867.
- Sahana, T. G., & 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, F., & Farrokh, P. (2023). Recent advances in the biological activities of microbial exopolysaccharides. *World journal of Microbiology & Biotechnology*, 39(8), 213.
- Salonurmi, T., Parikka, M., Kontusaari, S., Piriälä, E., Munaut, C., Salo, T., & Tryggvason, K. (2004). Overexpression of TIMP-1 under the MMP-9 promoter interferes with wound healing in transgenic mice. *Cell and tissue research*, 315(1), 27-37.
- Santhini, E., Pramila, V. M., Shalini, M., Vignesh Balaji, R. And Chellamani, K. P. (2018). Preparation and characterization of PLGA-based biocompatible nanoparticles for sustained delivery of growth factor for wound healing applications. *Current Science*, 115(7), 1287-1296.
- Schreml, S., & Berneburg, M. (2017). The global burden of diabetic wounds. *The British journal of dermatology*, 176(4), 845-846.
- Schultz, G. S., Davidson, J. M., Kirsner, R. S., Bornstein, P., & Herman, I. M. (2011). Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound repair and regeneration*, 19(2), 134-148.
- Selvaraj, V., Sekaran, S., Dhanasekaran, A., & Warriar, S. (2024). Type I collagen: Synthesis, structure and key functions in bone mineralization. *Differentiation; research in biological diversity*, 136, 100757.
- Sen C. K. (2021). Human wound and its burden: Updated 2020 compendium of estimates. *Advances in wound care*, 10(5), 281-292.
- Seo, G., Hyun, C., Choi, S., Kim, Y. M. And Cho, M. (2019). The wound healing effect of four types of beta-glucan. *Applied Biological Chemistry*, 62, 20.

- Seraphim, P. M., Leal, E. C., Moura, J., Gonçalves, P., Gonçalves, J. P., & Carvalho, E. (2020). Lack of lymphocytes impairs macrophage polarization and angiogenesis in diabetic wound healing. *Life sciences*, 254, 117813.
- Sezer, A. D., & Cevher, E. (2011). Biopolymers as wound healing materials: challenges and new strategies. *Biomaterials applications for nanomedicine*, Rijeka (Croatia): InTech publishing, 383-414.
- Sharda, A., & Flaumenhaft, R. (2018). The life cycle of platelet granules. *F1000Research*, 7, 236
- Shi, H. X., Lin, C., Lin, B. B., Wang, Z. G., Zhang, H. Y., Wu, F. Z., Cheng, Y., Xiang, L. J., Guo, D. J., Luo, X., Zhang, G. Y., Fu, X. B., Bellusci, S., Li, X. K., & Xiao, J. (2013). The anti-scar effects of basic fibroblast growth factor on the wound repair in vitro and in vivo. *PloS one*, 8(4), e59966.
- Sirin, S., & Aslim, B. (2021). Protective effect of exopolysaccharides from lactic acid bacteria against amyloid beta1-42-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells Involvement of the AKT, MAPK, and NF- κ B signaling pathway. *Process Biochemistry*, 106, 50-59
- Sirin, S., Aslim, B. (2020). Characterization of lactic acid bacteria derived exopolysaccharides for use as a defined neuroprotective agent against amyloid beta1-42-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Scientific reports* 10, 8124
- Slauch J. M. (2011). How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Molecular microbiology*, 80(3), 580-583.
- Smith, A. M., Moxon, S., & Morris, G. A. (2016). Wound healing biomaterials (1st edition), Copenhagen (Denmark): Woodhead Publishing, 261-287.
- Sorokin L. (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 10(10), 712–723.
- Stramer, B. M., Mori, R., & Martin, P. (2007). The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *The Journal of investigative dermatology*, 127(5), 1009-1017.
- Sul H. S. (2009). Minireview: Pref-1: role in adipogenesis and mesenchymal cell fate. *Molecular endocrinology*, 23(11), 1717-1725.
- Sun, L., & Zhao, Y. (2007). The biological role of dectin-1 in immune response. *International reviews of immunology*, 26(6), 349–364.
- Swann G. (2010). The skin is the body's largest organ. *Journal of visual communication in medicine*, 33(4), 148–149.
- Takalo, M., Wittrahm, R., Wefers, B., Parhizkar, S., Jokivarsi, K., Kuulasmaa, T., Mäkinen, P., Martiskainen, H., Wurst, W., Xiang, X., Marttinen, M., Poutiainen, P., Haapasalo, A., Hiltunen, M., & Haass, C. (2020). The Alzheimer's disease-associated protective Plc γ 2-P522R variant promotes immune functions. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 1-14.

- Taylor, P. R., Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., & Gordon, S. (2004). The role of SIGNR1 and the beta-glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. *Journal of immunology*, 172(2), 1157-1162.
- Telgenhoff, D., & Shroot, B. (2005). Cellular senescence mechanisms in chronic wound healing. *Cell death and differentiation*, 12(7), 695-698.
- Thiruvoth, F. M., Mohapatra, D. P., Kumar, D., Chittoria, S. R. K., & Nandhagopal, V. (2015). Current concepts in the physiology of adult wound healing. *Plastic and Aesthetic Research*, 2, 250-256.
- Tian, J., Zhang, C., Wang, X., Rui, X., Zhang, Q., Chen, X., Dong, M., & Li, W. (2021). Structural characterization and immunomodulatory activity of intracellular polysaccharide from the mycelium of *Paecilomyces cicadae* TJJ1213. *Food research international*, 147, 110515.
- Tifoun, N., Bekhouche, M., De Las Heras, J. M., Guillaume, A., Bouleau, S., Guénal, I., Mignotte, B., & Le Floch, N. (2022). A high-throughput search for SFXN1 physical partners led to the identification of ATAD3, HSD10 and TIM50. *Biology*, 11(9), 1298.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(5), 349-363.
- Tonnesen, M. G., Feng, X., & Clark, R. A. (2000). Angiogenesis in wound healing. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings*, 5(1), 40-46.
- Torretta, S., Scagliola, A., Ricci, L., Mainini, F., Di Marco, S., Cuccovillo, I., Kajaste-Rudnitski, A., Sumpton, D., Ryan, K. M., & Cardaci, S. (2020). D-mannose suppresses macrophage IL-1 β production. *Nature communications*, 11(1), 6343.
- Tottoli, E. M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E., Pisani, S., & Conti, B. (2020). Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics*, 12(8), 735.
- Trabelsi, I., Ktari, N., Ben Slima, S., Triki, M., Bardaa, S., Mnif, H., & Ben Salah, R. (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.
- Tsuboi, R., & Rifkin, D. B. (1990). Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *The Journal of experimental medicine*, 172(1), 245-251.
- Tsuda, H., Hara, K., & Miyamoto, T. (2008). Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *Journal of dairy science*, 91(8), 2960-2966.
- Tudoroiu, E. E., Dinu-Pîrvu, C. E., Albu Kaya, M. G., Popa, L., Anuța, V., Prisada, R. M., & Ghica, M. V. (2021). An overview of cellulose derivatives-based dressings for wound-healing management. *Pharmaceutics*, 14(12), 1215.

- Tukenmez, U., Aktas, B., Aslim, B., & 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), 8268.
- Tükenmez, Ü. Ve Aslım, B. (2018). Probiyotik Kaynaklı, Muhtemel Prebiyotik Özelliğe Sahip Ekzopolisakkarit (EPS'lerin) Biyolojik ve Fonksiyonel Özellikleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 25(4), 487-497.
- van der Zande, H. J. P., Nitsche, D., Schlautmann, L., Guigas, B., & Burgdorf, S. (2021). The mannose receptor: from endocytic receptor and biomarker to regulator of inflammation. *Frontiers in immunology*, 12, 765034.
- van Hijum, S. A., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., & van Geel-Schutten, I. G. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(1), 157-176.
- Versey, Z., da Cruz Nizer, W. S., Russell, E., Zigic, S., DeZeeuw, K. G., Marek, J. E., Overhage, J., & Cassol, E. (2021). Biofilm-innate immune interface: Contribution to chronic wound formation. *Frontiers in immunology*, 12, 648554.
- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research*, 92(8), 827-839.
- Volman, J. J., Ramakers, J. D., & Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiology & behavior*, 94(2), 276-284.
- Wang, G., Zhu, L., Yu, B., Chen, K., Liu, B., Liu, J., Qin, G., Liu, C., Liu, H., & Chen, K. (2016). Exopolysaccharide from *Trichoderma pseudokoningii* induces macrophage activation. *Carbohydrate polymers*, 149, 112-120.
- Wang, P. H., Huang, B. S., Horng, H. C., Yeh, C. C., & Chen, Y. J. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), 94-101.
- Wang, S., Zhou, H., Feng, T., Wu, R., Sun, X., Guan, N., Qu, L., Gao, Z., Yan, J., Xu, N., Zhao, J., & Qi, C. (2014). β -Glucan attenuates inflammatory responses in oxidized LDL-induced THP-1 cells via the p38 MAPK pathway. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases*, 24(3), 248-255.
- Wang, T., Xie, C., Yu, P., Fang, F., Zhu, J., Cheng, J., Gu, A., Wang, J., & Xiao, H. (2017). Involvement of insulin signaling disturbances in bisphenol A-induced alzheimer's disease-like neurotoxicity. *Scientific reports*, 7(1), 7497.
- Wani, S. M., Gani, A., Mir, S. A., Masoodi, F. A., & Khanday, F. A. (2021). β -Glucan: A dual regulator of apoptosis and cell proliferation. *International journal of biological macromolecules*, 182, 1229-1237.
- Watt F. M. (2002). The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. *Journal of dermatological science*, 28(3), 173-180.
- Weber, A., Wasiliew, P., & Kracht, M. (2010). Interleukin-1 β (IL-1 β) processing pathway. *Science signaling*, 3(105), 2.

- Werner, S., Smola, H., Liao, X., Longaker, M. T., Krieg, T., Hofschneider, P. H., & Williams, L. T. (1994). The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science*, 266(5186), 819-822.
- Wernig, G., Chen, S. Y., Cui, L., Van Neste, C., Tsai, J. M., Kambham, N., Vogel, H., Natkunam, Y., Gilliland, D. G., Nolan, G., & Weissman, I. L. (2017). Unifying mechanism for different fibrotic diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(18), 4757-4762.
- Wetzler, C., Kämpfer, H., Stallmeyer, B., Pfeilschifter, J., & Frank, S. (2000). Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *The Journal of investigative dermatology*, 115(2), 245-253.
- Wilgus, T. A., Roy, S., & McDaniel, J. C. (2013). Neutrophils and wound repair: Positive actions and negative reactions. *Advances in wound care*, 2(7), 379-388.
- Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open biology*, 10(9), 200223.
- Williams, M. A., & Bevan, M. J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annual review of immunology*, 25, 171-192.
- Wu, Y. K., Cheng, N. C., & Cheng, C. M. (2019). Biofilms in chronic wounds: Pathogenesis and diagnosis. *Trends in biotechnology*, 37(5), 505-517.
- Xie, J., Bian, H., Qi, S., Xu, Y., Tang, J., Li, T., & Liu, X. (2008). Effects of basic fibroblast growth factor on the expression of extracellular matrix and matrix metalloproteinase1 in wound healing. *Clinical and experimental dermatology*, 33(2), 176-182.
- Xie, L., Zhang, M., Dong, B., Guan, M., Lu, M., Huang, Z., Gao, H., & Li, X. (2011). Improved refractory wound healing with administration of acidic fibroblast growth factor in diabetic rats. *Diabetes research and clinical practice*, 93(3), 396-403.
- Xie, T., Ye, J., Rerkasem, K., & Mani, R. (2018). The venous ulcer continues to be a clinical challenge: an update. *Burns & trauma*, 6, 18.
- Xin, Y., Ji, H., Cho, E., Roh, K. B., You, J., Park, D., & Jung, E. (2022). Immune-enhancing effect of water-soluble beta-glucan derived from enzymatic hydrolysis of yeast glucan. *Biochemistry and biophysics reports*, 30, 101256.
- Yan, C., Grimm, W. A., Garner, W. L., Qin, L., Travis, T., Tan, N., & Han, Y. P. (2010). Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor-alpha through bone morphogenic protein-2. *The American journal of pathology*, 176(5), 2247-2258.
- Yanez, D. A., Lacher, R. K., Vidyarthi, A., & Colegio, O. R. (2017). The role of macrophages in skin homeostasis. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 469(4), 455-463.

- Yi, Y., Huang, W., and Ge, Y. (2008). Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1061.
- Yun, C. H., Estrada, A., Van Kessel, A., Park, B. C., & Laarveld, B. (2003). Beta-glucan, extracted from oat, enhances disease resistance against bacterial and parasitic infections. *Federation of European Microbiological Societies: Immunology and medical microbiology*, 35(1), 67-75.
- Zaiss, D. M., Minutti, C. M., & Knipper, J. A. (2019). Immune- and non-immune-mediated roles of regulatory T-cells during wound healing. *Immunology*, 157(3), 190–197.
- Zhang, P., Lu, J., Jing, Y., Tang, S., Zhu, D., & Bi, Y. (2017). Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. *Annals of medicine*, 49(2), 106-116.
- Zhang, X., Shu, W., Yu, Q., Qu, W., Wang, Y., & Li, R. (2020). Functional biomaterials for treatment of chronic wound. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 516.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & 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), 2782-2858.
- Zhou, Z., Xiao, J., Huang, S., Wu, H., Guan, S., Wu, T., Yu, S., Huang, S., & Gao, B. (2023). A wet-adhesive carboxymethylated yeast β -glucan sponge with radical scavenging, bacteriostasis and anti-inflammatory functions for rapid hemostasis. *International journal of biological macromolecules*, 230, 123158.
- Zhu, Z., Ding, J., Ma, Z., Iwashina, T., & Tredget, E. E. (2016). Systemic depletion of macrophages in the subacute phase of wound healing reduces hypertrophic scar formation. *Wound repair and regeneration*, 24(4), 644–656.





Gazili olmak ayrıcalıktır